



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Química

**ESTUDIO EXPERIMENTAL Y TEÓRICO-
COMPUTACIONAL DE BIOMARCADORES DE DAÑO
RENAL TEMPRANO CAUSADO POR PLOMO Y
GENTAMICINA Y DETERMINACIÓN DE POSIBLES
MECANISMOS DE ACCIÓN SOBRE SUS RECEPTORES
CELULARES**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Químicas

Presenta:

Q. F. B. Dulce Carolina Ruiz Ramírez

Asesor: Dr. Juvencio Robles García

Co-Asesor: Dra. Minerva Martínez Alfaro

Guanajuato, Gto. Septiembre de 2020.

Artículos enviados relacionados con esta tesis

1. CORRELATION BETWEEN KIM-1 IN URINE AND PROTEIN EXPRESSION OF p-ERK IN KIDNEY, FOLLOW UP AFTER DAMAGE IN RATS EXPOSED TO GENTAMICIN OR LEAD ACETATE, Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, Martínez- Alfaro, Minerva; Ruiz Ramírez, Dulce Carolina; Antaño-Martínez, Alejandro Raúl; Robles, Juvencio; Gallegos-Corona, Marco Alonso; Gallegos-Reyes, Marco Alonso; Avila, Eva-Edilia, artículo enviado 2020.

Trabajos relacionados con esta tesis presentados en Congresos:

1. Presentación con el proyecto Evaluación de biomarcadores de daño renal temprano por plomo y gentamicina en el XVI encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia realizado los días 29-31 de mayo del 2019 en León, Guanajuato.
2. Participación en el XLIII Simposio “Jacobo Gómez Lara” con el trabajo titulado Estudio experimental y teórico-computacional de biomarcadores de daño renal temprano causado por plomo y gentamicina y determinación de posibles mecanismos de acción sobre sus receptores celulares.
3. Participación en el XLIV Simposio “Jacobo Gómez Lara” con el trabajo titulado Estudio teórico-computacional de la gentamicina y su interacción con modelos homólogos de la megalina como sus posibles receptores. En la Universidad de Guanajuato el día 29 de noviembre del 2019.
4. Asistencia y participación en la XVIII Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica con el trabajo titulado Estudio teórico-computacional de la gentamicina y su posible receptor de la megalina. En la ciudad de Toluca, Edo. De México, los días 24-26 de octubre del 2019.

Jurado asignado

Presidente: Dra. Patricia Ponce Noyola (Departamento de Biología)

Secretario: Dr. Marco Antonio García Revilla (Universidad de Guanajuato)

Vocal: Dr. Bernardo Franco Bárcenas (Departamento de Biología)

Suplente: Dr. Gustavo Cruz Jiménez (Universidad de Guanajuato)

DR. AGUSTÍN RAMÓN URIBE RAMÍREZ
DIRECTOR
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO.

Por medio de la presente hago de su conocimiento que el trabajo de TESIS DE MAESTRÍA intitulado *“Estudio experimental y teórico-computacional de biomarcadores de daño renal temprano causado por plomo y gentamicina y determinación de posibles mecanismos de acción sobre sus receptores celulares”* que presenta la Q. F. B. Dulce Carolina Ruiz Ramírez, fue realizado bajo mi supervisión en mi laboratorio en esta DCNE y confirmo que es un trabajo de investigación original, por lo que considero que reúne los requisitos académicos para obtener el GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS y no tengo inconveniente en autorizar su defensa oral.

Agradeciéndole de antemano la atención que se sirva brindar a la presente, quedo de usted,

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"



DR. JUVENCIO ROBLES GARCÍA
PROFESOR TITULAR “C”.

CONTENIDO

1. AGRADECIMIENTOS	7
2. TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	9
3. LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES	11
4. RESUMEN	16
Summary	17
5. CAPÍTULO 1	18
INTRODUCCIÓN	18
5.1 Enfermedad renal	18
5.2 Nefrotóxicos.....	19
5.2.1 Metales pesados: Plomo.....	19
5.2.2 Gentamicina	21
5.3 Biomarcadores	22
5.3.1 Molécula de Lesión Renal-1 (KIM-1)	22
5.4 Vía MAPK.....	23
5.4.1 p-ERK ½.....	25
5.5 Proteínas analizadas en este trabajo.	26
5.5.1 DMT1	26
5.5.2 TRPV5	27
5.5.3 p21	28
5.6 Estudio de las interacciones entre los nefrotóxicos y su receptor biológico.....	28
5.7 Estudio Teórico (Preparación de la proteína de estudio)	29
5.7.1 Receptor de la gentamicina: megalina	29
5.7.2 Modelado homólogo para la obtención de estructuras aproximadas	32
5.7.3 Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	34
5.8 Preparación del ligando	37
5.8.1 Propiedades ADMET.....	37
5.8.2 Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT)	41
5.8.3 Nivel de teoría y modelo de estudio	42
5.8.4 Descriptores de la reactividad	44
6. CAPÍTULO 2	49
ESTUDIO EXPERIMENTAL	49
Objetivo general.....	49
Objetivos específicos	49
Hipótesis.....	50

Justificación	50
7. CAPÍTULO 3	51
METODOLOGÍA	51
7.1 Experimental	51
7.1.1- Animales, tratamientos y aislamiento de muestras.....	51
7.1.2 Técnica ELISA	52
7.1.3 Western blot	52
7.2 Teórico-computacional.....	53
7.2.1 Descriptores de la reactividad de los componentes de la gentamicina	53
7.2.2 Estructuras aproximadas por el método de homología.	54
7.2.3 Acoplamiento molecular (docking).....	55
7.2.4 Propiedades ADMET de la gentamicina.....	57
7.2.5 Efectos principales.....	57
8. CAPÍTULO 4	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
8.1 Experimental.....	59
8.1.1 ANIMALES, TRATAMIENTOS Y AISLAMIENTO DE MUESTRAS.	59
8.1.2 ELISA PARA BIOMARCADOR KIM-1.....	59
8.1.3 WESTERN BLOT.....	60
8.2 Parte teórico-computacional	65
8.2.1 DESCRIPTORES DE LA REACTIVIDAD	65
8.2.2 ESTRUCTURAS HOMOLOGAS	72
8.2.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR: DOCKING	86
8.4 PROPIEDADES ADMET DE LOS COMPONENTES DE LA GENTAMICINA.....	94
9. CAPÍTULO 5	97
CONCLUSIONES	97
10. CAPÍTULO 6	100
PERSPECTIVAS	100
11. CAPÍTULO 7	101
REFERENCIAS	101

APÉNDICE. Artículo publicado en coautoría:

CORRELATION BETWEEN KIM-1 IN URINE AND PROTEIN EXPRESSION OF p-ERK IN KIDNEY, FOLLOW UP AFTER DAMAGE IN RATS EXPOSED TO GENTAMICIN OR LEAD ACETATE, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, Martínez- Alfaro, Minerva; **Ruiz Ramírez, Dulce Carolina**; Antaño-Martínez, Alejandro Raúl; Robles, Juvencio; Gallegos-Corona, Marco Alonso; Gallegos-Reyes, Marco Alonso; Avila, Eva-Edilia, aceptado con correcciones menores, **2020**.

1. AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos personales:

A mis padres, por su confianza y apoyo incondicional, por enseñarme que la responsabilidad y el trabajo duro son características esenciales que forjan el desarrollo correcto de una persona.

A mis queridos profesores Minerva y Juvencio, por sus conocimientos aportados a mi vida académica, personal y sobre todo profesional. Gracias por su tiempo dedicado a mí y por enseñarme que los grandes investigadores, no solo los forman la cantidad de publicaciones y nombramientos, si no la sencillez, amabilidad e importancia con la que tratan a las demás personas.

A mis compañeros y amigos: Brenda Viveros, Erika Navarrete, Iván Velazco, Fernanda Badillo, Jacqueline Bravo y Marco Revilla, por ayudarme en los momentos estresantes y desgastantes, aportando la diversión y tranquilidad a mi maestría.

A mi esposo Daniel, por su compañía, preocupación y amor durante todo el proceso.

A mis hermanos, Alberto y Cecilia, quienes me enseñaron que, siendo la hermana del medio, siempre hay alguien siguiendo tus pasos, alguien que admira lo que haces y que siempre cree en ti. Ellos que siempre han estado a mi lado en mis batallas y me han hecho sentir que todo estará bien.

Gracias a todos ustedes por estar en los momentos de mayor felicidad en mi vida, pero sobre todo por apoyarme en el momento más difícil que he tenido que pasar.

Agradecimientos académicos y financieros:

Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de Maestría otorgada con número de registro 926302.

A la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato por los apoyos económicos otorgados para la asistencia a congresos nacionales, así mismo a la Rectoría del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato.

Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (Universidad de Guanajuato-CONACYT, Proyecto: 123732), por el tiempo de cómputo otorgado en el CLÚSTER LINUX llamado PIPILA.

Al Sistema Único de Becas Educafin-Sube por la beca otorgada con folio 485412 como Apoyo Único para Movilidad para Boletos de transporte.

2. TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aa (Aminoácidos)

ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación, Toxicidad)

AE (Afinidad electrónica)

AKI (Enfermedad Renal Aguda)

BUN (nitrógeno y urea en sangre)

CD (Dominio Conservado)

CDD (Base de datos de Dominios Conservados)

CL (Registros de Clúster de superfamilias)

CTP (Células Tubulares Proximales)

DFT (Teoría de Funcionales de la Densidad)

DG (Descriptores de la reactividad)

DL50 (Dosis Letal 50)

DMSA (Ácido dimercaptosuccínico)

DMT1 (Proteína Transportadora de Metales Divalentes Tipo 1)

EL (Eficiencia de ligando)

eV (ElectronVolts)

f^+ (función Fukui nucleofílica)

f^- (Función Fukui electrofílica)

f^0 (Función Fukui de radicales)

FDA (Administración de Alimentos y de Medicamentos de EUA)

GAPDH (Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa)

GentaC1 (Componente de la gentamicina C1)

GentaC1a (Componente de la gentamicina C1a)

GentaC2 (Componente de la gentamicina C2)

GentaC2a (Componente de la gentamicina C2a)

GentaC2b (Componente de la gentamicina C2b)

HIA (Absorción Intestinal Humano)

ID (Identificador Único)

KI (Constante de inhibición)

KIM-1 (Molécula de Lesión Renal tipo 1)

LogP (Coeficiente de partición)

M06-2X (Funcional de la densidad Minnesota 2006 con el 54% de energía Hartree-Fock de intercambio-correlación)

MAPK (Proteína cinasa activada por mitógenos)

MDCK (Riñón canino Madin-Darby)

Meta-GGA (Meta-Aproximación del Gradiente Generalizado)

NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

NTP (Programa Nacional de Toxicología).

p21 (Proteína multifuncional No. 21 involucrada en la coordinación de la respuesta celular)

PDB (Banco de datos de proteínas de Brookhaven)

p-ERK ½ (Proteína Cinasa Regulada por Señal Extracelular 1 y 2)

Pfam (Base de datos Familias de Proteínas)

PI (Potencial de ionización)

PSSM (Matriz de Puntuación Especifica de Posición)

QSAR (Relación Cuantitativa estructura-actividad)

RMSD (Desviación Cuadrática Media)

S (Blandura)

SMART (Herramienta de Investigación de Arquitectura Modular Simple)

SMD (Modelo de medio continuo de solvatación basado en la densidad)

TRPV5 (Potencial Receptor Transitorio Tipo 5)

η (Dureza)

μ (Potencial químico)

χ (Electronegatividad)

ω (Electrofilicidad)

ω⁻ (Potencia electrodonadora)

ω⁺ (Potencia electroaceptora)

3. LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y ECUACIONES

Tablas	Pie de Tabla
Tabla 1	Características semejantes de la megalina en humano, rata y ratón.
Tabla 2	Características de las bases de datos que se encuentran disponibles en NCBI.
Tabla 3	Clasificación de la propiedad de unión a proteínas plasmáticas.
Tabla 4	Clasificación de la propiedad de penetración de la barrera hematoencefálica.
Tabla 5	Clasificación de la propiedad de absorción intestinal humana.
Tabla 6	Clasificación de la propiedad de permeabilidad celular.
Tabla 7	Clasificación de la propiedad de mutagenicidad mediante la prueba de AMES
Tabla 8	Grupos de ratas bajo el tratamiento con gentamicina.
Tabla 9	Grupos de ratas bajo el tratamiento con acetato de plomo.
Tabla 10	Lista de los dominios disponibles obtenida a partir de la secuencia de la megalina.
Tabla 11	Grupos de los acoplamientos. El acoplamiento 1 será entre el componente principal C1 de la gentamicina con cada uno de los 6 dominios homólogos obtenidos de la megalina. Así mismo, el acoplamiento C1a y C2.
Tabla 12	Características estadísticas de las interacciones de los componentes principales de la gentamicina con los dominios de la megalina.
Tabla 13	Energías obtenidas de cada componente de la gentamicina con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase agua.
Tabla 14	Descriptorios de la reactividad global de cada componente de la gentamicina con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase agua.
Tabla 15	Energías obtenidas de cada componente de la gentamicina en su forma neutra, catiónica y aniónica con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas. La tonalidad de menor a mayor representa del átomo menos al más electrofílico (f^+), nucleofílico (f^-) y el átomo susceptible a un ataque radicalario (f^0).
Tabla 16	Energías obtenidas de cada componente de la gentamicina en su forma neutra, catiónica y aniónica con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase agua. La tonalidad de menor a mayor representa del átomo menos al más electrofílico (f^+), nucleofílico (f^-) y el átomo susceptible a un ataque radicalario (f^0).
Tabla 17	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio 2I1P. El valor de Z-score del modelo 4 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
Tabla 18	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Smart00135. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
Tabla 19	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Cd00112. El valor de Z-score del modelo 3 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
Tabla 20	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Smart00192. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
Tabla 21	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam00057-58. El valor de Z-score del modelo 3 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
Tabla 22	Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam12662. El valor de Z-score del modelo 1 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

- Tabla 23 Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam14667. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.
- Tabla 24 Propiedades calculadas de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad (ADMET) de cada uno de los componentes de la gentamicina.

Figuras Pie de Figura

- Figura 1 Mecanismos de toxicidad del plomo.
- Figura 2 Estructuras de los diferentes componentes de la formula farmacéutica de la gentamicina.
- Figura 3 Estructura de KIM-1, glucoproteína de membrana tipo 1, que consta de: un dominio intracelular (sitio fosforilación de tirosina), otro transmembranal y un dominio extracelular (ectodominio) que es eliminado a través de la orina.
- Figura 4 Ruta de las MAPK
- Figura 5 Activación de la vía ERK MAP cinasa por el receptor EGF.
- Figura 6 Estructura del Transportador de Metales Divalentes (DMT1) que consta de 12 dominios transmembranales, G representa un sitio de glicosilación y T representa un sitio de transporte.
- Figura 7 Estructura de TRPV5, que consiste en seis dominios transmembranales con repeticiones de anikarina.
- Figura 8 Representación de la estructura de la megalina
- Figura 9 Procedimiento del modelado homologo para la obtención de estructuras tridimensionales de proteínas que no cuentan con una estructura determinada experimentalmente.
- Figura 10 Número de publicaciones sobre acoplamiento molecular del año 2000 al 2016.
- Figura 11 Procedimiento general para el estudio de las interacciones entre un blanco biológico y un ligando en el acoplamiento molecular (*docking*).
- Figura 12 Ejemplo de la interacción de un fármaco en la cavidad de una proteína.
- Figura 13 Propiedades farmacocinéticas de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco administrado oralmente.
- Figura 14 Clasificación jerárquica de los funcionales de DFT de Perdew y Wang, conocida como “La escalera de Jacobo”.
- Figura 15 Niveles de KIM-1 en orina después de la exposición a acetato plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha).
- Figura 16 Resultado representativo de los westerns blots de cada condición, de las fracciones citoplasmáticas (superiores) y nucleares (inferiores). A) Tratamiento con acetato de plomo. B) Tratamientos con gentamicina.
- Figura 17 Niveles de expresión de la proteína p-ERK ½ citoplasmática después de la exposición a acetato plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha)
- Figura 18 Niveles de expresión de la proteína p-ERK ½ nuclear después de la exposición a acetato de plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha).
- Figura 19 Niveles de expresión de la proteína TRPV5 después de la exposición a acetato de plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha).
- Figura 20 Niveles de expresión de la proteína DMT1 después de la exposición a acetato de plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha)
- Figura 21 Niveles de expresión de la proteína p21 después de la exposición a acetato de plomo (izquierda) y a gentamicina (derecha).
- Figura 22 Estructuras optimizadas con un nivel de teoría M06-2X 6-311+G (d, p) de los componentes de la gentamicina C1, C1a, C2, C2a y C2b. Todas se muestran optimizados en fase agua y en su estado neutro. Los átomos se muestran en gris (carbono), rojo (nitrógeno), azul (oxígeno) y blanco (hidrógeno).

- Figura 23 Funciones Fukui en cada componente de la gentamicina en fase gas (superior) y en fase agua (inferior).
- Figura 24 Estructura de la solución de la duodécima repetición de unión a ligando rica en cisteína en megalina de rata. Estructura obtenida de NCBI con código de identificación 2IIP.
- Figura 25 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio 2IIP de la megalina de rata. La enumeración de los modelos propuestos se establece de izquierda a derecha, empezando con el modelo 1 y finalizando con el modelo 5.
- Figura 26 Evaluación de la energía de manera global (izquierda), local (centro) y la estructura del dominio 2IIP en donde las zonas en azul representan zonas de baja energía (estable) y las zonas en rojo representan las zonas de alta energía (inestables).
- Figura 27 Estructura cristalina de 2IIP (izquierda), estructura homóloga obtenida (centro). Además, se presenta el match entre ambas estructuras terciarias (derecha).
- Figura 28 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Smart00135 de la megalina de rata.
- Figura 29 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Smart00135.
- Figura 30 Cuatro modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Cd00112 de la megalina de rata.
- Figura 31 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Cd00112.
- Figura 32 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Smart00192 de la megalina de rata.
- Figura 33 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Smart00192.
- Figura 34 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam00057-58 de la megalina de rata.
- Figura 35 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam00057-58.
- Figura 36 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam12662 de la megalina de rata.
- Figura 37 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam12662.
- Figura 38 Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam14670 de la megalina de rata.
- Figura 39 Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam14667.
- Figura 40 Modelos homólogos seleccionados: Smart00135, Cd00112, Smart00192, Pfam4670, Pfam12662 y Pfam00057-58.
- Figura 41 Esquema establecido para el acoplamiento molecular entre los tres componentes principales de la gentamicina C1, C1a y C2 con cada uno de los modelos homólogos que se obtuvieron en el método de homología: Smart00135, Cd00112, Smart00192, Pfam4670, Pfam12662 y Pfam00057-58.
- Figura 42 Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares entre el componente principal C1 de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).
- Figura 43 Mapa de la superficie del potencial del dominio Smart00135 con el ligando GentaC1. La interacción se da cerca de cavidad central del dominio, la cual se asemeja a un túnel. El color rojo indica las zonas con mayor cantidad de densidad electrónica y el azul a la de menor, la escalada del potencial electrostático es de 15.4 Kcal/mol a -15.4 Kcal/mol.

- Figura 44 Tipos de interacciones entre el componente C1 de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart00135 (izquierda) y los aminoácidos del dominio Pfm14670 de la megalina (derecha).
- Figura 45 Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares entre el componente principal C1a de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).
- Figura 46 Tipos de interacciones entre el componente C1a de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart00057-58 (izquierda) y los aminoácidos del dominio Pfm14670 de la megalina (derecha).
- Figura 47 Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares entre el componente principal C2 de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).
- Figura 48 Tipos de interacciones entre el componente C2 de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart00057-58 (izquierda) y los aminoácidos del dominio 2I1P de la megalina (derecha).
- Figura 49 Gráfica de los efectos principales entre cada factor estudiado. Se muestra el efecto de la eficiencia de ligando entre los dominios de la megalina (izquierda) y el efecto de la eficiencia de ligando sobre los componentes principales de la gentamicina (derecha).
- Figura 50 Gráfica de los efectos principales entre cada factor estudiado. Se muestra el efecto de constante de inhibición entre los dominios de la megalina (izquierda) y el efecto de la eficiencia de ligando sobre los componentes principales de la gentamicina (derecha).

Ecuación Pie de Ecuación

- Ecuación 1 Ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. \hat{H} es el operador Hamiltoniano que contiene los operadores de la energía cinética y la energía potencial $\left[-\frac{\hbar}{2m} \nabla^2 + V(r) \right]$, Ψ es la función de onda y \mathcal{E} es la energía del sistema.
- Ecuación 2 Ecuación de Kohn y Sham. El potencial externo $V(r)$ se sustituye por el $V_x(r)$, que es el potencial local efectivo, que es la contribución de intercambio y correlación de un gas uniforme con la densidad electrónica, Ψ es la función de onda y \mathcal{E} es la energía del sistema. El subíndice es cada uno de los orbitales de Kohn y Sham.
- Ecuación 3 Energía libre de Gibbs del modelo de solvatación SMD.
- Ecuación 4 Esquema de Hirshfeld donde q_A es la carga de un átomo A en una molécula, Z_A es el número atómico de A, $\rho(r)$ es la densidad electrónica y $\frac{\rho_A^0(r)}{\sum_B \rho_B^0(r)}$ es el factor de proporcionalidad basado en la densidad, que es la relación de la densidad de electrones del átomo aislado ($\rho_A^0(r)$) y la densidad construida a partir de la superposición de las densidades de los electrones aislados de los átomos presentes en la molécula ($\sum_x \rho_x^0(r)$).
- Ecuación 5 Potencial de ionización (PI), donde $E(N-1)$ es la energía de la molécula en la forma catiónica y $E(N)$ es la energía de la molécula en la forma neutra.
- Ecuación 6 Afinidad Electrónica (AE), donde $E(N)$ es la energía de la molécula en la forma neutra y $E(N+1)$ es la energía de la molécula en la forma aniónica.
- Ecuación 7 Potencial químico (μ), donde E es la energía de la molécula, N es el número de electrones totales y v es el potencial externo.

- Ecuación 8 Electronegatividad (χ), donde E es la energía de la molécula, N es el número de electrones totales y v es el potencial externo.
- Ecuación 9 Dureza química (η), donde E es la energía de la molécula y N es el número de electrones totales.
- Ecuación 10 Blandura química (S), donde η es la dureza química.
- Ecuación 11 Electrofilicidad (ω) donde μ es el potencial químico y η es la dureza química.
- Ecuación 12 Potencia electrodonadora (ω^-) donde IP es el potencial de ionización y AE es la afinidad electrónica.
- Ecuación 13 Potencia electroaceptora (ω^+) donde IP es el potencial de ionización y AE es la afinidad electrónica.
- Ecuación 14 Densidad electrónica (ρ) donde E es la energía de la molécula, V es el potencial externo y N es el número de electrones totales.
- Ecuación 15 Función Fukui condensada electrofílica (f^-), donde $q_{anión}$ es la carga del átomo i-ésimo de la molécula aniónica y q_{neutro} es la carga del átomo i-ésimo de la molécula neutra.
- Ecuación 16 Función Fukui condensada nucleofílica (f^+), donde $q_{cación}$ es la carga del átomo i-ésimo de la molécula catiónica y q_{neutro} es la carga del átomo i-ésimo de la molécula neutra.
- Ecuación 17 Función Fukui radicalaria (f^0), donde $q_{anión}$ es la carga del átomo i-ésimo de la molécula aniónica y $q_{cación}$ es la carga del átomo i-ésimo de la molécula catiónica.

4. RESUMEN

La enfermedad renal (ER) es un problema global de la salud que afecta aproximadamente 750 millones de personas. La ER es el resultado de ciertas patologías y factores de exposición ambientales, como el plomo, y fármacos que afectan de forma crónica e irreversible al tejido renal, como la gentamicina. El plomo es un metal pesado que se enlaza a sitios de unión de las proteínas, alterando su actividad biológica. La gentamicina es un antibiótico eficaz ante infecciones severas. Sin embargo, su uso está restringido ya que provoca nefrotoxicidad. Se conoce que el daño causado por la gentamicina es debido a la acumulación de este antibiótico en las células tubulares proximales, sobre el receptor megalina, que es responsable de su absorción y eliminación. Cuando la ER aguda no es detectada en una etapa temprana, puede desarrollarse a una etapa crónica. Por esta razón se buscan biomarcadores, que puedan predecir y diagnosticar la ER en una etapa temprana, identificar la ubicación, tipo y etiología de la lesión.

La Molécula de Lesión Renal (KIM-1) es un biomarcador urinario no invasivo y sensible para la evaluación del daño renal. Esta proteína transmembranal está involucrada en la activación de la vía de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK). En los últimos años se ha demostrado que las proteínas de la vía MAPK están involucradas en el mecanismo de nefrotoxicidad causada por la gentamicina. Por esta razón, es importante conocer las propiedades fisicoquímicas, electrónicas y estructurales de la gentamicina, lo que se logra con técnicas teóricas-computacionales en donde se obtienen los descriptores de la reactividad y las propiedades farmacocinéticas calculadas como la Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad (ADMET). Estas propiedades nos permitirán entender la interacción de la gentamicina con su receptor biológico, que es la megalina, de la cual aún no se ha determinado su estructura tridimensional debido al gran tamaño que presenta (600 kDa) y su complejidad estructural.

En este trabajo se buscó correlacionar KIM-1 con las alteraciones patológicas renales por medio de la técnica de ELISA y la activación de proteínas involucradas en la vía MAPK como p-ERK $\frac{1}{2}$ y otras proteínas como p21, TRPV5 y DMT1 a través de western blot. Lo anterior en respuesta a la intoxicación por plomo y gentamicina a diferentes dosis y tiempos en un modelo murino.

La acumulación de gentamicina en las células renales es uno de los mecanismos de nefrotoxicidad. Esta acumulación se debe a la presencia de proteínas receptoras que permiten la entrada de gentamicina. Se sabe que este antibiótico se une a una proteína llamada megalina localizado en las células proximales del riñón. En este trabajo, se analizó las interacciones y modo de unión de la gentamicina a esta proteína, por medio de los programas Spartan18, Gaussian09, I-TASSER, AutoDock y ProSaI.

Además, se estudió mediante métodos de la química teórica y computacional las propiedades electrónicas, estructurales y fisicoquímicas, empleando Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) al nivel de teoría M06-2X en fase gas y fase solvente (agua) con el modelo de solvatación SMD. Y la determinación de las propiedades ADMET de la gentamicina, a través del programa PreADMET.

Nuestros datos muestran que los niveles de KIM-1 siempre se correlacionan con la expresión de p-ERK $\frac{1}{2}$ citoplasmática en riñón. Con esto se podría decir que la activación de KIM-1 y la expresión de p-ERK $\frac{1}{2}$ comparten un mecanismo molecular común en la progresión del daño renal causado por el plomo y la gentamicina. La gentamicina tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y, además, propiedades mutagénicas. Otra propiedad determinada de la gentamicina fue la fuerte interacción con estructuras de proteínas semejantes a un canal, presentes en la megalina, esto es causado por una gran eficiencia de ligando y una elevada constante de inhibición. Sugiriendo ser la vía de entrada de la gentamicina a las células renales proximales.

Summary

Kidney disease (KD) is a global health problem that affects approximately 750 million people. KD is the result of certain environmental pathologies and exposure factors, such as lead and drugs that chronically and irreversibly affect kidney tissue, such as gentamicin. Lead is a heavy metal that binds to protein binding sites, altering their biological activity. Gentamicin is an effective antibiotic for severe infections. However, its use is restricted as it causes nephrotoxicity. It is known that the damage caused by gentamicin is due to the accumulation of this antibiotic in proximal tubular cells, due to the megalin receptor, which is responsible for its absorption and elimination. When acute KD is not detected at an early stage, it can turn to a chronic stage. For this reason, biomarkers are sought, which can predict and diagnose KD at an early stage, identify the location, type, and etiology of the lesion.

The Kidney Injury Molecule (KIM-1) is a noninvasive and sensitive urinary biomarker for the assessment of kidney damage. This transmembrane protein is involved in the activation of the Mitogen-Activated Kinase Proteins (MAPK) pathway. In recent years it has been shown that the proteins of the MAPK pathway are involved in the mechanism of nephrotoxicity caused by gentamicin. For this reason, it is important to determine the physicochemical, electronic, and structural properties of gentamicin that is achieved with theoretical-computational techniques where descriptors of reactivity and pharmacokinetic properties such as Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, and Toxicity (ADMET) are computed. These properties will allow us to understand the interaction of gentamicin with its biological receptor, which is megalin, whose three-dimensional structure has not yet been determined due to the very large size it presents (600 kDa) and its structural complexity.

In this work, it was sought to correlate KIM-1 with renal pathological alterations through the ELISA technique and the activation of proteins involved in the MAPK pathway such as p-ERK $\frac{1}{2}$ and other proteins such as p21, TRPV5, and DMT1 through western blot. This as a consequence of lead and gentamicin poisoning at different doses and times in a murine model.

The accumulation of gentamicin in renal cells is one of the mechanisms of nephrotoxicity. This accumulation is due to the presence of receptor proteins that allow the entry of gentamicin. This antibiotic is known to bind to a protein called megalin located in the proximal cells of the kidney. In this thesis, we will analyze the interactions and the binding mode of gentamicin to this protein, through the employment of the Spartan18, Gaussian09, I-TASSER, AutoDock, and ProSaI programs.

Besides, in this study, we assessed by methods of theoretical and computational chemistry, the electronic, structure, and physicochemical properties, using Density Functional Theory (DFT) at the M06-2X level of theory in the gas phase and solvent phase (water) with the SMD solvation model. Also, we determined the ADMET properties of gentamicin, through the PreADMET program.

Our data show that KIM-1 levels are always correlated with the expression of cytoplasmic p-ERK $\frac{1}{2}$ in the kidney. This could mean that the activation of KIM-1 and the expression of p-ERK $\frac{1}{2}$ share a common molecular mechanism in the progression of kidney damage caused by lead and gentamicin. Gentamicin can cross the blood-brain barrier and also show mutagenic properties. Another determined property of gentamicin found was a strong interaction with channel-like protein structures present in megalin, this as the result of high ligand efficiency and a high inhibition constant. Suggesting that megalin is the entrance pathway of gentamicin into proximal renal cells.

5. CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

5.1 Enfermedad renal

La enfermedad renal es un problema global de la salud que afecta aproximadamente 750 millones de personas. En muchos sentidos, las enfermedades renales y su tratamiento causan serias repercusiones en el ámbito socioeconómico. En donde las personas socialmente desfavorecidas experimentan una carga desproporcionada ante tal patología. El diagnóstico y tratamiento varía ampliamente en todo el mundo (Cueto-Manzano et al. 2005) (Crews, Bello, and Saadi 2019).

Es un problema preocupante en las poblaciones de países desarrollados debido al número creciente de casos, por los altos costos de inversión, recursos de infraestructura, detección tardía y altas tasas de morbilidad y mortalidad. El crecimiento anual de pacientes con esta enfermedad es superior a 9% y el gasto generado por los tratamientos se ha incrementado un 14% por ese solo hecho (Becerra 2004).

La enfermedad renal crónica puede ser causada por factores de contaminación como: insecticidas, metales pesados, el uso de antibióticos como la gentamicina y otros fármacos. Algunas patologías que afectan al riñón de forma crónica e irreversible son: la diabetes mellitus y la hipertensión arterial (Méndez-Durán et al. 2010).

Para el año 2010 en México se estimaba una incidencia de pacientes con la enfermedad renal crónica de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia de 1.142, que es la proporción de personas que padecen enfermedades renales con respecto al total de la población en estudio. Se presenta con alrededor de 52,000 pacientes en terapias sustitutivas, de los cuales el 80% de los pacientes son atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)(Méndez-Durán et al. 2010) (Pecoits-Filho et al. 2007) (Cueto-Manzano and Rojas-Campos 2007) (Pecoits-Filho et al. 2007). Entre los años 1990 a 2010 la mortalidad por esta causa aumentó en un 393% y pasó de la vigésima posición a la décima posición entre las causas de muerte en adultos. México ha registrado altas tasas de insuficiencia renal crónica, alrededor de 400 casos por cada millón de habitantes (Sabath and Robles-Osorio 2012).

Es poco probable que esta alta mortalidad y los costos asociados se reduzcan hasta que se tenga una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante la lesión de células renales y reparación.

La Enfermedad Renal Aguda (AKI) es la primera etapa de la enfermedad renal crónica, se define como un aumento de la creatinina sérica mayor de 26.5 $\mu\text{mol/L}$ dentro de las 48 horas o un aumento de 1.5 veces al valor basal dentro de los 7 días u oliguria durante las 6 horas (Teo and Endre 2017). Sin embargo, la detección del biomarcador de la creatinina solo señalará un daño renal cuando éste ya se encuentra en un estado avanzado. Además, se ve alterada por la edad, sexo, dieta, musculatura

y medicación que presente el paciente. Cuando la enfermedad renal aguda no es detectada en una etapa temprana, puede desarrollarse la Enfermedad Renal Crónica (ERC),

5.2 Nefrotóxicos

5.2.1 Metales pesados: Plomo

Los metales pesados como el cadmio, mercurio, arsénico y plomo se encuentran en diversas formas en el medio ambiente. Los seres humanos y los animales se intoxican por el consumo de agua y alimentos contaminados, desechos de minería, reciclaje de baterías y plásticos (Rana, Tangpong, and Rahman 2018).

El plomo (Pb) por sus diferentes propiedades como bajo punto de fusión y resistencia a la corrosión se ha encontrado o incorporado en diferentes productos, incluyendo pinturas, cosméticos, combustibles, etc. De esta manera, la contaminación por plomo se ha convertido en un problema global que vemos en la industria minera, en la producción de cemento, de baterías, cerámicas vidriadas y pinturas. A pesar de la implementación de regulaciones sobre el uso de este metal, la exposición y el peligro entre la población que vive muy cerca de las zonas industriales sigue siendo muy alto.

El plomo puede ser fácilmente absorbido por el intestino, el pulmón y con menos frecuencia a través de la piel, es fácilmente transportada por la albumina y casi el 90% del plomo logra unirse a las proteínas de los eritrocitos, lo que causa una disminución en la síntesis de hemoglobina. El plomo se acumula en diferentes tejidos y órganos, incluido el hígado y el riñón, donde exhibe daño oxidativo en células, tejidos y organelos celulares como la mitocondria en donde desacopla la cadena respiratoria. Rana y colaboradores reportan diversos mecanismos de toxicidad del plomo (Figura 1), uno de ellos es que el Pb^{+2} compite con Ca^{+2} de las mitocondrias; iniciando la apertura del poro de transición mitocondrial lo que genera especies reactivas y estrés oxidativo, incluido el metabolismo alterado de los lípidos. Entre las células, los túbulos proximales son más susceptibles al daño celular inducido por Pb lo que las hacen llegar a apoptosis (Rana, Tangpong, and Rahman 2018). Además, también desplaza los iones metálicos esenciales como Zn^{+2} y Ca^{+2} en las proteínas e inhibe los factores de transcripción de los genes de zinc.

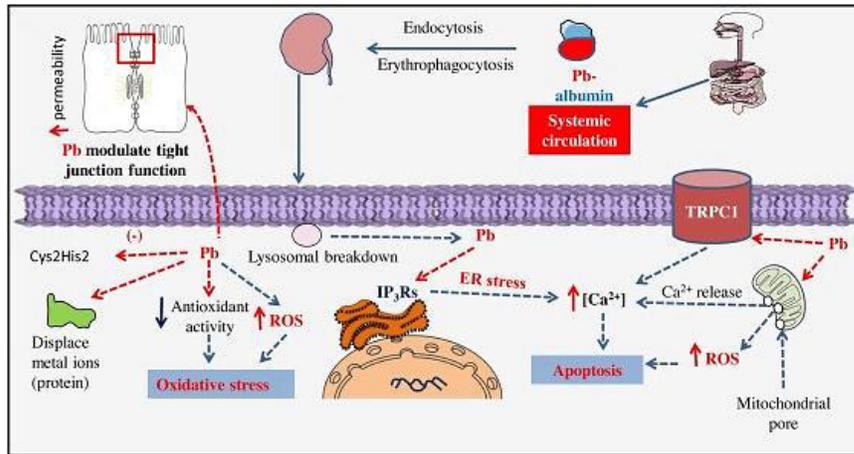


Figura 1. Mecanismos de toxicidad del plomo (tomado de Rana, Tangpong, and Rahman 2018).

El envenenamiento por plomo conocido como saturnismo es un trastorno importante que afecta a los individuos a través de la exposición aguda, subaguda y crónica en ambientes ocupacionales o naturales (El-Khishin, El-fakharany, and Abdel Hamid 2015).

El sistema nervioso central es el objetivo principal de la toxicidad del plomo. Los efectos negativos a la salud son especialmente graves en niños, ya que su sistema nervioso se encuentra en desarrollo y en alta vulnerabilidad. Además, una de las aplicaciones del plomo es brindar estabilidad, brillo y flexibilidad en ciertos juguetes infantiles, al ser añadido al material con el que se producen, cloruro de polivinilo (PVC). Por lo que, los niños más pequeños son más vulnerables a la toxicidad del plomo por sus hábitos de morder o masticar juguetes. En adultos, el metal induce activación procoagulante en los eritrocitos (Shin et al. 2007), efectos neurotóxicos (White et al. 2007) y nefrotoxicidad (Weaver et al. 2005). Se ha estimado que la exposición al plomo representó 853 mil muertes en 2013 debido a los efectos a largo plazo en la salud, presentando una mayor carga en los países de bajos y medianos ingresos (Forouzanfar et al. 2015).

Como tratamiento de la intoxicación por plomo se utilizan más comúnmente la terapia de quelación con dimercaprol o ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y versenato de calcio disódico (CaNa₂EDTA). Además, los antioxidantes y nutrientes como la vitamina C, E, B6, betacaroteno, zinc y selenio son efectivos para reducir la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo con el aumento del antioxidante endógeno y disminuyen la carga corporal de Pb al aumentar la excreción urinaria de Pb. Además, el zinc, selenio, hierro, calcio también reducen la deposición de Pb al alterar la absorción o producir quelatos con Pb y mejorar el sistema de defensa antioxidante endógeno (Rana, Tangpong, and Rahman 2018).

El diagnóstico temprano del daño renal inducido por plomo tiene una importancia crítica para el pronóstico de los pacientes. Los estudios tradicionales han sido ineficientes por su naturaleza tardía al revelar las alteraciones del tejido renal y presentan una pobre correlación con el daño renal inducido por plomo (H. S. Kim, Kim, and Seo 2015). Ya que determinan la funcional renal, considerando la cuantificación del nitrógeno ureico en sangre, creatinina sérica, tasa de depuración de creatinina y la proteinuria de bajo peso molecular.

5.2.2 Gentamicina

La gentamicina, antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, contiene en su estructura dos amino-azúcares unidos por un enlace glucosídico a un núcleo hexosa, al cual se le denomina anillo 2-desoxiestreptamina. Es un antibiótico fabricado por fermentación, por lo que es una mezcla de cinco componentes a los que se les denominan gentamicina C1, C1a, C2, C2a y C2b (Figura 2). Las proporciones relativas de estos componentes pueden variar ampliamente dependiendo de cómo se cultivó o aisló el antibiótico (Chu et al. 2002). Cada componente difiere únicamente en un grupo funcional. En los componentes C1 y C2b, se encuentra una diferencia de un solo grupo metilo y una orientación distinta del grupo funcional. En los componentes C2 y C2a solo varía la orientación de un grupo metilo. El componente C1a es el único que carece de un grupo metilo.

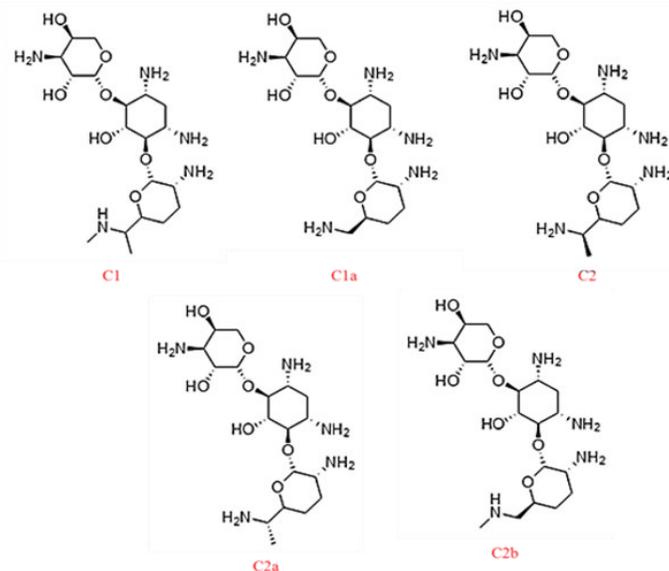


Figura 2. Estructuras de los diferentes componentes de la forma farmacéutica de la gentamicina.

Es uno de los antibióticos más comunes y aprobados en muchos países para su uso clínico en el manejo de las infecciones graves causadas por bacterias Gramnegativas aerobias. Se utiliza comúnmente en el tratamiento de sepsis en neonatos, neumonías severas e infecciones en niños desnutridos (Mandell, Bennett, and Dolint 2005) (Lazzerini and Tickell 2011).

La gentamicina inhibe la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosómica 30S, previniendo la formación de complejos de iniciación, además de inducir una lectura errónea del ARNm, lo que conduce a la producción de proteínas defectuosas, provocando la muerte bacteriana (Ozbek et al. 2009).

Sin embargo, su uso está restringido, ya que se ha estimado que hasta el 30% de los pacientes tratados con aminoglucósidos durante más de 7 días muestran algunos signos de nefrotoxicidad (Mathew 1992). Se conoce que el daño causado por la gentamicina es debido a la acumulación de este antibiótico en las células tubulares proximales. Esta acumulación es debida al receptor de la gentamicina conocido como megalina, que es responsable de la absorción de los aminoglucósidos en las células tubulares proximales renales (Akour, Kennedy, and Gerk 2015). Más adelante se hablará a detalle de esta proteína. La acumulación de la gentamicina conduce a la pérdida de la integridad del

tejido, lo que genera de manera secundaria, radicales libres y la reducción de los mecanismos de defensa antioxidante, la necrosis tubular aguda y la inflamación glomerular, lo que resulta en una disminución de la tasa de filtración glomerular y la disfunción renal (Ozbek et al. 2009).

A pesar de la introducción de nuevos antibióticos, que carecen de efectos nefrotóxicos, contra microorganismos Gramnegativos, la gentamicina todavía se usa debido a su bajo costo y la gran efectividad contra bacterias resistentes a los β -lactámicos (Edson and Terrell 1999).

La nefrotoxicidad inducida por gentamicina es una situación compleja caracterizada por un aumento de la urea en suero y la concentración de creatinina con necrosis tubular (Tan et al. 2007). Actualmente, los biomarcadores disponibles, tales como urea o creatinina séricas, no son muy sensibles (Loeb 1998). En consecuencia, ha habido un interés continuo en el desarrollo de nuevos biomarcadores tempranos de daño renal (Taylor et al. 1997).

Debido a esto, se han descubierto y validado varios biomarcadores de lesiones renales para mejorar una detección temprana, el diagnóstico diferencial y el pronóstico de AKI, antes de que se desarrolle la enfermedad renal crónica.

5.3 Biomarcadores

Un biomarcador ideal de la enfermedad renal es aquel que la puede predecir y diagnosticar en una etapa temprana, identificar la ubicación, tipo y etiología de la lesión y permitir dar seguimiento a las intervenciones terapéuticas.

En el año 2007 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobaron una serie de biomarcadores renales para pruebas clínicas en orina, entre la cual se encuentra la Molécula de Lesión Renal-1 (KIM-1) (Dieterle et al. 2010).

5.3.1 Molécula de Lesión Renal-1 (KIM-1)

La KIM-1, es también conocido como Receptor Celular del Virus de la Hepatitis A (HAVCR) e Inmunoglobulina celular T y de Mucina-1 (TIM-1) (Feigelstock et al. 1998). Es una glicoproteína transmembranal de tipo 1 que aumenta su expresión cuando ocurre una lesión en las células renales del túbulo proximal (Collier and Schnellmann 2017).

La molécula de lesión renal tiene un dominio transmembranal y un dominio extracelular que es conocido como ectodominio (Figura 3). El dominio citoplasmático contiene un sitio conservador de fosforilación de tirosina, lo que indica que KIM-1 es una molécula de señalización. Además, el ectodominio de KIM-1 se puede desprender al espacio extracelular y este desprendimiento esta mediado por la activación de la Proteína Cinasa Activada por Mitógeno (MAPK) (Huo et al. 2010). El ectodominio, que es eliminado vía urinaria, es indetectable en condiciones normales pero sus niveles aumentan ante la presencia de algún tipo de lesión en el riñón.

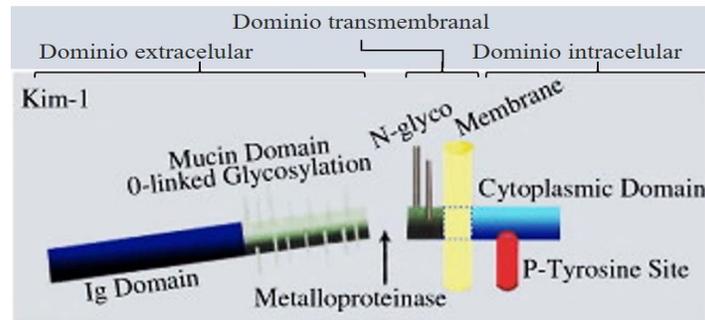


Figura 3. Estructura de KIM-1, glucoproteína de membrana tipo 1, que consta de: un dominio intracelular (sitio fosforilación de tirosina), otro transmembranal y un dominio extracelular (ectodominio) que es eliminado a través de la orina (Huo et al. 2010).

En el riñón lesionado el ARN mensajero de KIM-1 aumenta su expresión rápidamente y la proteína se genera y localiza a niveles altos en la membrana apical de las células tubulares proximales (CTP), en la región donde el túbulo está más afectado. En las CTPs de roedor se ha localizado en el segmento 3 (Ichimura et al. 2004) y en las CTP de humano se han localizado en los tres segmentos (Kramer et al. 2009). KIM-1 no está presente en el glomérulo, las células intersticiales peritubulares o las células medulares internas (Huo et al. 2010). La expresión de esta molécula en los túbulos renales media la fagocitosis de las células epiteliales de las células apoptóticas, que protege el riñón después de la lesión aguda por la regulación negativa de la inmunidad innata y la inflamación, actuando como un receptor de fosfatidilserina y confiriendo la capacidad fagocítica para limpiar los desechos celulares (Samanta and Das 2017).

El nivel urinario de KIM-1 está estrechamente relacionado con KIM-1 en tejido y se correlaciona con la gravedad del daño renal, por lo que es probable que la cuantificación de KIM-1 urinario sea un método no invasivo y sensible para la evaluación del daño renal (Huo et al. 2010).

Un reciente estudio *in vitro* mostro que la expresión de KIM-1 en las CTP induce una activación de la vía de señalización MAPK sugiriendo un potencial rol de KIM-1 en el proceso de reparación de las CTP. Otro estudio sugiere que la inhibición farmacológica de ERK reduce la expresión de KIM-1.

El conocer los mecanismos y las vías moleculares involucradas en el daño renal, puede permitir mejorar el tratamiento de AKI y CKD en la transición del pronóstico de biomarcadores.

5.4 Vía MAPK

Las proteínas cinasas son necesarias para el transporte y buen funcionamiento de varias biomoléculas dentro de la célula eucariota que están involucradas en la proliferación celular, la diferenciación, transformación celular y la apoptosis (Liang and Yang 2019).

Estas cinasas son reguladas bajo la ruta de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK), que está compuesta por múltiples proteínas que constituyen una cascada compleja. Cada eje de señalización MAPK comprende al menos tres componentes: MAPK cinasa-cinasa (MAP3K),

MAPK cinasa (MAP2K) y una MAPK. Las MAP3K fosforilan y activan los MAP2K, que a su vez fosforilan y activan las MAPK (Figura 4). Las MAPK activadas fosforilan diversas proteínas sustratos, incluidos factores de transcripción como Elk-1, ATF2, c-Jun, etc. (E. K. Kim and Choi 2010).

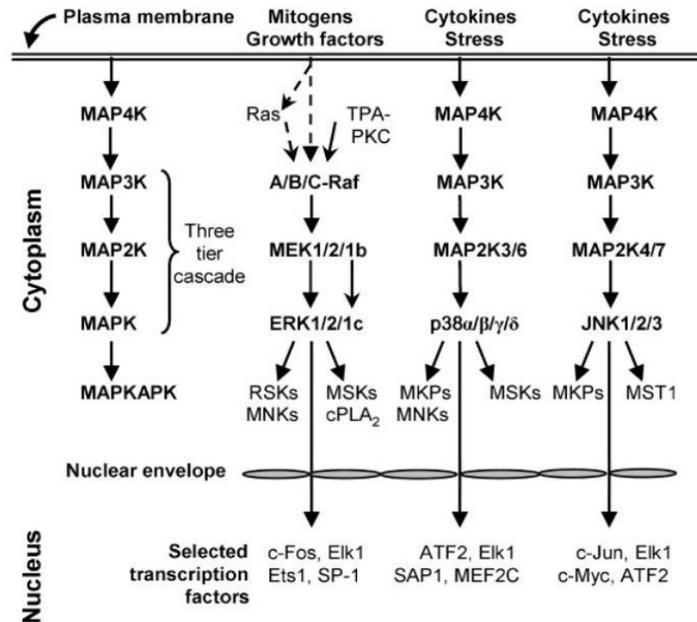


Figura 4. Ruta de las MAPK (Roskoski 2012).

Uno de los diversos factores que activan a las vías MAPK son los mitógenos, los cuales estimulan la división celular. La ruta de señal RAF-MEK $\frac{1}{2}$ y ERK $\frac{1}{2}$ y tiene un importante rol para reprimir o estimular la expresión génica. ERK $\frac{1}{2}$ es activado por MEK $\frac{1}{2}$, que es activado por Raf. Raf es activado por las Ras GTPasa, cuya activación es inducida por mitógenos y factores de crecimiento. De esta manera, ERK $\frac{1}{2}$ puede promover una serie de respuestas celulares como la interrupción del ciclo celular y la senescencia celular irreversible (Meloche and Pouyssegur 2007).

Recientemente, se ha demostrado que la señal ERK $\frac{1}{2}$ se localiza dentro y fuera del núcleo celular (Cook et al. 2017). Esto para controlar la función mitocondrial, el metabolismo y la supervivencia celular, de esta manera, la vía ERK $\frac{1}{2}$ es central para la regulación celular (Buscà, Pouyssegur, and Lenormand 2016).

De acuerdo con los roles críticos de las cinasas en los procesos celulares, las vías de señalización de MAPK se han implicado en la patogénesis de muchas enfermedades humanas como enfermedades neurodegenerativas (E. K. Kim and Choi 2010), reproductivas (Almog and Naor 2008) y renales (Cuarental et al. 2019). Estudios recientes han demostrado que las proteínas de la vía MAPK están involucradas en la nefrotoxicidad causada por gentamicina (Ozbek et al. 2009; Volpini et al. 2006).

5.4.1 p-ERK 1/2

Las Cinasas Reguladas por Señal Extracelular (ERK) son miembros de la familia más grande de proteínas cinasas activadas por mitógeno. ERK 1 y ERK 2 son 84% idénticos y comparten un amplio rango de funciones en común, por esa razón se les denomina ERK 1/2 (Roskoski 2012). Entre las funciones que desempeñan está la modulación del ciclo celular, proliferación, citocinesis, transcripción, diferenciación, senescencia, muerte celular, migración, formación de unión GAP, redes de actina y microtúbulos y adhesión celular (Ramos 2008). Existe una amplia gama de patologías generadas por la pérdida de la función o falla de ERK 1/2, tales como: cáncer, diabetes, infección viral y enfermedades cardiovasculares.

La activación de ERK en citoplasma y núcleo es estimulada por la unión de factores de crecimiento extracelulares a la membrana celular. Esta activación a los receptores membranales genera una fosforilación en las colas citoplasmáticas del receptor de tirosina, lo que conduce al agrupamiento de Grb-2, que se une al factor de intercambio de guanina SOS (Figura 5). Como segundo paso, se promueve la interacción con la GTPasa-Ras y da como resultado la carga de GTP y la activación de Ras. Finalmente se da el reclutamiento secuencial y activación de Raf, para fosforilar y activar a MEK. Tras la activación, MEK fosforila ERK en los residuos de treonina y tirosina. ERK fosforilado (p-ERK 1/2), se libera de MEK y puede dimerizarse y translocarse en el núcleo, en donde podrá fosforilar factores de transcripción. La exportación de p-ERK mediada por MEK proporciona un mecanismo por el cual ERK inactivo puede volver a asociarse con MEK y volver al citoplasma para su futura activación (Ramos 2008).

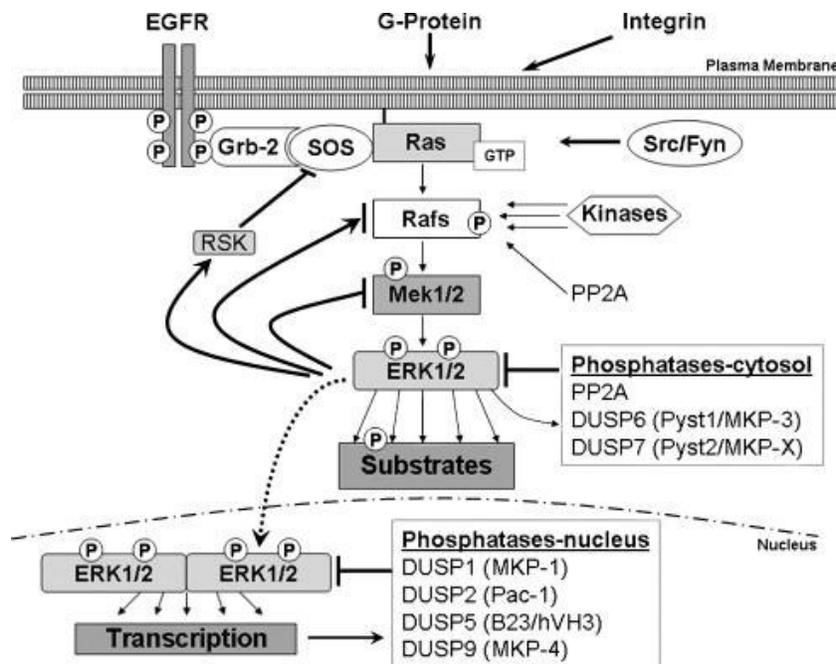


Figura 5. Activación de la vía ERK MAP cinasa por el receptor EGF (Ramos 2008).

La activación de ERK $\frac{1}{2}$ en la membrana plasmática regula negativamente la comunicación de unión GAP (Proteínas activadoras de la GTPasa) (Warn-Cramer et al. 1996), que permite el intercambio citoplasmático directo de iones y metabolitos de bajo peso molecular entre las células adyacentes, lo que es esencial para la propagación de señales eléctricas y la coordinación de la señalización celular mediante la transferencia de segundos mensajeros (Nielsen et al. 2013). En el núcleo, ERK puede activar varios factores de transcripción como ELK-1, c-Fos y cinasas como MSK-1 (Ramos 2008). Claramente, la localización de ERK es un componente importante para controlar su actividad.

p-ERK $\frac{1}{2}$ es una proteína esencial para la correcta señalización celular y fisiológica, algún defecto en ésta conlleva una serie de patologías significativas, es por ello que aproximadamente un tercio de la investigación para el descubrimiento de fármacos es realizada por empresas farmacéuticas comerciales que se dirigen hacia algunas de las proteínas cinasas, otra fracción significativa de la investigación académica está dirigida hacia la comprensión de la bioquímica, biología molecular y la fisiología de las vías de señalización de las proteínas cinasas (Roskoski 2012).

Además de estudiar las vías MAPK en diversas patologías, es importante considerar otras rutas para poder tener un panorama más completo de mecanismos por los cuales se generan lesiones renales. Estas rutas contienen proteínas claves como DMT1, TRPV5 y p21 que indican el cómo se transportan diversas sustancias en las células.

5.5 Proteínas analizadas en este trabajo.

Además de analizar la activación de ERK y su localización celular, en nuestro grupo de trabajo hemos evaluado los cambios en la expresión de 2 proteínas transportadoras de metales y de la proteína p21, un inhibidor del ciclo celular. Con la finalidad de comparar la acción de la gentamicina y el plomo sobre estas proteínas.

5.5.1 DMT1

La estructura del Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1) consta de 12 dominios transmembranales (Figura 6). La localización predominante de DMT1 es en el segmento S3 del tejido renal y su función es la reabsorción de hierro hacia la sangre. El hierro es requerido para una amplia variedad de procesos metabólicos como: transporte y almacenamiento de oxígeno, transporte de electrones y el metabolismo de energía, funciones pro-oxidantes y síntesis de ADN (Kayaalti, Akyüzlü, and Söylemezoğlu 2015). Sin embargo, un exceso de la concentración de hierro puede ser potencialmente tóxico, ya que la célula generaría radicales libres que causarían estrés oxidativo y daño celular. DMT1 además del hierro, puede transportar zinc, cobre, manganeso y cobalto. Sin embargo, se ha demostrado que también puede transportar metales tóxicos como níquel, cadmio y plomo (Garrick and Garrick 2004). Kayaalti y colaboradores obtuvieron una correlación

estadísticamente negativa entre el hierro en la sangre y el plomo, lo que significa un aumento de plomo en sangre por selectividad diferencial (Kayaalti, Akyüzlü, and Söylemezoğlu 2015).

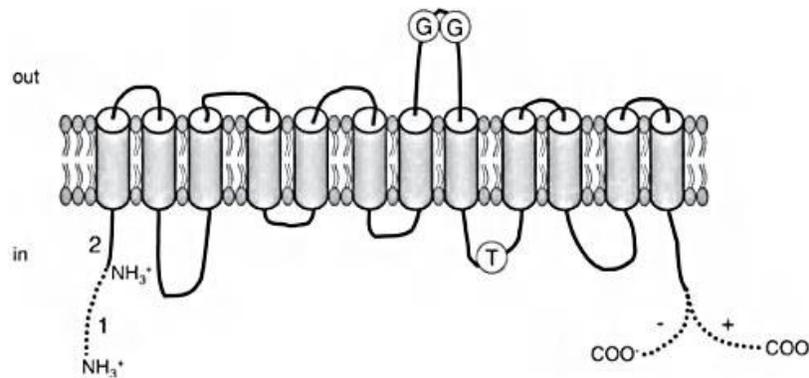


Figura 6. Estructura del Transportador de Metales Divalentes (DMT1) que consta de 12 dominios transmembranales, G representa un sitio de glicosilación y T representa un sitio de transporte (Garrick and Garrick 2004).

5.5.2 TRPV5

El canal de Potencial Receptor Transitorio Vaniloide tipo 5 (TRPV5) es un canal que conduce cationes, especialmente calcio, a través de una estructura compuesta por seis dominios transmembranales (Figura 7) con repeticiones de anquirina (ANK) (Niemeyer 2005). En ausencia de calcio, TRPV-5 conduce sodio, litio, potasio y cesio, en orden de mayor a menor afinidad (J.G. et al. 1999). TRPV-5 es expresado en el tejido renal animal, específicamente en la última parte del túbulo distal y regula la recaptación de iones de calcio (Wissenbach 2014). Esta recaptación de iones es importante para una gran variedad de funciones como: excitabilidad neuronal, contracción muscular, formación de hueso, la percepción del dolor, sensibilidad a la temperatura, regulación osmótica, mantenimiento y homeostasis de los niveles de calcio (Niemeyer 2005).

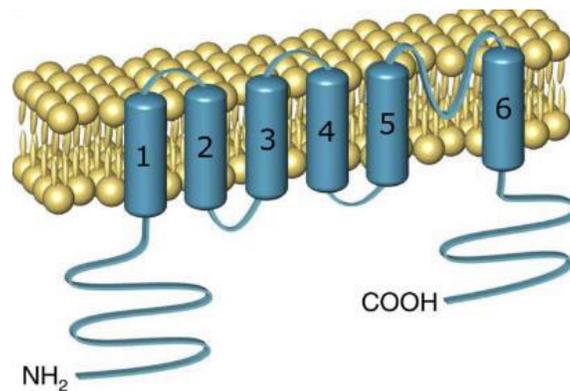


Figura 7. Estructura de TRPV5, que consiste en seis dominios transmembranales con repeticiones de anikarina (Nijenhuis, Hoenderop, and Bindels 2005).

Se ha demostrado que ante una lesión renal los niveles de TRPV5 incrementan, lo que provoca hipercalcemia (Meurer and Höcherl 2019).

5.5.3 p21

La proteína p21 es un miembro de la familia de los Inhibidores de la Cinasa Dependientes de Ciclina (CKI) que interactúa con una lista amplia de proteínas involucradas en el control de crecimiento celular, algunas de ellas son: p53, p38, JNK y proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Götz et al. 1996). Interactúa físicamente e inhibe la actividad de los complejos de ciclina de las cinasas de dependientes de cinasa (ciclina-CDK), funcionando como un regulador de la progresión del ciclo celular durante las fases G1y S (Gartel and Radhakrishnan 2005). Además, p21 interactúa de manera dependiente o independiente con p53 en una variedad de rutas para regular la senescencia celular (Georgakilas, Martin, and Bonner 2017). También se ha demostrado que p21 se expresa ante la presencia de varios agentes genotóxicos ambientales, como arsénico, mercurio, plomo, asbesto, pesticidas y toxinas biológicas (Orzáez and Walker 2016).

5.6 Estudio de las interacciones entre los nefrotóxicos y su receptor biológico.

Se ha propuesto que existe un mecanismo común en el daño renal agudo iniciado en células proximales tubulares. Tanto la gentamicina como el plomo dañan estas células. Se piensa que la activación de la vía MAPK está implicada en el daño renal agudo en estas células. Otros mecanismos se dan mediante la generación de radicales libres, la reducción de los mecanismos de defensa antioxidante y necrosis tubular, lo que conlleva a una pérdida de la función renal. Sin embargo, los mecanismos de acción de ambos tóxicos aún no se han determinado por completo.

A pesar de que se han propuesto diversas alternativas para aminorar los efectos nefrotóxicos, como el uso de antioxidantes y quelantes, aun no se ha alcanzado la efectividad deseada.

En el caso del plomo, se han propuesto el uso de antioxidantes como la melatonina, para contrarrestar los efectos causados por los radicales libres (Soto-Arredondo et al. 2018). También, en nuestro grupo se han aplicado metodologías computacionales de acoplamiento molecular entre el metal y diversas proteínas involucradas en el transporte de metales esenciales como DMT1 y ZIP8, con la finalidad de conocer si existe un posible mecanismo de eliminación para el proceso de desintoxicación (Villaseñor-Granados et al. 2019).

Para la gentamicina, se desconoce si en particular, alguno de los componentes de la formulación farmacéutica es el responsable del efecto indeseado y si algún otro es el responsable de la acción bactericida tan eficaz. Para poder conocer esto, es importante el estudio a fondo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, que se ha realizado en este trabajo con técnicas teóricas-computacionales en donde se obtienen los descriptores de la reactividad y las propiedades farmacocinéticas como la Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad (ADMET). Además, hemos realizado el estudio de la interacción que tendrá la gentamicina con su receptor biológico, que es la megalina, de la que aún no se ha determinado su estructura tridimensional cristalográfica, debido al gran tamaño que presenta (600 kDa). La megalina tiene un dominio

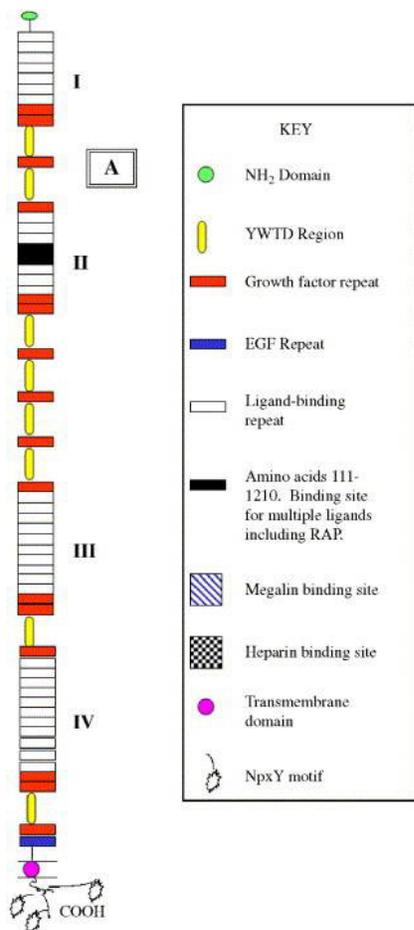


Figura 8. Representación de la estructura de la megalina (tomado de Fisher and Howie 2006)

intracelular que contiene múltiples secuencias y motivos de unión que interactúan con proteínas intracelulares. Por lo que se ha estudiado como un receptor potencial para regular cascadas de señalización intracelulares (Zou et al. 2004). Este hallazgo, junto con su papel como receptor de la gentamicina, sugiere que la activación de la vía MAPK inducida por gentamicina ocurre a través de la megalina. Sin embargo, este mecanismo aún no está establecido.

5.7 Estudio Teórico (Preparación de la proteína de estudio)

5.7.1 Receptor de la gentamicina: megalina

Los receptores de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) son glicoproteínas transmembranales involucradas en la endocitosis caracterizados por tener dominios extracelulares grandes, dominios citoplasmáticos cortos y los dominios centrales que lo anclan a la membrana plasmática (Hussain, Strickland, and Bakillah 1999). Los dominios centrales se caracterizan por la presencia de repeticiones ricas en cisteína y dominios YWTD que forman pliegues de láminas β -plegadas (Herz and Bock 2002). La gran región extracelular contiene dominios tipo EGF, LDLR tipo A y B y dominios YMTD. La región citoplasmática contiene solo motivos NPxY (Springer 1998).

La megalina es una glicoproteína transmembranal (Figura 8), que fue inicialmente llamada gp330, también conocida como lipoproteína de baja densidad y proteína relacionada al receptor 2 (LRP2). En 1993, el gen había sido secuenciado en ratas y humanos (Hjälml et al. 1996). Es una proteína integral de membrana de gran peso molecular, de 600 kDa, que se encuentra en muchos epitelios de absorción como en el intestino y el riñón, además se encuentra en menor cantidad, en otros tejidos como en el cuero ciliar del ojo, sistema reproductor masculino, útero y la vesícula biliar (Fisher and Howie 2006).

Ha sido reconocida como un receptor endocítico de un largo espectro de ligandos. Como consecuencia, la megalina regula la homeostasis de muchas moléculas y efectos fisiológicos múltiples, además de funciones fisiopatológicas (Kukida et al. 2020).

Está implicada en un importante rol de funciones renales como en la endocitosis de muchas sustancias tales como lipoproteínas, proteínas, y drogas. Las funciones de la megalina se han estudiado con mayor detalle en el túbulo proximal renal, donde se asocia con el intercambiador de

sodio-potasio. Además, es necesaria para la reabsorción de retinol, vitamina D, vitamina B₁₂, calcio y la captación de angiotensina II (Fisher and Howie 2006).

5.7.1.1 Características moleculares

La secuencia de aminoácidos de la megalina entre el ratón y la rata es 94% idéntica y 77% idéntica entre humano y ratón y las características de los genes y sus productos se muestran en la Tabla 1. La alta conservación entre las especies de roedores, lo hace un modelo animal ideal para investigar la fisiología y la fisiopatología de la megalina.

Las mutaciones en el gen de megalina generan la pérdida de la función, y causa un raro desorden recesivo autosomal llamada síndrome de Donnai-Barrow (Kukida et al. 2020). El síndrome se caracteriza por presentar una estructura craneofacial atípica, (fontanela anterior grande, sutura metópica ancha) globos oculares agrandados y espaciados, y puente nasal deprimido (Longoni et al. 2019).

	Cromosoma	No. Exones	Longitud de transcripto (pb)	Longitud de translación (aa)	Señal del péptido (aa)	Peso molecular (kDa)
Humano	2	79	15657	4655	1-25	522
Rata	3	79	15512	4660	1-25	519
Ratón	2	79	15460	4660	1-25	519

Tabla 1. Características semejantes de la megalina en humano, rata y ratón (Kukida et al. 2020).

Se esperaría que la eliminación de la megalina disminuyera la disfunción de las células afectadas. Sin embargo, la eliminación del gen de la megalina en ratón lleva a una insuficiencia respiratoria y por ende a la muerte prematura de animal. La deficiencia de megalina en ratón conlleva malformaciones neurológicas tales como la holoprosencefalia y defectos en el tubo neural. Además de mostrar anormalidad en las aortas, truncamiento persistente de arterias, anormalidad en la arteria coronaria y defectos en el septo ventricular. La eliminación de megalina en las CTPs exhibe proteinuria, incluyendo excreción urinaria de vitamina D, retinol, α -1-microglobulina, odorante y albumina. Además de una disfunción renal avanzada tal como un desbalance de electrolitos y oliguria. Estos hallazgos proveen evidencia del papel crucial de la megalina para el pulmón, desarrollos neurales, renales y cardiovasculares. Por esta razón, la megalina es importante en la retención de muchas sustancias esenciales en las CTP. Sin embargo, también retiene muchas proteínas extrañas y sus acarreadores, además de sustancias nefrotóxicas como la gentamicina, esto se ha visto en pacientes con nefropatías diabéticas y pacientes que padecen síndrome metabólico. Un exceso de estas sustancias en las CTPs causa una disfunción renal y cambios patológicos.

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la interacción entre la megalina y la gentamicina es crucial para el entendimiento del mecanismo de toxicidad. Sin embargo, el gran peso molecular de la megalina ha impedido que su estructura tridimensional sea resuelta por medio de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y rayos X, que son las técnicas que se emplean

actualmente para poder reportar en base de datos, como el Banco de Datos de Proteínas (PDB), las estructuras terciarias, e incluso cuaternarias, de las proteínas que se han obtenido experimentalmente. A causa de esta problemática, se recurren a técnicas computacionales, que reducen los costos económicos y de tiempo, para poder obtener estructuras tridimensionales de las proteínas. Estas técnicas utilizan los dominios conservados que posee la secuencia de aminoácidos de la proteína y a partir de ahí se generan modelos homólogos tridimensionales que representan a la proteína de interés, en este caso de la megalina.

5.7.1.2 Dominios de la megalina

Los dominios de las proteínas se identifican como unidades recurrentes (secuencias o estructuras) y pueden considerarse como unidades particulares en una proteína o familia de proteínas.

En la evolución molecular, dichos dominios pueden haberse utilizado como bloques de construcción, y pueden haberse recombinado en diferentes disposiciones para modular la función de la proteína. Los dominios que se mantienen como unidades recurrentes a lo largo de la evolución molecular, se definen como dominios conservados. Los dominios conservados contienen patrones o motivos de secuencia conservados, que permiten su detección en secuencias de polipéptidos.

Los modelos de dominios conservados se basan en alineamientos de secuencias múltiples de proteínas relacionadas que abarcan una variedad de organismos para revelar regiones de secuencia que contienen los mismos o similares patrones de aminoácidos. Los biólogos computacionales de todo el mundo han compilado colecciones de tales alineamientos que representen dominios conservados. La Base de datos de Dominios Conservados (CDD) (Lu et al. 2020) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) incluye una gran lista de los dominios que se han identificado como conservados en las proteínas identificadas hasta la fecha, así como datos importados de fuentes externas, con el objetivo de recabar la mayor información posible. Estas bases de datos de donde se eligen los dominios conservados difieren en su alcance de cobertura y el método por el cual desarrollan sus modelos. Por lo tanto, cada base de datos de origen puede tener su propio modelo para un dominio conservado dado, además de que algunos dominios solo se encontraran en esa base de datos. En la Tabla 2 se muestran algunas bases de datos con sus características y aplicaciones en el estudio computacional de proteínas.

Nombre	Características
CD (Dominios Conservados de NCBI)	Los dominios seleccionados por NCBI utilizan información de estructura 3D para definir explícitamente límites de dominio, por medio del alineamiento de bloques y enmendar detalles de alineación (Marchler-Bauer and Bryant 2004).
SMART (Herramienta de Búsqueda de Arquitectura Modular Simple)	Es una herramienta web para la identificación y anotación de dominios de proteínas y proporciona una plataforma para el estudio comparativo de arquitectura de dominios complejos en genes y proteínas (Letunic, Doerks, and Bork 2015).

CL (Registros de clúster de superfamilia)	Pueden contener modelos de dominio de origen de una o más bases de datos (Pruitt K, Brown G, Tatusova T 2002).
Pfam (Familias de proteínas)	Es una colección de alineamientos de secuencias múltiples y modelos ocultos de Markov que cubren muchos dominios y familias de proteínas comunes (El-Gebali et al. 2019).

Tabla 2. Características de las bases de datos que se encuentran disponibles en NCBI

El objetivo del dominio conservado de NCBI es proporcionar a los usuarios de la base de datos información sobre como los patrones de conservación y divergencia de residuos en una familia se relacionan con las propiedades funcionales y proporcionar enlaces útiles e información más detallada que pueda ayudar a comprender esa secuencia/estructura/relaciones de funciones.

Las funciones se agregan si parecen aplicables a la familia descrita en el alcance del dominio conservado y si hay evidencia que vincule la función con un conjunto de direcciones en la alineación.

El análisis de la estructura tridimensional en combinación con el análisis de las secuencias espacialmente conservadas ha permitido determinar relaciones evolutivas que no es posible detectar por otros medios.

5.7.2 Modelado homologo para la obtención de estructuras aproximadas

El modelado homologo es la única forma de obtener información estructural si las técnicas experimentales fallan o tienen limitaciones para resolver la estructura de una proteína. La razón es su alto peso molecular, como la megalina, el cual interfiere con las técnicas actuales y su estructura no se puede establecer por la alta complejidad que conlleva.

El modelado por homología se basa en la conservación evolutiva que poseen las proteínas, esta conservación evolutiva marca una tendencia a tener estructuras tridimensionales semejantes. Además, las características estructurales de las proteínas a menudo permanecen preservadas mucho después de que la señal de secuencia se pierde por mutaciones, inserciones y deleciones. Por esta razón, la estructura terciaria de las proteínas se considera la característica más robustamente conservada de las proteínas, a pesar de que existan algunos inconvenientes a esta regla (mecanismos de inserción, eliminación, sustituciones, permutaciones y reordenamientos (Krieger, Nabuurs, and Vriend 2005), aún es válida para la mayoría absoluta de los casos.

El modelado por homología se utiliza para construir un modelo estructural 3D de una proteína objetivo sobre la base de la alineación de su secuencia de aminoácidos con una proteína relacionada de estructura conocida, que sirve como molde o plantilla. El procedimiento para el modelado consta de una serie de cuatro pasos principales: 1) Identificación de proteínas relacionadas que tienen estructuras determinadas experimentales y, por lo tanto, pueden usarse como plantillas estructurales para modelar, 2) mapear los residuos correspondientes entre la secuencia objetivo y la estructura de la plantilla, este paso es conocido como alineación de secuencia-estructura, 3) generación de un

modelo tridimensional de una proteína objetivo sobre la base de la alineación del paso anterior, y 4) estimar la calidad del modelo resultante. Si la calidad del modelo generado no es suficiente, se repite todo el proceso, hasta que se obtenga una calidad satisfactoria o hasta que el modelo ya no se pueda mejorar (Krieger, Nabuurs, and Vriend 2005) (Figura 9).

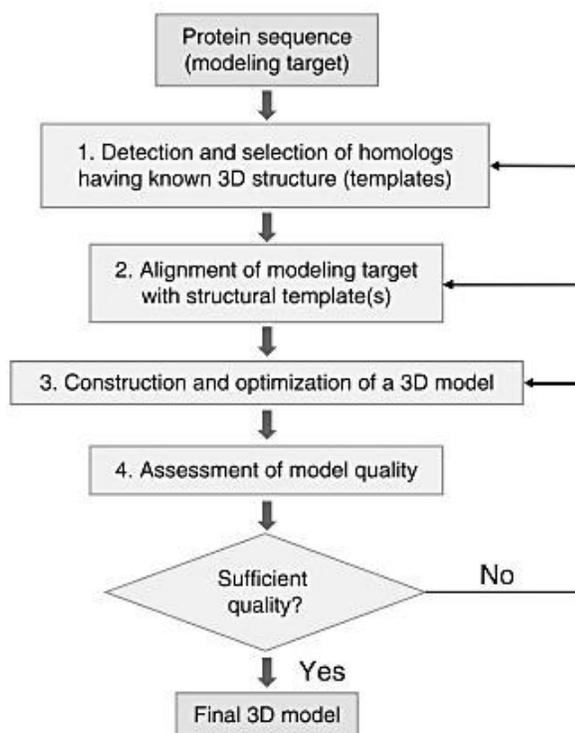


Figura 9. Procedimiento del modelado homologo para la obtención de estructuras tridimensionales de proteínas que no cuentan con una estructura tridimensional determinada experimentalmente (tomado de Krieger, Nabuurs, and Vriend 2005).

Existe un gran número de programas para llevar a cabo el método de modelado, los cuales derivan el mapeo de secuencia-estructura (alineación) combinando múltiples características de secuencia y estructura, mediante el uso de meta-enfoques. Los meta-enfoques identifican las plantillas estructurales más cercanas y alineaciones de estructura de secuencia más precisas, al combinar los resultados de diferentes algoritmos (Walker 2009). I-TASSER (Refinamiento de montaje de Roscado Interactivo) (Yang et al. 2010) es uno de los programas principales y de los más populares que modelan estructuras terciarias de las proteínas basándose en los meta-enfoques (Y. Zhang 2008).

I-TASSER cuenta con algoritmos de alineamientos perfil-perfil de secuencia, alineamientos de perfil estructural, modelos ocultos de Markov y aprendizaje automático. Con estos algoritmos se logra el reconocimiento de plegado basado en subprocesos automáticos, seguido de un reensamblado de estructuras basadas en fragmentos o dominios de la proteína mediante simulaciones de refinamiento.

Los subprocesos automáticos de I-TASSER constan de 4 pasos (Zheng et al. 2019): 1) Enhebrado de plantillas, que se refiere al proceso de identificación de proteínas, que servirán como plantillas, en la base de datos de PDB en donde se buscaran las estructuras similares a la proteína objetivo, los mejores resultados se clasifican por puntajes basados en el perfil y en la estructura, donde el puntaje de alineación se convierte en un Z-score. 2) Ensamblaje de fragmentos estructurales, en donde los fragmentos continuos de las alineaciones de subprocesos se eliminan de las estructuras de plantillas, y las regiones no alineadas se construirán mediante métodos *ab initio* de I-TASSER con conformaciones de baja energía. 3) Refinamiento del modelo, se agrupan los modelos generados con más baja energía y se refinan aún más mediante simulaciones de reensamblado con una geometría más cercana a la realidad. 4) Anotación funcional de proteínas basada en la estructura, en donde se identifican posibles sitios de unión de ligandos gracias a la geometría local y la similitud de la estructura global con otras proteínas determinadas experimentalmente.

Gracias a la metodología usada en I-TASSER, le ha permitido ser una de las plataformas más utilizados en el campo del modelado de estructuras de proteínas. En el año 2017, el número de modelos generados por I-TASSER fue de alrededor de 70 mil, lo que aumento más del 40% en comparación con las estadísticas anuales de la última década (Zheng et al. 2019).

Una vez que se han generado los modelos homólogos de la proteína, lo siguiente es evaluar la interacción que habrá entre ésta (el receptor biológico) y el fármaco de interés (ligando). Esta interacción se logra también con una técnica computacional, conocida como *docking* o acoplamiento molecular.

5.7.3 Acoplamiento molecular (*Docking*)

El acoplamiento molecular o *Docking*, es el método computacional utilizado para predecir la mejor orientación de ajuste de un ligando (nueva identidad química o fármaco) que se une a un receptor particular de interés (Gupta, Sharma, and Kumar 2018). En cuestión de tiempo y dinero, el acoplamiento molecular es ampliamente utilizado para predecir la orientación del fármaco en su receptor biológico cuando se unan entre sí para formar un complejo estable. De esta manera se logra una mejor comprensión sobre la complejidad en los sistemas vivos.

El acoplamiento molecular es principalmente de dos tipos: Acoplamiento rígido y acoplamiento flexible. En el primero, el fármaco y la proteína de interés se mantienen fijos, para que los ángulos o longitudes de enlace no se muevan. Este tipo de acoplamiento es muy rápido, pero de menor eficacia porque no se consideran los grados de libertad de los ligandos. En el caso del acoplamiento molecular flexible, se permiten cambios conformacionales, esto les permite tener una buena eficacia y son los más utilizados en la actualidad. Sin embargo, requieren de un mayor costo en cuestión del rendimiento computacional (Gupta, Sharma, and Kumar 2018).

Con la ayuda de estas técnicas, la cantidad de moléculas que se pueden analizar es enorme a comparación de si se realizara en modelos animales. Por esta razón, la mayoría de las compañías farmacéuticas cuentan con un departamento dirigido a este estudio, en donde muchos fármacos han sido diseñados y seleccionados para una fase posterior de desarrollo (Y. C. Chen 2015). En los últimos años el número de publicaciones sobre *docking* ha aumentado considerablemente (Figura 10).

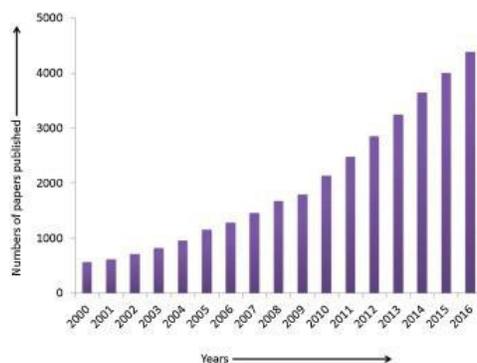


Figura 10. Número de publicaciones sobre acoplamiento molecular del año 2000 al 2016 (Gupta, Sharma, and Kumar 2018).

La selección de la proteína de interés desempeña un papel de suma importancia en los resultados de *docking*. La estructura tridimensional de un receptor particular se puede encontrar en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Estas estructuras tridimensionales han sido resueltas gracias a técnicas como cristalografía de rayos X y espectroscopía de RMN (Gupta, Sharma, and Kumar 2018). Si la estructura de la proteína no está disponible en PDB, entonces se tiene que recurrir a la técnica de modelado por homología (Figura 11), que se describió anteriormente. En el caso del ligando (fármaco) se debe de llevar a cabo una minimización de la energía de su estructura y, como alternativa, la evaluación de sus propiedades farmacocinéticas. Una vez teniendo el ligando y la proteína de interés preparados, se puede llevar a cabo el acoplamiento.

Por lo tanto, se necesita de una serie de pasos para llevar a cabo de manera correcta y eficaz el acoplamiento molecular.

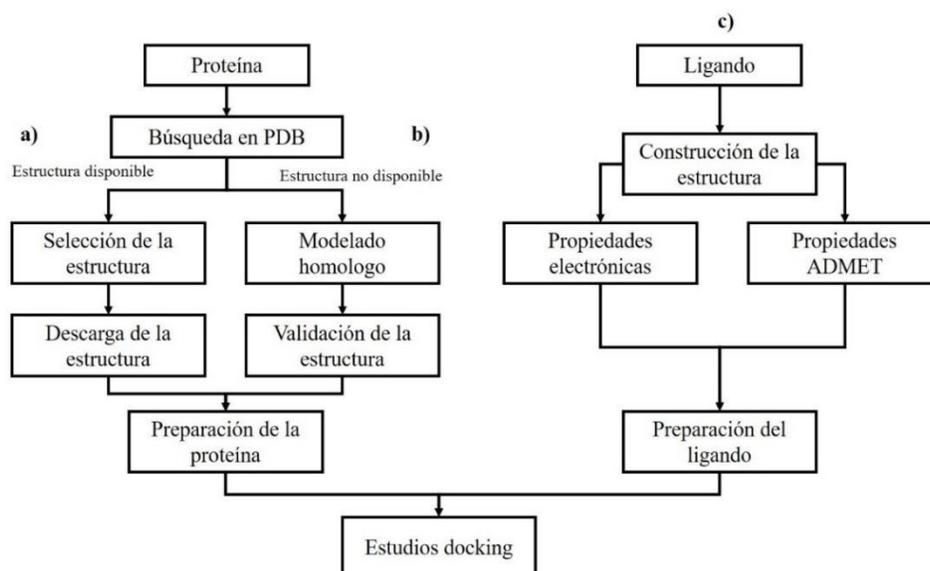


Figura 11. Procedimiento general para el estudio de las interacciones entre un blanco biológico y un ligando en el acoplamiento molecular (*docking*).

Existen diversos softwares para llevar a cabo el acoplamiento molecular (Gupta, Sharma, and Kumar 2018) que incorporan diferentes compensaciones en representación molecular, evaluación de la energía y visualización conformacional, todo esto para proporcionar predicciones con un esfuerzo computacional razonable. De los más utilizados se encuentra la herramienta de AutoDockTools, que combina un campo de fuerza de energía libre empírica con un algoritmo genético Lamarckiano, proporcionando una predicción rápida de conformaciones moleculares con energías libres de interacción predichas (Morris et al. 2009).

AutoDock se ha utilizado desde el año 1990 y desde entonces ha demostrado ser una herramienta eficaz, capaz de predecir rápida y exactamente las conformaciones y energías de unión de ligandos con sus objetivos moleculares (Goodsell, Morris, and Olson 1996) (Ingersoll, Bronstein, and Bonventre 1976). Utiliza un método basado en un algoritmo genético Lamarckiano, en donde se crea una población de conformaciones de prueba y luego, en generaciones sucesivas, van cambiando. En estos cambios, se intercambian parámetros conformacionales y compiten de manera análoga, seleccionando solo a las conformaciones que dan la energía de unión más baja. Esto es una característica que permite que las conformaciones individuales busquen en su espacio una conformacional local, para encontrar mínimos locales y luego transmitir esta información a las generaciones posteriores (Morris et al. 2009).

Una vez que se establece la conformación de mínima energía se pueden obtener las interacciones que existen entre el ligando y la macromolécula, generalmente esta interacción se da entre las cavidades que posee la macromolécula (Figura 12).

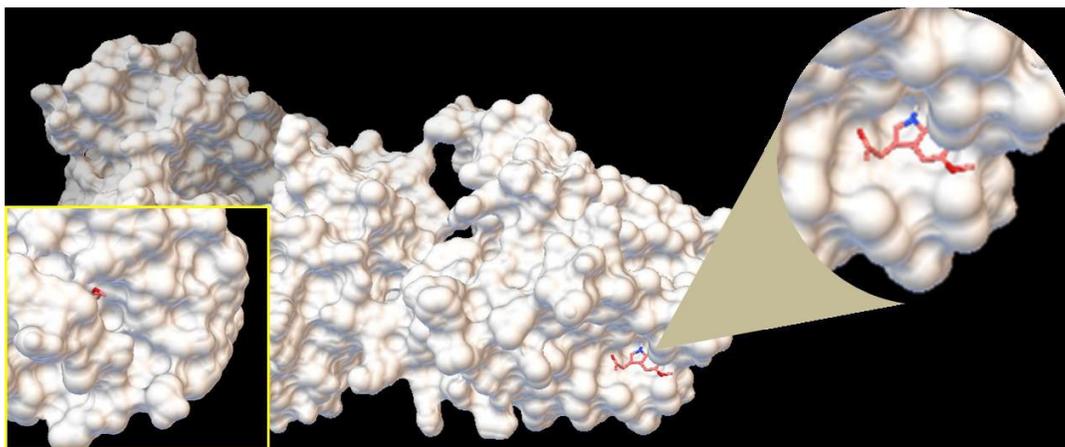


Figura 12. En la imagen se muestra, como ejemplo, la interacción del fármaco de la melatonina con el β -adrenoceptor (código en PDB: 2R4R).

Existen diversos tipos de interacciones entre los aminoácidos de la proteína y los átomos del ligando, éstas pueden ser iónicas, enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, etc. El enlace de hidrogeno está formado por un átomo de hidrogeno unido a un átomo de alta electronegatividad como el oxígeno o nitrógeno. Las interacciones iónicas implican la atracción de iones o moléculas con carga opuesta. Las fuerzas de Van der Waals son fuerzas repulsivas o atractivas débiles entre las entidades moleculares diferentes a los enlaces iónicos y enlaces covalentes. Las interacciones hidrofóbicas, son significativas para la estructura espacial y la actividad biológica de las proteínas (Liu et al. 2018).

El acoplamiento molecular analiza las propiedades físicas a un nivel molecular, se ha utilizado ampliamente en muchos campos de investigación, en virtud de su capacidad de predecir y

explorar interacciones y estructuras entre un fármaco y su blanco biológico, además de su bajo costo temporal y económico.

Además de estudiar el acoplamiento molecular por técnicas de bajo costo computacional como el *docking*, es importante usar métodos cuánticos de mayor precisión y poder predictivo (aunque de mucho mayor costo computacional) para analizar las propiedades ADMET y electrónicas que posee el fármaco libre (ligando) (Figura 11). Estas propiedades ayudaran a determinar cómo será el transporte del fármaco desde su ingreso al organismo hasta su eliminación, pasando por una serie de receptores biológicos, incluyendo su blanco biológico, en donde ocurrirá una transferencia electrónica. La transferencia de electrones es una propiedad cuántica que se puede estudiar gracias a la Teoría de Funcionales de la Densidad, que es una reformulación de la mecánica cuántica.

5.8 Preparación del ligando

5.8.1 Propiedades ADMET

En el ciclo racional de descubrimiento de fármacos hay una importante etapa en el análisis de las propiedades Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y de Toxicidad (ADMET) de ciertos fármacos. Más del 50% de los fármacos candidatos son rechazados por las deficiencias en sus propiedades ADMET. Para evitar esta falla en su desarrollo, se ha implementado un conjunto de estudios *in vitro* en la mayoría de las compañías farmacéuticas con el objetivo de descartar compuestos en la fase de descubrimiento que probablemente fallaran más adelante. Aunque la etapa inicial de ADMET *in vitro* reduce la probabilidad de falla en la etapa de desarrollo, aun requiere mucho tiempo y recursos. Por lo tanto, se recurre a los cálculos computacionales (*in silico*) utilizando plataformas como PreADMET (S. K. Lee and Chang 2004), que es un software online que se ha desarrollado en respuesta a la necesidad de una predicción computacional a partir de datos de fármacos que presentan similitudes (S. Lee et al. 2002).

El éxito de un medicamento a través del cuerpo se mide en las dimensiones de ADMET (Figura 13) (Chandrasekaran et al. 2018). El medicamento oral ideal se absorberá rápida y completamente del canal alimenticio y encontrará su camino directo y específicamente a su sitio de acción. No se unirá ni interactuará con los receptores relacionados (similares) y no se unirá de forma inespecífica a las proteínas séricas en circulación. El compuesto ideal puede ser un sustrato para las enzimas hepáticas y los transportadores que descomponen o eliminan compuestos extraños del cuerpo, pero de una manera completamente predecible, de tal forma que la actividad se inhibe. En consecuencia, no debería haber riesgo de que la descomposición de este fármaco de lugar a metabolitos tóxicos y todas las posibilidades de que el compuesto tenga una vida media adecuada, pasando gradualmente a través de los riñones sin dañarlos. La toxicología es la ciencia que se asegura que una molécula no cause daño, independientemente de que sea útil. Si bien es poco probable que un medicamento que causa gran daño sea un buen medicamento, la innovación en toxicología tiende a verse limitada por la necesidad de cumplir con los requisitos reglamentarios.

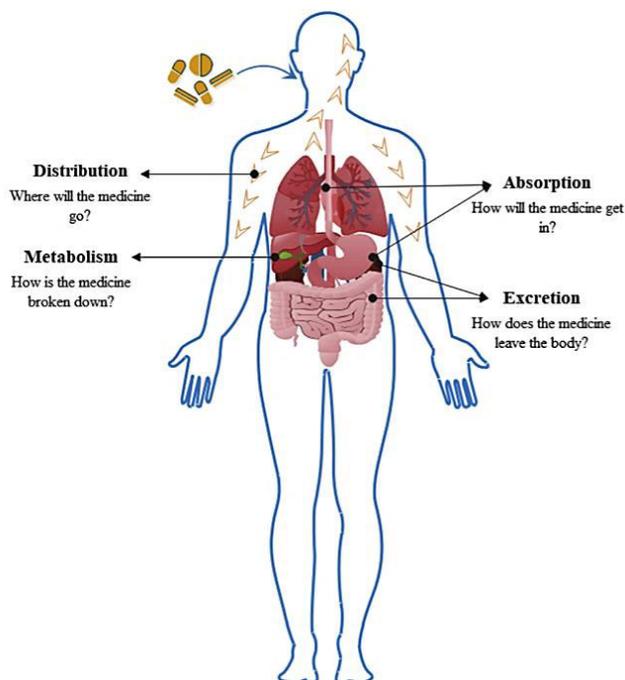


Figura 13. Propiedades farmacocinéticas de absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco administrado oralmente (tomado de Chandrasekaran et al. 2018).

Alrededor de la mitad de todos los medicamentos en desarrollo clínico no se han comercializado debido a las ineficientes propiedades ADMET. Existe un creciente interés en la predicción temprana de las propiedades ADMET, con el fin de aumentar la tasa de éxito de los compuestos que se diseñan y alcanzan el desarrollo. La ventaja de determinarlas computacionalmente es que se pueden obtener sus valores aún antes de haber sintetizado el fármaco, y así decidir *a priori* si vale la pena culminar la síntesis y estudios posteriores o no.

A continuación, se presentan las características estándar de algunas propiedades de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y propiedades de toxicidad de los fármacos que el programa PreADMET ofrece.

5.8.1.1 Unión a proteínas plasmáticas

De manera general, un fármaco no unido está disponible para la difusión o transporte a través de las membranas celulares, y también para la interacción con un objetivo farmacológico. Por ello, un cierto grado de unión a proteínas plasmáticas de un fármaco influye no solo en la acción del fármaco sino también en su disposición y eficacia.

Aunque existen algunas diferencias en los valores experimentales de los compuestos o sus metabolitos podemos clasificarlos en categorías generales, como a continuación (Tabla 3).

Clasificación	Unión a proteínas plasmáticas (%PPB)
Sustancias químicas fuertemente ligadas	Más del 90%
Sustancias químicas débilmente unidas	Menos del 90%

Tabla 3. Clasificación de la propiedad de unión a proteínas plasmáticas.

5.8.1.2 Penetración de la barrera hematoencefálica

La penetración de la barrera hematoencefálica (LogBB) se define como $\text{LogBB} = \text{Logaritmo de la concentración del fármaco en el cerebro} / \text{concentración del fármaco en la sangre}$. Predecir LogBB significa predecir si los compuestos atraviesan la barrera hematoencefálica (Tabla 4). Esto es crucial en la esfera farmacéutica porque los compuestos activos del SNC deben atravesarlo y los compuestos inactivos del SNC no deben de atravesarlo para evitar efectos secundarios del SNC (Ma, Chen, and Yang 2005).

Clasificación	LogBB (log concentración cerebro/ concentración sangre)
Alta absorción al SNC	Más de 2.0
Absorción media al SNC	2.0-0.1
Baja absorción al SNC	Menos de 0.1

Tabla 4. Clasificación de la propiedad de penetración de la barrera hematoencefálica.

5.8.1.3 Permeabilidad de la piel

En los campos farmacéutico cosmético y agroquímico, es importante predecir la tasa de permeabilidad de la piel como un parámetro crucial para la administración transdérmica de medicamentos y para la evaluación de riesgos de todos los productos químicos que entran en contacto con la piel de manera accidental o por diseño. En PreADMET se pueden predecir datos *in vitro* en humanos para la permeabilidad de la piel (Singh and Singh 1993).

$$\text{LogKp} = \text{Km} * \text{D} / \text{h}$$

Donde LogKp es la permeabilidad de la piel en cm/hora

Km es el coeficiente de distribución entre el estrato corneo y el vehículo

D es el coeficiente de difusión promedio (cm^2/hora)

h es el grosor de la piel (cm)

5.8.1.4 Absorción intestinal humana

La predicción de la absorción intestinal humana de fármacos es muy importante para identificar el posible candidato a fármaco. En PreADMET se puede predecir el porcentaje de absorción intestinal humano (%HIA). Los datos de la absorción intestinal humana son la suma de biodisponibilidad y absorción evaluada a partir de la proporción de excreción o de excreción acumulada en orina, bilis y heces (Y. H. Zhao et al. 2001).

Para la predicción de HIA en PreADMET (Tabla 5), se aplica un pH 7.4 (pH fisiológico promedio), porque HIA se mide por prueba *in vivo*.

Clasificación	HIA (absorción intestinal humana) %
Compuestos mal absorbidos	0-20
Compuestos moderadamente absorbidos	20-70
Compuestos bien absorbidos	70-100

Tabla 5. Clasificación de la propiedad de absorción intestinal humana

5.8.1.5 Permeabilidad celular

Se han utilizado numerosos métodos *in vitro* en el proceso de selección de fármacos para evaluar la absorción intestinal de los fármacos candidatos. Entre ellos, las líneas celulares Caco-2 y MDCK se han recomendado como modelos para la predicción de la absorción oral del fármaco (Yamashita et al. 2000).

Las células Caco-2 se derivan del adenocarcinoma de colón humano y poseen múltiples vías de transporte de fármacos a través del epitelio intestinal. Se mide a un pH de 7.4 (Tabla 6).

Clasificación	Permeabilidad Caco-2 (nM/s)
Baja permeabilidad	Menos de 4
Permeabilidad media	4-70
Alta permeabilidad	Más de 70

Tabla 6. Clasificación de la propiedad de permeabilidad celular.

5.8.1.6 Prueba de AMES

La prueba de Ames es un método simple para probar la mutagenicidad de un compuesto, que sugiere el Dr. Ames (Ames, Lee, and Durston 1973). Utiliza varias cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* (TA) que transportan mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina, por lo que una bacteria no podrá desarrollarse en un medio rico de histidina (Tabla 7). La variable que se prueba es la capacidad del mutágeno para causar una reversión al crecimiento en un medio libre de histidina. (Yamashita et al. 2000).

PreADMET predice la toxicidad para las cepas TA98, TA100 y TA1535, que a menudo se usan en la prueba de Ames experimental.

Tipo	Definición NTP	Descripción
Negativo	Sin cambio de población (vs placa en blanco)	Predicción negativa
Positivo	Cambio de población, más del doble de cambio de placa en blanco	Predicción positiva

Tabla 7. Clasificación de la propiedad de mutagenicidad mediante la prueba de AMES

5.8.2 Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT)

Resolver la ecuación de Schrödinger para un átomo o una molécula produce una función de onda, que puede usarse para determinar varias propiedades del sistema (Ecuación 1). Debido a que es imposible resolver la ecuación de Schrödinger exactamente para un sistema de muchos electrones, se emplean aproximaciones con la necesidad de una buena precisión a un costo computacional aceptable. Algunas de estas aproximaciones importantes que se han implementado a lo largo de la historia son principalmente la introducción del método de Hartree-Fock (HF), y los métodos *ab initio* derivados de este que requieren encontrar formas de evaluación cada vez mejores de la energía de intercambio-correlación (Tsuneda 2013). La energía de HF se define respecto a la función de onda de HF, que es una función de onda obtenida mediante el principio de variación, para encontrar los orbitales que conducen a la energía más baja. (Verma and Truhlar 2020).

$$\hat{H}\Psi(r_1, r_2 \dots r_N) = \mathcal{E}\Psi(r_1, r_2 \dots r_N)$$

Ecuación 1. Ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. \hat{H} es el operador Hamiltoniano que contiene la energía cinética y la energía potencial $\left[\sum_{i=1}^N -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + \sum_{i=1}^N V(r_i)\right]$, Ψ es la función de onda y \mathcal{E} es la energía del sistema.

La Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) es una reformulación de la mecánica cuántica que usa como variable única a la densidad electrónica molecular y en principio no requiere la obtención previa de la función de onda del sistema de N cuerpos ni la resolución de su ecuación de Schrödinger, sino de un funcional de la energía total del sistema que expresa a esta en función de la densidad electrónica. Así, DFT permite obtener las propiedades del sistema desde un conjunto dado de coordenadas nucleares, en donde la energía es un funcional de la densidad electrónica (ρ) en sus tres coordenadas, para cada electrón en el sistema (Verma and Truhlar 2020). Las aproximaciones mencionadas anteriormente tienen como precursores el modelo de Thomas-Fermi (Thomas 1927), que tenía como finalidad mapear la densidad sin necesidad de una función de onda, los teoremas de Hohenberg y Kohn (Hohenberg 1964) que representan el mayor pilar de fundamentación formal de la DFT, ya que, establecen que la densidad electrónica del estado fundamental estará determinada únicamente por un potencial externo. Finalmente, el modelo de Kohn y Sham (KS) (Kohn and Sham 1965).

El modelo de KS es el más ampliamente utilizado hoy en día, utiliza una función de densidad que se construye en términos de orbitales de KS, que son diferentes a los de HF. KS introdujeron el concepto de un sistema no interactuante, a partir de un conjunto de orbitales (funciones de electrones), de manera que la mayor parte de la energía cinética se puede calcular con una buena precisión (la parte del sistema no interactuante) y la menor parte (la parte si interactuante o correlación dinámica) se fusiona con las pequeñas contribuciones no clásicas a la repulsión electrón-electrón (intercambio), de manera que se unen en el potencial de intercambio-correlación (Ecuación 2) (Parr and Yang 1989).

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{eff}(r)\right]\Psi_i = \varepsilon_i\Psi_i$$

Ecuación 2. Ecuación de Kohn y Sham. El potencial $V_{eff}(r)$ que es el potencial local efectivo, incluye la contribución del potencial de intercambio y correlación de un gas uniforme con la densidad electrónica, Ψ_i es el i -ésimo orbital y ε_i es su correspondiente energía. El subíndice es por cada uno de los orbitales de Kohn y Sham.

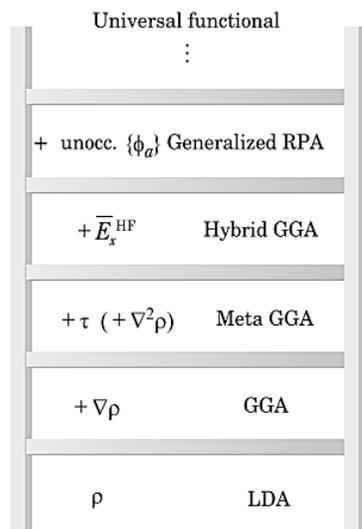


Figura 14. Clasificación jerárquica de los funcionales de DFT de Perdew y Wang, conocida como “La escalera de Jacobo” (Tsuneda 2013).

La confiabilidad del método de Kohn-Sham depende del funcional de intercambio-correlación que se aplique. Los funcionales de intercambio-correlación son clasificados jerárquicamente como “La escalera de Jacobo” o “escalera al cielo” (Figura 14) (Perdew and Wang 1992), de esta manera se clasifican como funcionales de: Aproximación de la Densidad Local (LDA), aproximación del Gradiente Generalizado (GGA), Meta-GGA, híbridos y otros más (Tsuneda 2013).

Los funcionales del primer escalón, LDA, solo contienen la densidad electrónica. Los funcionales GGA, corrigen a los funcionales LDA al agregar el gradiente de la densidad electrónica. Los meta-GGA corrigen a GGA con la introducción de la energía cinética o el laplaciano de la densidad. Los funcionales híbridos corrigen a los anteriores al integrar la energía de intercambio “exacta” de HF con los funcionales GGA, en una proporción constante (Sousa, Fernandes, and Ramos 2007).

La clasificación dentro de los funcionales híbridos dependerá del porcentaje de energía de intercambio de HF que contiene. Por ejemplo, la familia de los funcionales Minnesota puede contener desde un 100% de energía de intercambio de HF hasta un 27%, incluso existe el funcional M06-L que no contiene esta corrección de energía.

5.8.3 Nivel de teoría y modelo de estudio

5.8.3.1 Funcionales Minnesota: M06-2X

Desde el año 2005 se han desarrollado varios meta-funcionales en el grupo de Truhlar en Minnesota, que son funcionales con gran precisión, algunos de los funcionales son: M06-L, M05, M05-2X, M06 y M06-2X (Peverati and Truhlar 2014).

El funcional meta-GGA híbrido M06-2X contiene 54% de intercambio de HF, es ampliamente utilizado para un nivel superior en las áreas de la química, incluida la termoquímica y cinética química. Este funcional es óptimo para las interacciones no covalentes, tiene un excelente

rendimiento para la química del grupo funcional, predice eficazmente la valencia y energías de excitación electrónicas de Rydberg y es un excelente funcional para estudiar las interacciones de acoplamiento aromático (Y. Zhao and Truhlar 2008). Por lo anterior lo hemos seleccionado para este estudio.

5.8.3.2 Conjunto base

El conjunto base 6-311+G (d, p) se construye de la siguiente manera: a) 6 funciones gaussianas contraídas en una Función Tipo Gaussiana Contraída (CGTF) del orbital atómico de capa interna (o del *core*), b) para la capa de valencia se cuenta con 3 funciones para cada orbital de valencia (triple zeta). Una de ellas tiene 3 primitivas en una CFTF y las otras dos están formadas por una sola primitiva (Krishnan et al. 1980). Además, se le añaden seis funciones de polarización tipo d y 3 de polarización tipo p.

5.8.3.3 Modelo de Solvatación basado en la Densidad de carga (SMD)

Para incorporar a los cálculos de DFT el efecto del solvente (en nuestro caso esencialmente es agua por ser el medio fisiológico), se usa el Modelo de Solvatación continuo basado en la Densidad de carga (SMD) es la representación mecánico-cuántica de una molécula de soluto que interactúa con un modelo de medio continuo de solvente. SMD es un modelo muy eficaz, ya que se puede aplicar a cualquier soluto cargado o no cargado en cualquier solvente o medio líquido para el cual se conocen sus descriptores clave como la constante dieléctrica, índice de refracción, tensión superficial aparente y parámetros de acidez y basicidad. El modelo separa la energía libre de solvatación observable en dos componentes principales: la contribución electrostática en masa y el término cavidad-dispersión-estructura-disolvente, que es la contribución que surge de las interacciones de corto alcance entre el soluto y las moléculas de disolvente en la primera cubierta de solvatación (Ecuación 3) (Marenich, Cramer, and Truhlar 2009).

$$\Delta G_S^0 = \Delta G_{ENP} + \Delta G_{CDS} + \Delta G_{conc}^0$$

Ecuación 3. Energía libre de Gibbs del modelo de solvatación SMD.

En donde:

ΔG_S^0 es la energía libre de solvatación estándar de la fase gaseosa a la fase solvatada.

ΔG_{ENP} es la energía libre de solvatación de los componentes electrónicos, nucleares y de polarización.

ΔG_{CDS} es la energía libre asociada con la cavidad del solvente.

ΔG_{conc}^0 es la energía libre asociada al cambio de concentración entre el estado estándar de la fase gaseosa y el estado estándar de la fase líquida.

5.8.3.4 Cargas Hirshfeld

Para poder describir cuantitativamente las distribuciones de carga en las moléculas, es conveniente dividir el sistema en fragmentos atómicos. El problema es que no existe un esquema único para determinar las distribuciones de carga o cargas atómica del sistema, al no ser estas un observable del mismo. Por lo tanto, siempre se debe seleccionar algún tipo de esquema de cargas atómicas que conlleva una partición particular del sistema. Los fragmentos de átomos unidos permiten la evaluación inequívoca de todas las propiedades de un electrón del sistema, con una precisión limitada solo por la de la densidad de carga en sí, ya que, la integración de las densidades definirá las cargas atómicas netas y los momentos multipolares. Así, la relación de la densidad de deformación se le conoce como cargas Hirshfeld (Hirshfeld 1977). Se ha demostrado que el esquema de Hirshfeld (Ecuación 4) genera una partición óptima de las densidades atómicas en un sentido teórico (Mao and Chai 2005). Este método no requiere una referencia a conjuntos de base. Además, cuando la densidad de deformación molecular converge a la solución verdadera, las cargas nets calculadas, también lo harán. Finalmente, otra ventaja de este esquema es que permite una definición sencilla de momentos locales (Davidson and Chakravorty 1992).

$$q_A = Z_A - \int \frac{\rho_{A(r)}^0}{\sum_x \rho_{x(r)}^0} \rho(r) dr$$

Ecuación 4. Esquema de Hirshfeld donde q_A es la carga de un átomo A en una molécula, Z_A es el número atómico de A, $\rho(r)$ es la densidad electrónica y $\frac{\rho_{A(r)}^0}{\sum_B \rho_{B(r)}^0}$ es el factor de proporcionalidad basado en la densidad, que es la relación de la densidad de electrones del átomo aislado ($\rho_{A(r)}^0$) y la densidad construida a partir de la superposición de las densidades de los electrones aislados de los átomos presentes en la molécula ($\sum_x \rho_{x(r)}^0$).

5.8.4 Descriptores de la reactividad

Como se ha mencionado anteriormente, al aplicar la química computacional se pueden extraer todas las propiedades del sistema. De esta manera, se puede entender lo que ocurre en los sistemas que se están estudiando. Con la teoría conceptual de la DFT se puede estimar la reactividad de las moléculas con la implementación de descriptores de la reactividad: Descriptores de la reactividad globales y descriptores de la reactividad locales (Parr and Yang 1989).

5.8.4.1 Descriptores de la reactividad globales

Estos describen la reactividad del sistema globalmente, por medio de un valor único de la propiedad dada para el sistema como un todo.

Potencial de ionización (PI):

Es la energía que se necesita para separar un electrón del sistema en su estado fundamental (Ecuación 4). Entre mayor cantidad de energía se requiera, significa que el sistema es más estable.

$$PI = \frac{[E(N - 1) - E(N)]}{2}$$

Ecuación 5. Potencial de ionización (PI), donde $E(N-1)$ es la energía de la molécula en la forma catiónica y $E(N)$ es la energía de la molécula en la forma neutra.

Afinidad electrónica (AE):

Cantidad de energía que se libera cuando se captura un electrón del sistema (Ecuación 5). Un valor menor indica que el sistema es más estable al agregar un electrón de más.

$$AE = \frac{[E(N) - E(N + 1)]}{2}$$

Ecuación 6. Afinidad Electrónica (AE), donde $E(N)$ es la energía de la molécula en la forma neutra y $E(N+1)$ es la energía de la molécula en la forma aniónica.

Potencial químico (μ):

El potencial químico se obtiene al derivar la energía respecto al número de electrones, manteniendo el potencial externo constante (Ecuación 6). Mide la capacidad del sistema para donar electrones, entre más alto sea el valor, mayor será la capacidad del sistema para dar electrones (Fuentealba and Cárdenas 2013).

$$\mu = \left(\frac{dE}{dN} \right)_v$$

Ecuación 7. Potencial químico (μ), donde E es la energía de la molécula, N es el número de electrones totales y v es el potencial externo.

Electronegatividad (χ):

Mide la capacidad de un átomo para atraer electrones (Ecuación 7). Es el negativo del potencial químico. Esta propiedad es el resultado de una deslocalización de carga, en donde la energía del más electronegativo disminuye y para el menos electronegativo aumenta (Iczkowski and Margrave 1961).

$$\chi = \left(-\frac{dE}{dN} \right)_{N=0, \nu}$$

Ecuación 8. Electronegatividad (χ), donde E es la energía de la molécula, N es el número de electrones totales y ν es el potencial externo.

Dureza química (η):

La dureza se basa en la polarizabilidad y el tamaño de la especie. Mide la resistencia a la transferencia de electrones (Ecuación 8), varía como lo hace la electronegatividad a lo largo de la tabla periódica por que los átomos con baja polarización se consideran duros y los de alta polarizabilidad, son calificados como suaves. Los valores bajos indicaran que el sistema es poco estable (Berkowitz and Parr 1988).

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial^2 N} \right)$$

Ecuación 9. Dureza (η), donde E es la energía de la molécula y N es el número de electrones totales.

Blandura química (S):

La blandura química es lo inverso a la dureza química (ecuación 9), lo que significa que las moléculas blandas sufren cambios en su densidad electrónica más fácilmente que las moléculas duras.

$$S = \left(\frac{1}{\eta} \right)$$

Ecuación 10. Blandura química (S), donde η es la dureza química.

Electrofilicidad (ω):

Mide la estabilidad de la energía cuando se le añade carga al sistema (Ecuación 10). Los bajos valores indican que el sistema es más estable.

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

Ecuación 11. Electrofilicidad (ω) donde μ es el potencial químico y η es la dureza química.

Potencia electrodonadora (ω^-):

Mide que tan propenso es el sistema para donar carga electrónica (Ecuación 11), un bajo valor indica la mayor capacidad de éste para donar carga.

$$\omega^- = \frac{(3IP + AE)^2}{16(IP - AE)}$$

Ecuación 12. Potencia electrodonadora (ω^-) donde IP es el potencial de ionización y AE es la afinidad electrónica.

Potencia electroreceptora (ω^+):

Mide la capacidad del sistema para aceptar carga electrónica (Ecuación 12), sus altos valores indican una gran capacidad para aceptar carga electrónica.

$$\omega^+ = \frac{(IP + 3AE)^2}{16(IP - AE)}$$

Ecuación 13. Potencia electroreceptora (ω^+) donde IP es el potencial de ionización y AE es la afinidad electrónica.

5.8.4.2 Descriptores de la reactividad locales

Estos describen la reactividad del sistema localmente, tomando valores diferentes, punto a punto en el sistema, de la propiedad dada.

El más fundamental de ellos es la propia densidad electrónica del sistema, que viene de derivar la energía con respecto a un potencial externo (Ecuación 13).

$$\rho(r) = \left(\frac{\delta E}{\delta V(r)} \right)_N$$

Ecuación 14. Densidad electrónica (ρ) donde E es la energía de la molécula, V es el potencial externo y N es el número de electrones totales.

Fue propuesta como una herramienta para deducir como varia la reactividad en diferentes posiciones de la molécula. (Ayers and Levy 2000).

Función Fukui condensada electrofílica (f^-):

Mide la variación de la densidad electrónica con respecto al decremento de los electrones (Ecuación 14). De tal manera que, se identifican los átomos nucleofílicos del sistema de referencia que son susceptibles a ataques electrofílicos.

$$f_i^- = q_{\text{anión}} - q_{\text{neutro}}$$

Ecuación 15. Función Fukui **condensada** electrofílica (f^-), donde $q_{\text{anión}}$ es la carga del átomo i -ésimo en la molécula aniónica y q_{neutro} es la carga del átomo i -ésimo la molécula neutra.

Función Fukui condensada nucleofílica (f^+):

Mide la variación de la densidad electrónica con respecto al incremento de electrones (Ecuación 15). Sirve para identificar a los átomos electrofílicos del sistema de referencia que son susceptibles a ataques nucleofílicos.

$$f_i^+ = q_{\text{catión}} - q_{\text{neutro}}$$

Ecuación 16. Función Fukui condensada nucleofílica (f^+), donde $q_{\text{catión}}$ es la carga del átomo i -ésimo de la molécula catiónica y q_{neutro} es la carga del átomo i -ésimo de la molécula neutra.

Función Fukui condensada radicalaria (f^0):

Describe el sitio que es susceptible a un ataque radicalario (Ecuación 16).

$$f_i^0 = \frac{q_{\text{anión}} - q_{\text{catión}}}{2}$$

Ecuación 17. Función Fukui condensada radicalaria (f^0), donde $q_{\text{anión}}$ es la carga del átomo i -ésimo de la molécula aniónica y $q_{\text{catión}}$ es la carga del átomo i -ésimo de la molécula catiónica.

6. CAPÍTULO 2

ESTUDIO EXPERIMENTAL

Objetivo general

Analizar los cambios en la expresión de diferentes proteínas en riñones, en respuesta a la intoxicación por 2 nefrotóxicos: plomo y gentamicina a diferentes dosis y tiempos de exposición. Además, correlacionar la presencia y cambios en la concentración de KIM-1, biomarcador de daño renal en orina, con las alteraciones patológicas renales y los cambios en la expresión de diferentes proteínas como p-ERK 1/2, p21, TRPV5 y DMT1.

Determinar si la concentración y los cambios de KIM-1 se correlacionan con cambios en la proteína ERK en ambos tipos de daño. Lo que podría sugerir que esta vía es parte de un mecanismo de daño renal agudo común en los 2 tipos de tóxicos.

Estudiar mediante métodos de la Química Teórica y Computacional, de la Teoría de Funcionales de la Densidad, las propiedades electrónicas, estructurales y fisicoquímicas en fase gas y en fase solvente de la gentamicina, que induce daño renal. Así como la interacción del antibiótico con su receptor celular, la megalina, mediante el método de acoplamiento molecular o *docking*.

Objetivos específicos

- Determinar mediante ELISA el nivel de las proteínas: KIM-1 en orina, en un modelo murino (ratas macho Wistar), administrando a diferentes tiempos y dosis de plomo y gentamicina.
- Detección y cuantificación de las proteínas: p-ERK 1/2, en región citosólica y nuclear, DMT1, TRPV5 y p21 con la técnica de western blot.
- Calcular las propiedades fisicoquímicas y electrónicas de la gentamicina *in silico* con teoría de funcionales de la densidad (DFT) a un nivel de teoría dado por el funcional M06-2X usando el conjunto base 6-311+G (d, p), en fase gas y en fase solvente (agua para simular el medio fisiológico, con el modelo SMD).
- Calcular el Coeficiente de Partición (LogP) y algunas propiedades ADMET de la gentamicina mediante el método quimio informático QSAR (Quantitative structure-activity relationship).
- Obtención de los modelos homólogos de cada uno de los dominios que forman la megalina.
- Evaluación de la interacción de la gentamicina y sus receptores, dominios conservados de la megalina, mediante el método de acoplamiento molecular (*docking*).
- Hacer una evaluación estadística de las variables estudiadas para determinar los efectos principales.

Hipótesis

El daño renal por exposición al plomo y la gentamicina induce biomarcadores como KIM-1, que pueden ser detectados en orina desde las primeras etapas de daño renal. La activación de KIM-1 inducida por sustancias que dañen las células proximales tubulares (CTP), sugiere la existencia de un mecanismo común de daño renal agudo en este tipo celular. El receptor KIM-1 a su vez activa a la vía de la MAP cinasas. Por lo que es probable que los cambios de KIM-1 se relacionen con los cambios en la expresión renal de la proteína ERK que es un efector común de esta vía de las MAP cinasas.

Los patrones de expresión de p21, TRPV5 y DMT1, podrán correlacionar positiva o negativamente ante la presencia de los 2 tóxicos estudiados.

Es probable que las propiedades electrónicas y fisicoquímicas de los componentes de la gentamicina, así como sus propiedades farmacocinéticas, permitan una fácil interacción con su receptor celular, megalina, permitiendo su fácil acceso y su acumulación en las células tubulares proximales renales.

Justificación

La presencia de contaminantes en el ambiente como el plomo y el consumo de fármacos sin control adecuado como la gentamicina han generado un aumento en la incidencia de las enfermedades renales, que puede desarrollar un daño crónico e irreversible si no es detectado y/o diagnosticado en una etapa temprana. Por muchos años, el diagnóstico de la lesión renal se ha basado en el aumento de nitrógeno y creatinina en suero (BUN). Sin embargo, estos marcadores clínicos comúnmente aparecen tarde y son, por lo tanto, biomarcadores poco fiables de la lesión renal. Por esta razón se busca una evaluación de biomarcadores tempranos, así como una correlación entre la cantidad y tiempo de exposición. KIM-1 es un biomarcador aprobado por la FDA en el año 2008 que se ha correlacionado con la gravedad del daño renal, por lo que su cuantificación en orina lo hace ser un método no invasivo y sensible para la evaluación del daño renal. Sin embargo, su relación en el mecanismo de acción de ciertos nefrotóxicos como el plomo y la gentamicina no se ha establecido completamente. Por esta razón, se estudiarán algunas proteínas involucradas en su ruta de actividad.

Además, mediante metodologías computacionales, se busca conocer las propiedades fisicoquímicas y electrónicas de la gentamicina y la naturaleza de su interacción con su receptor celular renal, la megalina, para poder así proponer una inhibición y evitar la acumulación del aminoglucósido en las células tubulares renales.

7. CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

7.1 Experimental

7.1.1- Animales, tratamientos y aislamiento de muestras

Ratas macho Wistar (8 semanas de edad; 180-200 g de peso corporal) fueron alojados en grupos de cuatro (n=4) en jaulas estándar con libre acceso al agua y a la comida, bajo un ciclo de 12:12h de luz-oscuridad. Los grupos de ratas fueron administrados vía intraperitoneal con distintas dosis de acetato de plomo y distintas dosis de gentamicina, se usó agua inyectable como control. La administración intraperitoneal se utilizó para excluir los procesos de absorción gastrointestinal y todos los procedimientos fueron manejados de acuerdo con las directrices del Comité de Bioética de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. Todos los experimentos se ajustaron a las normas éticas internacionales recomendadas. Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 8 y 9.

Clave	Tratamiento
C	Agua inyectable
36hE	5 mg/kg de gentamicina/36 horas
36hF	10 mg/kg de gentamicina/36 horas
2SE	5 mg/kg de gentamicina/2 semanas
2SF	10 mg/kg de gentamicina/2 semanas
2S4PE	5 mg/kg de gentamicina/2 semanas + 4 semanas de recuperación
2S4PF	10 mg/kg de gentamicina/2 semanas + 4 semanas de recuperación

Tabla 8. Grupos de ratas bajo el tratamiento con gentamicina.

Clave	Tratamiento
C	Agua inyectable
2SB	5 mg/kg de acetato de plomo/2 semanas
2SC	20 mg/kg de acetato de plomo/2 semanas
3SB	5 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas
3SC	20 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas
3S2PB	5 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas + 2 semanas de recuperación
3S2PC	20 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas + 2 semanas de recuperación
3S4PB	5 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas + 4 semanas de recuperación
3S4PC	20 mg/kg de acetato de plomo/3 semanas + 4 semanas de recuperación

Tabla 9. Grupos de ratas bajo el tratamiento con acetato de plomo.

7.1.2 Técnica ELISA

Las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas durante 1 día para ser equilibradas, con libre acceso a alimento y agua. Al segundo día, la orina se recogió durante 24 horas con ratas en ayunas pero libre acceso a agua. La molécula de lesión renal-1 (KIM-1), biomarcador de lesión tubular proximal, se midió en la orina utilizando un kit de ensayo ELISA (Sistema de I+D, RKM 100), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.3 Western blot

Las fracciones de proteína nuclear y proteína citoplásmica de homogenado de riñón se recolectaron utilizando el kit de extracción nuclear (ab113474; Abcam, México) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la separación de la fracción nuclear y la fracción citoplasmática, se analizó la histona p-H2AX mediante transferencia western blot en las dos fracciones de cada condición de ambos tóxicos.

La concentración de proteína se midió utilizando el método Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay; Bio-Rad, México.) y cantidades equivalentes de proteína total (50 µg de proteína por carril) fueron fraccionadas por SDS-PAGE (12% gel) en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa por dos horas para TRPV5 y P-ERK ½ y una hora para p21 y DMT1. Las membranas fueron bloqueadas usando 5% w/v BSA en buffer Tris con Tween-20 (Tris de 20 mmol/L-HCl, pH 7.6, 137 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) por 5 minutos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante la noche a 4 °C y con agitación constante con los siguientes anticuerpos primarios: anti-DMT1 (1:500 en TBS-T; Señalización celular No. 15083); Anti-p-ERK (1:500 en TBS-T; Abcam ab214362); Anti-TRPV5 (1:5000 en TBS-T; Abcam ab137028); Anti-p21 (1:250 en TBS-T; Santa Cruz Biotechnology sc-397); y anti-GAPDH (1:100 en TBS-T; Santa Cruz Biotechnology sc-25778) como control. Los blots fueron lavados con TBS-T por 5 minutos, tres veces. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario

anti-conejo Conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) a 1:2000 dilución en TBS-T, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Después del lavado, las bandas se visualizaron utilizando el kit Clarity Western ECL Bio-Rad. Las imágenes se obtuvieron con el equipo de ChemiDoc y el análisis de densitometría se llevó a cabo con el software ImageLab versión 4.1 (Bio-Rad), usando la banda revelada de la proteína control (GAPDH) como un 100% en cada condición.

7.1.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente diferente.

7.2 Teórico-computacional

7.2.1 Descriptores de la reactividad de los componentes de la gentamicina

Se calcularon las propiedades fisicoquímicas y electrónicas de la gentamicina *in silico* con Teoría de funcionales de la Densidad (DFT) tal que todas las geometrías y frecuencias de las especies fueron calculadas empleando el funcional del nivel META-GGA del grupo de Minnesota, particularmente el M06-2X (Y. Zhao and Truhlar 2008), que contiene el 54% de intercambio y lo hace óptimo para evaluar sistemas que presenten interacciones covalentes y no covalentes, usando el conjunto base 6-311+G (d,p), en fase gas y en fase solvente (agua, para simular el medio fisiológico, con el modelo SMD). Para ello se usó el paquete GAUSSIAN 09 (Frisch et al. 2009) y SPARTAN18 (Wavefunction, Inc 18401 Von Karman. Pleasanton 2018). También se determinaron los descriptores de reactividad de la DFT conceptual, globales y locales, de las especies optimizadas en su forma neutra, catiónica y aniónica, en fase gas y agua.

Además, se dispuso de una cuenta ilimitada en el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular (Universidad de Guanajuato-CONACYT, Proyecto: 123732), para el uso del CLÚSTER LINUX llamado PIPILA, que tiene una enorme capacidad de hardware para el cómputo de alto desempeño y rendimiento numérico, el equipo cuenta con:

- 1152 CPUs, 4.6 Terabytes de memoria RAM.
- 16 TB de almacenamiento después de Raid 6.

- Procesadores AMD serie 6000, de última generación.

Pípila es capaz de procesar 10 teraflops, un flops (floating point operation per second) es la unidad de medida de la eficiencia en cómputo de alto rendimiento y significa el número de operaciones de punto flotante por segundo por sus siglas en inglés. El Pípila es capaz de hacer 1×10^{13} operaciones de punto flotante, (diez billones de operaciones de punto flotante por segundo). Un procesador de escritorio, digamos un pentium i7, puede dar unos 10 GFlops, 1×10^{10} , esto es diez mil millones de operaciones de punto flotante por segundo. Por lo que Pípila es unas 1000 veces más potente que una computadora de escritorio con un CPU avanzado. En el 2014 Pípila fue localizada en el 4to lugar a nivel nacional y 6to en Latinoamérica del Top 50 de las supercomputadoras más potentes de todo Latinoamérica.

7.2.2 Estructuras aproximadas por el método de homología.

La obtención de las secuencias primarias de los principales dominios conservados de la megalina de la especie *Rattus norvegicus* se obtuvieron en la base de datos de NCBI, las secuencias se muestran en la Tabla 10. Con cada una de las secuencias de los aminoácidos, se construyeron las estructuras terciarias por medio del programa I-TASSER que se encuentra disponible en el servidor web (Yang et al. 2010) dicho programa posee una cobertura de 10 a 1500 aa. Una vez ingresada la secuencia construye cinco propuestas de estructuras terciarias a través de una biblioteca de datos en el PDB en donde se emplean los perfiles de modelo oculto de Markov, Psi-Blast, Needleman-Wunsch y algoritmos de alineación Smith-Waterman. Para validar la metodología de homología se utilizará de control a la estructura en solución por RMN reportada de la megalina en rata, el dominio con clave 2I1P en la base de datos de PDB (Wolf et al. 2007), esta validación se realizó con el programa UCSF Chimera versión 1.11.2. Para comprobar la calidad de cada estructura tridimensional, se somete cada propuesta por dominio, a un análisis de la desviación de la energía por medio de métodos estadísticos, comparando con estructuras ya obtenidas experimentalmente, esto se realiza por medio del programa estadístico, ProSaWeb que se encuentra en un servidor web (Wiederstein and Sippl 2007).

No.	Acceso	Función relacionada
1	Smart00135	Dominio receptor YWTD de lipoproteína de baja densidad tipo “B”; que se repite en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que juega un papel central en el metabolismo del colesterol en los mamíferos. También presente en una variedad de moléculas similares a la megalina.
2	Cd00112	Dominio receptor de lipoproteínas de baja densidad de clase “A”; una repetición rica en cisteína que desempeña un papel central en el metabolismo del colesterol en mamíferos; la proteína receptora se une al LDL y lo transporta a las células por endocitosis; 7 repeticiones sucesivas ricas en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos están presentes en el N terminal de esta proteína de membrana multidominio.
3	Smart00192	Dominio receptor de lipoproteína de baja densidad clase A; Repetición rica en cisteína en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que desempeña un papel central en el metabolismo del colesterol en mamíferos. Las repeticiones tipo A se unen a las lipoproteínas N-terminal en el receptor de LDL.
4	Pfam00057 y Pfam00058	El receptor de lipoproteínas de baja densidad clase B; Este dominio también se conoce como el motivo YWTD después de la región más conservada de la repetición. La repetición YWTD se encuentra en múltiples repeticiones en tándem y se ha predicho que formará una estructura de hélice β .
5	Pfam14670	Sitio inhibidor del factor de coagulación Xa; Este dominio corto sobre el factor Xa de la enzima de coagulación es el objetivo de un potente inhibidor de la coagulación, TAK-442.
6	Pfam12662	Complemento tipo EGF; Los dominios cEGF o EGF tienen seis residuos de cisteína conservados unidos por disulfuro en el patrón característico 'ababcc'. Se encuentran en las proteínas de la coagulación sanguínea, como la fibrilina. El pliegue central del dominio EGF consiste en dos pequeñas horquillas β empaquetadas entre sí. Se han identificado dos variantes estructurales principales basadas en el contexto estructural del residuo de cisteína C-terminal del disulfuro 'c' en la horquilla C-terminal: hEGF y cEGF. En los cEGF, el tiol C-terminal reside en la lámina β C-terminal, lo que da como resultado largas longitudes de bucle entre los residuos de cisteína del disulfuro 'c'. Estas longitudes de bucle más largas pueden haber surgido por la pérdida selectiva de cisteína de una plantilla de EGF de cuatro disulfuros como la laminina o la integrina. Los dominios cEGF en tándem tienen cinco residuos de enlace entre cisteínas terminales de dominios adyacentes. Los dominios de cEGF pueden o no unirse al calcio en la región enlazadora.

Tabla 10. Lista de los dominios disponibles obtenida a partir de la secuencia de la megalina.

7.2.3 Acoplamiento molecular (docking)

Con cada uno de los dominios obtenidos se evaluó la interacción con los tres componentes principales de la gentamicina utilizando el programa AutoDock versión 4.0 (Morris et al. 2009) los acoplamientos se especifican en la tabla inferior (Tabla 11).

El programa AutoDock evalúa la interacción entre un ligando y una macromolécula en una serie de cuatro pasos. 1) Preparación de las coordenadas en el ligando y la macromolécula. Un archivo en donde se incluyen las cargas atómicas parciales y los tipos de átomos que contiene el ligando, que en este caso sería el componente de la gentamicina, y la macromolécula, que sería el dominio de la megalina. Además, este archivo incluye información sobre los grados de torsión que se establece en el ligando. En donde se determina que es un docking ligando flexible, y macromolécula rígida. 2) Calculo del AutoGrid. Donde una evaluación rápida de la energía permite pre-calcular el potencial de afinidad de cada tipo de átomo en la molécula del ligando que será acoplado. En el paso del AutoGrid la macromolécula es introducida dentro de una caja tridimensional. La energía de interacción de un solo átomo con la macromolécula es asignada a un punto de la caja. Finalmente, el potencial de afinidad, electrostático y de solvatación es calculado para cada tipo de átomo en el ligando. 3) docking o acoplamiento molecular. Bajo el método del Algoritmo Genético Lamarckian (LGA) se determina la configuración energética del ligando. Este método consta en acoplar repetidas veces el ligando en la macromolécula durante diferentes tiempos. De esta manera se analiza la energía obtenida con los resultados anteriores para identificar a la mejor propuesta de acoplamiento ligando-macromolécula. 4) Análisis final con AutoDockTools. Las propiedades y las interacciones entre el ligando y la macromolécula se visualizan en las simulaciones de acoplamiento con la herramienta de AutoDockTools. Lo que analizó en este trabajo fue la eficiencia de ligando y la constante de inhibición (KI) de la siguiente manera: $KI = e^{\frac{\Delta G + 1000}{R * T}}$ donde ΔG es la energía del docking, R es igual a 1.98719 calorías y T es la temperatura a 298.15 K.

Acoplamiento 1			Acoplamiento 2			Acoplamiento 3		
Componente	C1	Dominios	Componente	C1a	Dominios	Componente	C2	Dominios
		Smart00135			Smart00135			Smart00135
		Cd00112			Cd00112			Cd00112
		Smart00192			Smart00192			Smart00192
		Pfam00057-58			Pfam00057-58			Pfam00057-58
		Pfam14670			Pfam14670			Pfam14670
		Pfam12662			Pfam12662			Pfam12662

Tabla 11. Grupos de los acoplamientos. El acoplamiento 1 será entre el componente principal C1 de la gentamicina con cada uno de los 6 dominios homólogos obtenidos de la megalina. Así mismo, el acoplamiento C1a y C2.

7.2.4 Propiedades ADMET de la gentamicina

Cada una de las estructuras de los componentes de la gentamicina se analizaron en el programa PreADMET (S. Lee et al. 2002) el cual consta de cuatro partes principales de la siguiente manera:

1) Cálculo de descriptores moleculares: las propiedades ADMET están estrechamente relacionadas con los descriptores fisicoquímicos como el coeficiente de partición (LogP), el peso molecular, el área de la superficie polar y la solubilidad en agua. El módulo TOPOMOL calcula más de 2500 descriptores moleculares como topológicos, electrostáticos, fisicoquímicos y geométricos para la predicción ADMET de la estructura química 2D y 3D. TOPOMOL lee los archivos y proporciona un medio rápido para calcular todos los descriptores 2D de un millón de compuestos en menos de una hora usando una PC con un procesador Pentium IV 3.4 GHz.

2) Predicción de semejanza entre fármacos, mediante las reglas de Lipinski (Lipinski et al. 2012) que relaciona las estructuras químicas con las actividades biológicas de los fármacos.

3) Predicción de ADMET: Se han utilizado numerosos métodos *in vitro* en el proceso de selección de fármacos para evaluar la absorción intestinal de los fármacos candidatos. Entre ellos, el modelo de células Caco-2 y las células MDCK, que son modelos *in vitro* recomendados para la predicción de la absorción oral de fármacos. En absorción, este módulo proporciona modelos de predicción para el ensayo *in vitro* de células Caco-2 y células MDCK. Además, el modelo *in silico* HIA (absorción intestinal humano) y el modelo de permeabilidad de la piel, pueden predecir e identificar fármacos potenciales para el suministro oral o transdérmico. En distribución, la penetración de LogBB (logaritmo de permeabilidad a la barrera hematoencefálica) puede proporcionar información del fármaco terapéutico en el sistema nervioso central, modelo de unión de proteínas plasmáticas en su disposición y eficacia. Para construir estos modelos QSAR se utiliza una aproximación funcional genética para seleccionar descriptores relevantes de todos los descriptores 2D calculados para el módulo TOPOMOL, seguido de la red neuronal de propagación inversa resistente (Rprop) para desarrollar un modelo no lineal exitoso (Riedmiller and Braun 1993).

4) Predicción de la toxicidad: se desarrolló un modelo confiable que pueda clasificar la mutagenicidad por medio de la prueba de AMES en las cepas de salmonella TA100, TA98, TA135 y la carcinogenicidad de roedores. Mediante el método de red neural Rprop.

7.2.5 Efectos principales

Para evaluar el mayor efecto entre los factores estudiados, es decir, entre los componentes principales de la gentamicina y los modelos homólogos de la megalina obtenidos se sometió a un análisis multifactorial los datos de eficiencia de ligando (EL) y los datos de la constante de inhibición (KI) que se obtuvieron como respuestas de los acoplamientos moleculares.

El diseño multifactorial se llevó a cabo con el software Minitab versión 18 (State College, PA: Minitab 2018) y las características del diseño se presentan en la Tabla 12.

Factores	Nombre establecido	Niveles	Repeticiones	Variables de respuesta
Dominios	Smart00135	6	5	Eficiencia de ligando Constante de inhibición
	Cd00112			
	Smart00192			
	Pfam00057-58			
	Pfam14670			
	Pfam12662			
Componentes	C1	3		
	C1a			
	C2			

Tabla 12. Características estadísticas de las interacciones de los componentes principales de la gentamicina con los dominios de la megalina.

8. CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Experimental

8.1.1 ANIMALES, TRATAMIENTOS Y AISLAMIENTO DE MUESTRAS.

A las 24 h del término del periodo de cada tratamiento se recolecto muestra de orina y posteriormente se sacrificio al animal. Se obtuvieron muestras de riñón, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

Los tiempos posteriores del tratamiento con plomo y gentamicina se establecieron para determinar si existe una disminución del daño al tejido cuando se deja de exponer al tóxico.

8.1.2 ELISA PARA BIOMARCADOR KIM-1

Después de 3 semanas de exposición al plomo, solo se observó un aumento estadístico para la dosis de plomo de 5 mg. Se observó un aumento estadístico significativo dependiente de la dosis de plomo o gentamicina en la expresión de KIM-1 después de un período de recuperación de tratamiento de dos y cuatro semanas (Figura 15. A). En el caso de gentamicina, se observó un aumento en el nivel de KIM-1 en orina al final del período de exposición a gentamicina de una manera independiente de la dosis (Figura 15. B).

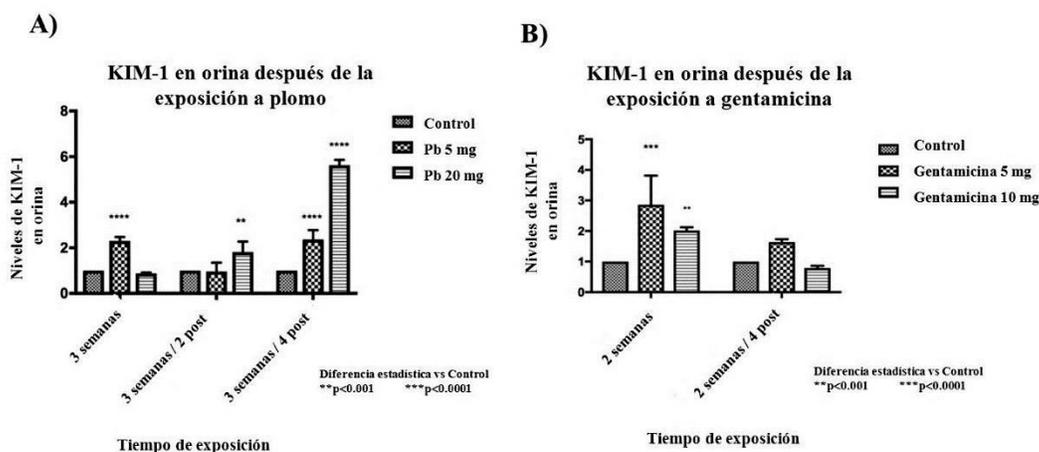


Figura 15. Niveles de KIM-1 en orina después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

Se analizaron diferentes dosis de gentamicina y acetato de plomo para determinar una relación de KIM-1 dependiente de la cantidad del toxico. Se observó una diferencia en los niveles de orina de KIM-1 entre las ratas expuestas a gentamicina o acetato de plomo. Para la exposición a gentamicina, los niveles de KIM-1 en orina aumentaron para ambas dosis de manera independiente de la dosis. Por el contrario, para la exposición al plomo, se observó un aumento después de un período de recuperación de 4 semanas de una manera dependiente de la dosis.

8.1.3 WESTERN BLOT

Los resultados representativos de los westerns blots de cada condición se muestran en la Figura 16. Se pueden observar las fracciones citoplasmáticas (superiores) y las fracciones nucleares (inferiores) de cada una de las condiciones en ambas exposiciones, acetato de plomo (figura 16. A) gentamicina (figura 16. B). Además, como control de una correcta extracción de las fracciones nucleares y citoplasmáticas se realizó un western blot de la histona p-H2AX en la exposición ante acetato de plomo (figura 16. C) y a gentamicina (figura 16. D). La histona solo se detectó en la fracción nuclear, excluyendo así cualquier contaminación nuclear en la fracción citoplasmática.

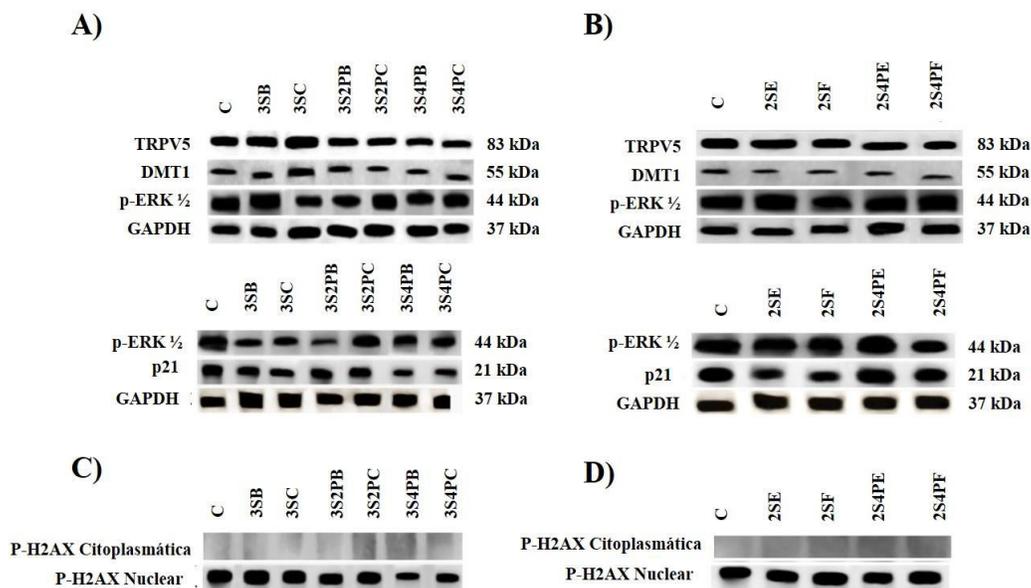


Figura 16. Resultado representativo de los westerns blots de cada condición, de las fracciones citoplasmáticas (superiores) y nucleares (inferiores). A) Tratamiento con acetato de plomo. B) Tratamientos con gentamicina.

8.1.3.1 p-ERK 1/2

Los resultados del análisis densitométrico del western blot muestran que la exposición al plomo no induce ningún cambio significativo en el nivel de expresión de la proteína citoplasmática

p-ERK al final de la exposición al plomo (3 semanas). Por el contrario, se observó un aumento dependiente de la dosis en el nivel de la proteína citoplasmática p-ERK después de un período de recuperación de cuatro semanas. Este aumento se observó sólo para la dosis más alta de plomo (20 mg/Kg de peso) después de dos semanas de exposición y un aumento en ambas dosis de plomo después de cuatro semanas de recuperación (Figura 16. A). En el caso del tratamiento con gentamicina, se observó un aumento estadístico al final de las dos semanas de exposición, pero no se observó ningún cambio después de cuatro semanas de recuperación (Figura 16. B). Se observó una diferencia de tiempo significativa en el aumento del p-ERK citoplasmático, que alcanzó su punto máximo en el caso de la gentamicina al final del tiempo de exposición, mientras que el acetato de plomo alcanzó su punto máximo después de un período de recuperación de cuatro semanas al término de la exposición.

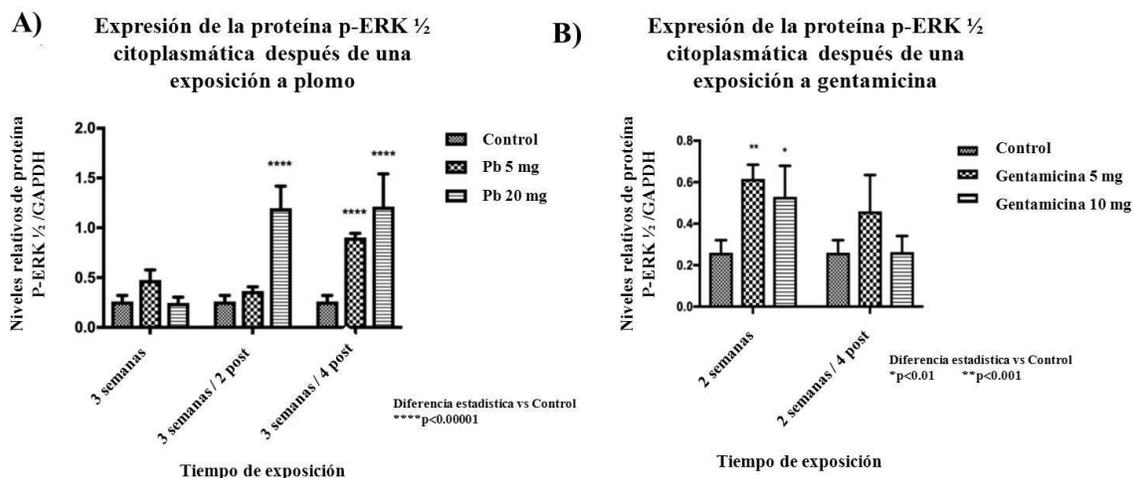


Figura 17. Niveles de expresión de la proteína p-ERK ½ citoplasmática después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

En el caso de la expresión de la proteína p-ERK ½ nuclear, se observó un cambio significativo al final del tratamiento para el acetato de plomo (Figura 17. A) y la gentamicina (Figura 17. B). Sólo se observó un aumento en las dosis bajas de gentamicina después del período de recuperación de cuatro semanas. Para el plomo se observó un aumento dependiente de la dosis en el nivel de proteína p-ERK ½ nuclear después de un período de recuperación de dos semanas.

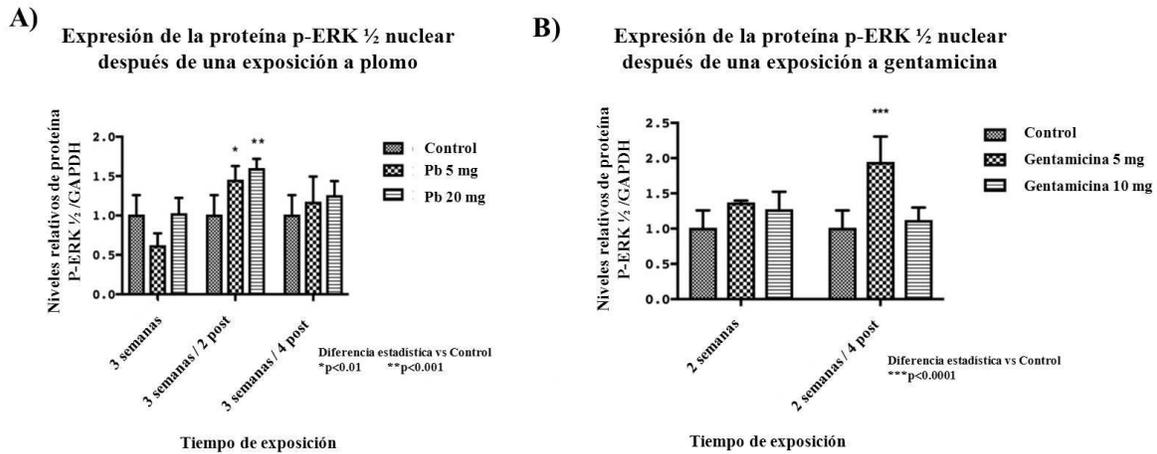


Figura 18. Niveles de expresión de la proteína p-ERK ½ nuclear después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

8.1.3.2 TRPV-5

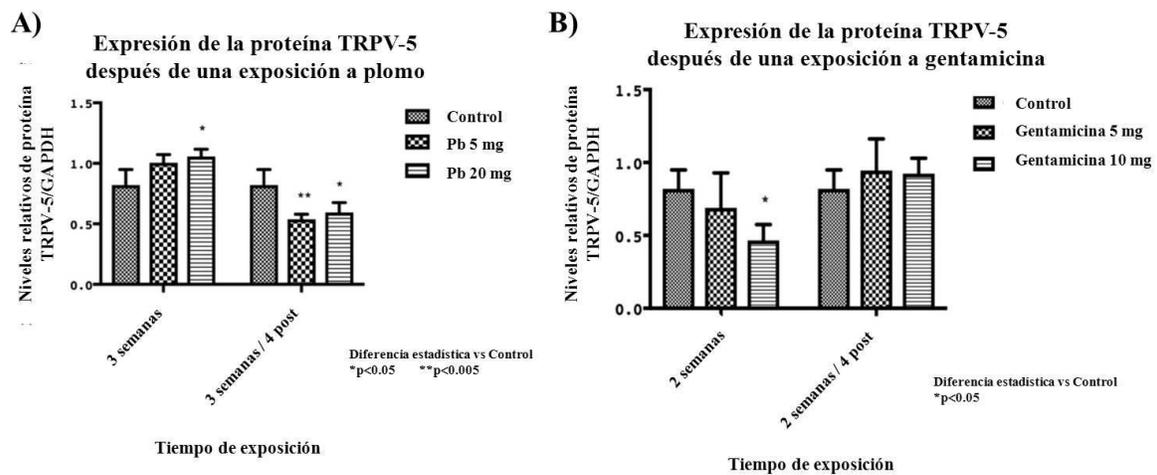


Figura 19. Niveles de expresión de la proteína TRPV5 después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

En cuanto a la expresión de la proteína TRPV5, sólo se observó un aumento significativo al final de la exposición al plomo para la dosis de 20 mg por kg de peso. Cuatro semanas después del final de la exposición se observó una reducción estadística en ambas dosis de plomo de manera independiente de la dosis (Figura 18. A). En cambio, en el caso de la gentamicina, sólo se observó una reducción estadística inmediatamente después del final de la exposición para la dosis de 20 mg por kg de peso (Figura 18. B).

8.1.3.3 DMT1

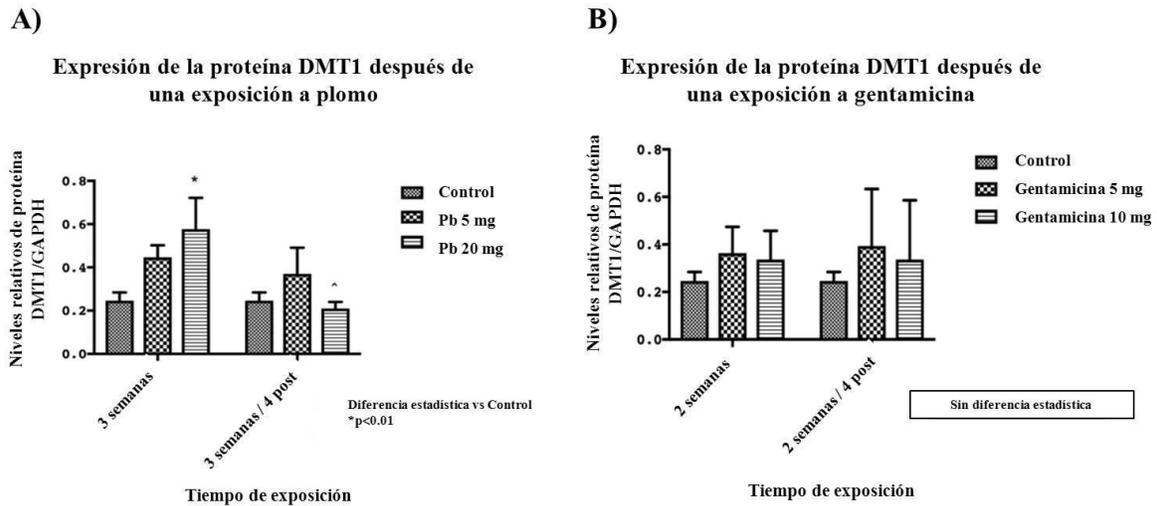


Figura 20. Niveles de expresión de la proteína DMT1 después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

La expresión de la proteína DMT1 se incrementó sólo inmediatamente después del final de la exposición al plomo para la dosis de 20 mg. Cuatro semanas después de la exposición se observó una reducción estadística en la expresión de la proteína DMT1 para la misma dosis (20 mg por kg de peso) (Figura 19. A). No se observaron cambios en ninguna condición de exposición a la gentamicina (Figura 19. B).

8.1.3.4 p21

En los animales expuestos a la gentamicina sólo se observó un ligero aumento de la expresión de la proteína p21 sin que se produjeran cambios estadísticos significativos (Figura 20. B). Curiosamente, la misma exposición al acetato de plomo indujo una reducción significativa de la expresión de la proteína p21 en todas las condiciones examinadas (Figura 20. A).

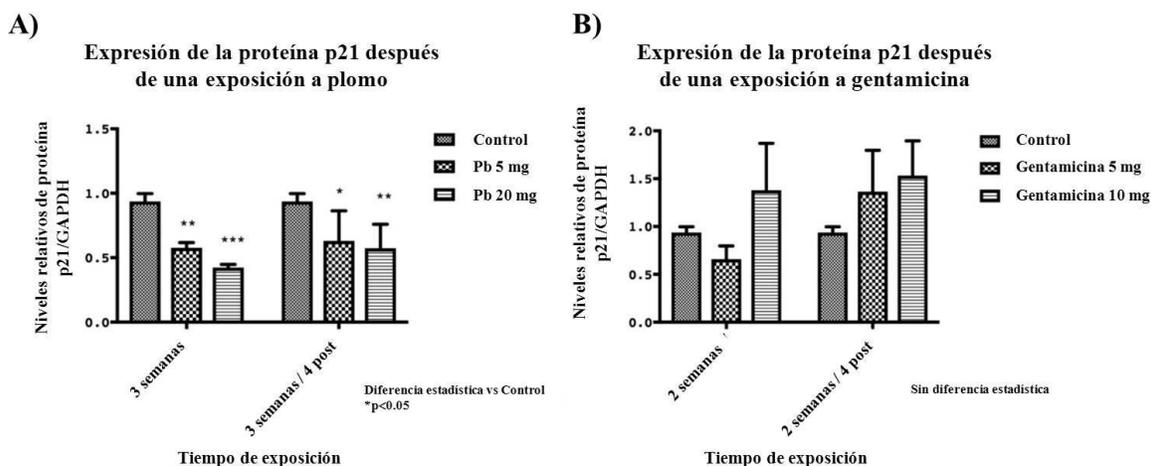


Figura 21. Niveles de expresión de la proteína p21 después de la exposición a acetato plomo (A) y a gentamicina (B).

KIM-1 es un biomarcador que se incrementa frente al daño renal. Este puede ser usado como un indicador ante las lesiones presentes en las CTPs, particularmente en las células de la región S3.

Las CTPs son altamente susceptibles al daño por su alta actividad metabólica, exposición a sustancias tóxicas, alto número de receptores y, además, tienen la capacidad de bioactivar compuestos no tóxicos a intermediarios reactivos. Sin embargo, las CTPs tienen la habilidad de regenerarse después de varios tipos de daños (Moonen, D’Haese, and Vervae 2018).

El entendimiento de los mecanismos moleculares de una lesión o de una reparación son cruciales para el buen desarrollo de una terapia.

En este trabajo, los cambios en riñón de p-ERK ½ citoplasmático están relacionados con los cambios en el nivel de KIM-1 en orina.

Los patrones de expresión de la proteína p-ERK ½ fueron diferentes entre plomo y gentamicina, en donde, hubo un incremento estadísticamente significativo al término del tratamiento de las dos semanas. Contrariamente, cuatro semanas después de la exposición a gentamicina (después del término de administración ya no había una diferencia significativa respecto al control. Para el acetato de plomo no hubo diferencia en los niveles de la expresión de la proteína de p-ERK ½ cuando se terminó de administrar el fármaco (tres semanas), pero hubo un incremento significativo después de las dos y cuatro semanas después del término.

A pesar de la diferencia entre la gentamicina y el acetato de plomo, una correlación fue observada entre los valores de KIM-1 y p-ERK ½ citoplasmática respecto al tiempo. Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína fosforilada ERK ½ y la cantidad de KIM-1 urinaria están relacionadas al daño renal independientemente del tipo de daño.

En el caso de exposición de plomo, ambos DMT1 y TRPV5 muestran cambios en la expresión de la proteína. TRPV5 incrementa después de las 3 semanas en la exposición al plomo solo en la dosis alta, seguido por una reducción estadística después del término de tratamiento posterior a las cuatro semanas, en ambas dosis. Uno de los mecanismos propuestos para plomo, es el desplazamiento iónico de metales esenciales por los metales pesados. Este desplazamiento altera la conformación de las proteínas e induce cambios en la actividad (Kirberger et al. 2013). Una desregulación de proteínas transportadoras de metales puede estar involucrada en un incremento en la excreción de calcio en orina.

Para DMT1, nuestros datos muestran que la exposición a plomo induce cambios en la expresión de las proteínas a una alta dosis del toxico. Algunos estudios sugieren que DMT1 está envuelto en el transporte de plomo en neuronas y células del riñón (Soto-Arredondo et al. 2018).

En el caso contrario, para gentamicina una reducción de la expresión de la proteína TRPV5 fue observada solamente a una dosis elevada, seguido de la exposición inmediata. La expresión de la proteína DMT1 con la exposición a gentamicina, no mostro cambios para ninguna dosis. Solo la exposición a plomo induce cambios en tales proteínas transportadoras de metales.

Inhibidores de la ciclina cinasa p21 son reguladores negativos del ciclo celular, específicamente, previniendo la progresión del ciclo celular. Nuestros datos muestran un leve incremento en la expresión de las proteínas con la exposición de la gentamicina. Esta ha sido descrita como un inductor de la acumulación de p21 en líneas celulares (Denamur et al. 2016). En contraste, la exposición a acetato de plomo induce una disminución de p21 en todas las condiciones experimentales. Adicionalmente, más del 50% de las células de S3 entran a ciclo celular una vez que se les administra acetato de plomo (Vogetseder et al. 2007).

8.2 Parte teórico-computacional

8.2.1 DESCRIPTORES DE LA REACTIVIDAD

Las estructuras de cada uno de los componentes de la gentamicina, optimizadas a un nivel de teoría M06-2X con un conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase solvente (agua) con el modelo de solvatación basado en la densidad de carga (SMD), se muestran en la siguiente figura (Figura 22).

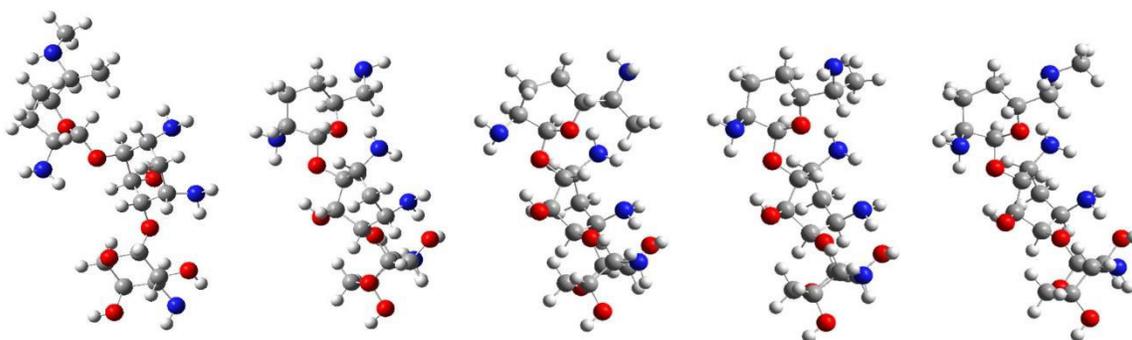


Figura 22. Estructuras optimizadas con un nivel de teoría M06-2X/ 6-311+G (d, p) de los componentes de la gentamicina C1, C1a, C2, C2a y C2b. Todas se muestran optimizadas en fase agua y en su estado neutro. Los átomos se muestran en gris (carbono), rojo (nitrógeno), azul (oxígeno) y blanco (hidrogeno).

8.2.1.1 Descriptores de la reactividad globales

Energías totales obtenidas de cada componente de la gentamicina optimizada con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase agua, usando el método de solvatación SMD (Tabla 13).

Fase	Componente	Neutro (eV)	Anión (eV)	Catión (eV)
GAS	C1	-42112.47	-42111.55	-42104.04
	C1a	-39973.68	-39972.24	-39965.24
	C2	-41043.26	-41041.54	-41034.82
	C2a	-41043.27	-41041.12	-41034.84
	C2b	-41042.91	-41041.97	-41034.51
AGUA	C1	-42114.06	-42113.93	-42107.67
	C1a	-39975.31	-39975.76	-39968.54
	C2	-41045.00	-41045.39	-41038.26
	C2a	-41044.90	-41045.34	-41038.12
	C2b	-41044.52	-41044.97	-41038.12

Tabla 13. Energías obtenidas de cada componente de la gentamicina con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase agua.

$$PI = E_{cación} - E_{neutro}$$

$$S = \frac{1}{\eta}$$

$$AE = E_{neutro} - E_{anión}$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

$$\mu = -\frac{PI + AE}{2}$$

$$\omega^- = \frac{(3PI + AE)^2}{16(PI - AE)}$$

$$\chi = \frac{PI + AE}{2}$$

$$\omega^+ = \frac{(PI + 3AE)^2}{16(PI - AE)}$$

$$\eta = PI - AE$$

Fase	Descriptores	Componente de la gentamicina				
		C1	C1a	C2	C2a	C2b
GAS	PI (eV)	8.434	8.433	8.446	8.437	8.398
	AE (eV)	-0.928	-0.942	-1.719	-2.148	-0.925
	μ (eV)	-3.753	-3.746	-3.364	-3.144	-3.737
	X (eV)	3.753	3.746	3.364	3.144	3.737
	η (eV)	9.361	9.375	10.165	10.585	9.323
	S (eV ⁻¹)	0.107	0.107	0.098	0.094	0.1073
	ω (eV)	0.752	0.748	0.556	0.467	0.749
	ω^+ (eV)	0.213	0.210	0.067	0.023	0.212
	ω^- (eV)	3.966	3.956	3.430	3.168	3.949
AGUA	PI (eV)	6.394	6.776	6.739	6.776	6.400
	AE (eV)	-0.134	0.445	0.385	0.443	0.450
	μ (eV)	-3.130	-3.610	-3.562	-3.610	-3.425
	X (eV)	3.130	3.610	3.562	3.610	3.425
	η (eV)	6.529	6.331	6.354	6.333	5.949
	S (eV ⁻¹)	0.153	0.158	0.157	0.158	0.168
	ω (eV)	0.750	1.029	0.998	1.029	0.986
	ω^+ (eV)	0.344	0.649	0.613	0.648	0.631
	ω^- (eV)	3.473	4.259	4.175	4.258	4.056

Tabla 14. Descriptores de la reactividad global de cada componente de la gentamicina con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas y en fase agua.

Los descriptores de la reactividad globales obtenidos en fase gas y en fase solvente (agua) nos muestran que, de los componentes de la gentamicina, C2b tiene un valor de potencial de ionización menor a los demás componentes en ambas fases (Tabla 14). En el caso de la afinidad electrónica, en agua, C1 es el único componente con valor negativo. C2b presenta el mayor valor positivo. En cambio, cuando los componentes se encuentran en fase gas todos tienen valores negativos y C2b es el componente con un valor menos negativo. Para el valor del potencial químico, C1 en agua tiene un menor valor negativo y C1a tiene el valor más negativo respecto a los demás componentes y en fase gas los valores de menor a mayor se invierten. El componente C1a de la gentamicina posee valores mayores en ambas fases. De manera contraria el componente C2b tiene, en ambas fases, valores menores para el descriptor de la dureza, lo que concuerda con el valor mayor en el descriptor de la blandura.

Para los últimos tres descriptores de la reactividad global en fase gas y en fase solvente, el componente C1 de la gentamicina se comporta de manera distinta. En el caso de encontrarse en fase gas, el componente tiene valores mayores en los tres descriptores y en el caso de encontrarse en fase solvente, el componente de la gentamicina tiene los valores menores.

En el caso de la fase gaseosa, C2b tiene un menor valor en el potencial de ionización y un valor alto en el descriptor de la electronegatividad, lo que determina que es el componente menos propenso a separar un electrón de su estado fundamental y es reactivo cuando hay un electrón de más en él. El componente C1a, con sus valores obtenidos de los descriptores de la reactividad en electronegatividad y potencial químico, indican que es un compuesto capaz de donar electrones en el sistema donde se encuentre. Con los descriptores de la reactividad de la dureza y blandura, se determina que el componente C2b tiene menor resistencia a donar electrones, por lo que es más reactivo.

Al igual que en la fase gaseosa, en fase solvente C2b es el componente de la gentamicina que cuando se encuentre en un sistema será el que done electrones con mayor probabilidad. El componente C1, con los valores obtenidos de los descriptores globales de potencial químico y electronegatividad, determina que es un compuesto poco capaz de atraer electrones en el sistema en donde se encuentre. En el caso de los descriptores de la dureza, C1 es el componente con el mayor valor positivo, lo que indica que se resiste a donar electrones, lo que está relacionado a la estabilidad del sistema. El componente C2b tiene el valor más bajo, lo que indica su alta reactividad.

El descriptor de la electrofilicidad mide la resistencia de la energía cuando al sistema se le añade carga. Cuando el sistema es duro, su valor de electrofilicidad disminuye y el sistema será más estable, porque se vuelve menos reactivo. La potencia electrodonadora mide que tan propenso es el sistema para donar carga electrónica. Un bajo valor, como lo muestra el componente C1, indica la mayor capacidad de este para donar carga electrónica. Como el descriptor de la potencia electroaceptora mide la capacidad del sistema para aceptar carga electrónica, sus altos valores indican su gran capacidad para aceptar carga electrónica, C1 tiene un bajo valor, por lo tanto, tiene baja capacidad para aceptar electrones.

4.2.1.2 Descriptores de la reactividad locales

Energías y descriptores de la reactividad locales, funciones Fukui, obtenidas con un nivel de teoría M06-2X con un conjunto base 6-311+G (d, p) y cargas tipo Hiersfeld, en fase gas (Tabla 15) y en fase solvente con el modelo SMD (Tabla 16).

$$f_i^- = q_{\text{anión}} - q_{\text{neutro}} \quad f_i^+ = q_{\text{catión}} - q_{\text{neutro}} \quad f_i^0 = \frac{q_{\text{anión}} - q_{\text{catión}}}{2}$$

FASE GAS							
GentaC1							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
41	N	-0.086	-0.098	0.135	0.012	0.221	0.116
44	N	-0.040	-0.050	0.089	0.010	0.129	0.069
48	O	-0.087	-0.163	-0.054	0.077	0.033	0.055
51	N	-0.030	-0.190	-0.010	0.160	0.019	0.090
GentaC1a							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
41	N	-0.093	-0.106	0.219	0.013	0.312	0.162
44	N	-0.041	-0.051	0.135	0.010	0.177	0.093
48	O	-0.086	-0.171	-0.041	0.085	0.045	0.065
51	N	-0.030	-0.171	-0.008	0.141	0.022	0.082
GentaC2							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
16	C	0.016	-0.219	0.041	0.235	0.024	0.130
19	C	0.046	-0.100	0.055	0.146	0.009	0.078
41	N	-0.093	-0.111	0.215	0.018	0.307	0.163
44	N	-0.038	-0.048	0.138	0.010	0.177	0.093
GentaC2a							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
30	N	-0.017	-0.117	0.002	0.101	0.019	0.060
32	C	0.069	-0.062	0.078	0.131	0.009	0.070
33	O	-0.074	-0.144	-0.059	0.070	0.015	0.042
41	N	-0.093	-0.112	0.215	0.019	0.307	0.163
GentaC2b							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
41	N	-0.094	-0.107	0.162	0.013	0.255	0.134
44	N	-0.040	-0.050	0.102	0.010	0.142	0.076
48	O	-0.086	-0.171	-0.049	0.085	0.037	0.061
51	N	-0.030	-0.171	-0.008	0.141	0.021	0.081

Tabla 15. Energías obtenidas de las funciones Fukui condensadas para cada componente de la gentamicina en su forma neutra, catiónica y aniónica con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase gas. La tonalidad de menor a mayor representa del átomo menos al más electrofílico (f^+), nucleofílico (f^-) y el átomo susceptible a un ataque radicalario (f^0).

FASE AGUA							
GentaC1							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
3	C	0.035	-0.194	0.035	0.229	0.001	0.115
6	C	0.053	-0.092	0.054	0.145	0.001	0.073
60	N	-0.098	-0.095	0.352	0.003	0.450	0.224
63	C	0.068	0.065	0.319	0.004	0.251	0.127
GentaC1a							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
41	N	-0.096	-0.099	0.485	0.003	0.581	0.292
44	N	-0.046	-0.049	-0.019	0.002	0.028	0.015
48	O	-0.108	-0.477	-0.077	0.369	0.031	0.200
51	N	-0.035	-0.301	-0.027	0.266	0.008	0.137
GentaC2							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
20	O	-0.208	0.174	-0.127	0.383	0.081	0.151
41	N	-0.082	-0.427	-0.074	0.345	0.008	0.176
44	N	-0.040	-0.381	-0.039	0.342	0.001	0.171
60	N	-0.044	-1.001	0.419	0.958	0.462	0.710
GentaC2a							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
41	N	-0.092	-0.094	0.485	0.003	0.577	0.290
44	N	-0.042	-0.045	-0.017	0.002	0.026	0.014
48	O	-0.110	-0.469	-0.080	0.358	0.030	0.194
51	N	-0.034	-0.301	-0.026	0.267	0.008	0.137
GentaC2b							
No.	Átomos	Neutro	Anión	Catión	f^+	f^-	f^0
48	O	-0.112	-0.482	-0.111	0.370	0.001	0.185
51	N	-0.033	-0.297	-0.028	0.264	0.004	0.134
59	C	0.054	0.048	0.237	0.006	0.184	0.095
60	N	-0.101	-0.102	0.362	0.001	0.462	0.232

Tabla 16. Energías obtenidas de las funciones Fukui condensadas para cada componente de la gentamicina en su forma neutra, catiónica y aniónica con un nivel de teoría M06-2X y conjunto base 6-311+G (d, p) en fase agua. La tonalidad de menor a mayor representa del átomo menos al más electrofílico (f^+), nucleofílico (f^-) y el átomo susceptible a un ataque radicalario (f^0).

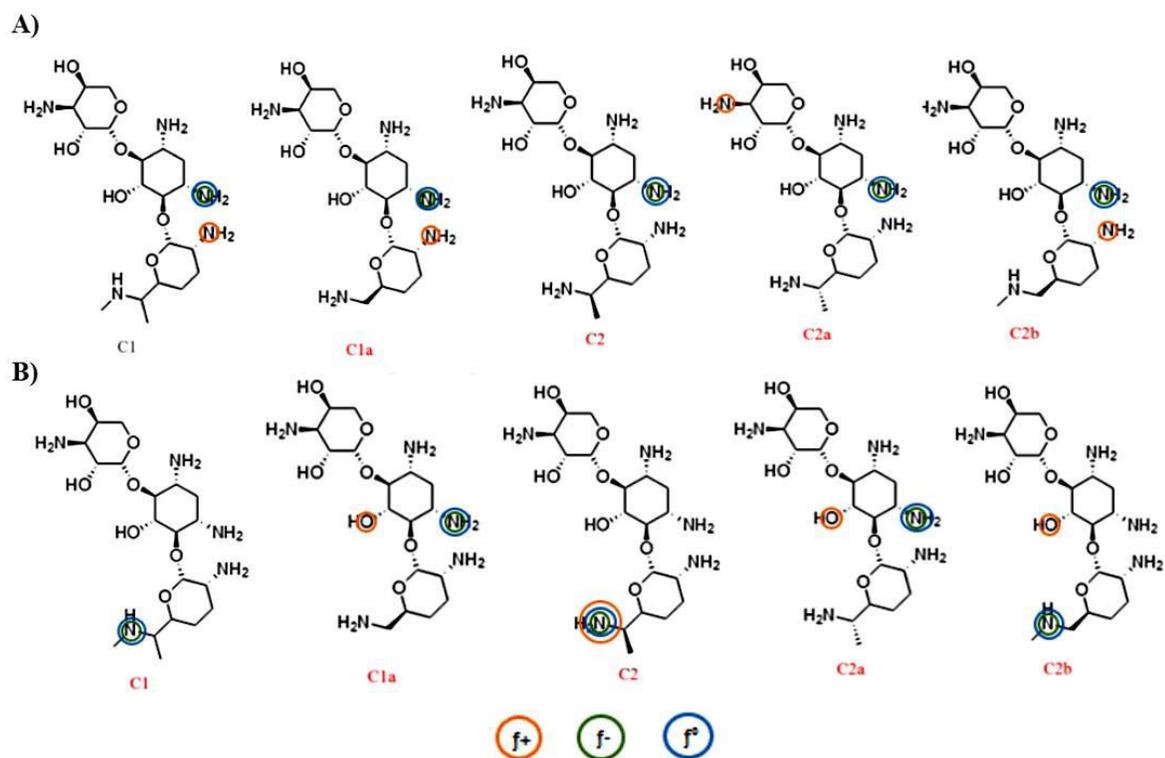


Figura 23. Funciones Fukui en cada componente de la gentamicina en fase gas (superior) y en fase agua (inferior).

En el caso de los descriptores locales de la reactividad, los componentes C1, C2 y C2b comparten los mismo átomos electrofílicos y nucleofílicos, mientras que C2 y C2a difieren considerablemente en el átomo electrofílico.

En fase gas, todos los componentes de la gentamicina muestran una reactividad localizada en los grupos amina del anillo 2-deoxiestreptamina. Esta reactividad indica que el grupo funcional es susceptible a un ataque radicalario y electrofílico. El grupo susceptible a un ataque nucleofílico también es un grupo amina primario en los anillos adyacentes del central (Figura 23. A).

En fase solvente, existe una variación en los grupos susceptibles a un ataque radicalario, nucleofílico y electrofílico. Los grupos en donde se localiza la reactividad se encuentran en el anillo 2-deoxiestreptamina y el anillo inferior a éste (Figura 23. B).

Para el caso de los descriptores que indican la reactividad local en la molécula, se obtuvo de manera general que, los átomos susceptibles a ataques electrofílicos son los grupos funcionales de amina, mientras que los átomos susceptibles a ataques nucleofílicos se encuentran en los grupos hidroxilo. Esto concuerda con la literatura reportada, en donde se ha observado un aumento en la toxicidad de la gentamicina debido a sus grupos amina. Se demostró una relación entre la basicidad

del grupo amina y la DL_{50} estimada en ratones: el aumento de la basicidad del grupo amina se asocia con el aumento de la toxicidad del aminoglucósido (L. Chen et al. 2008).

8.2.2 ESTRUCTURAS HOMOLOGAS

Para la validación de la metodología de construcción de estructuras homologas se usó como control a la estructura terciaria del dominio en solución por RMN de la megalina de rata. Reportado en la base de datos de PDB con el código 2I1P (Wolf et al. 2007). Después de la validación utilizado la metodología establecida del modelado homologo y comprobando el valor de RMSD con el programa UCSF Chimera versión 1.11.2, se procedió al diseño de las estructuras homologas para cada uno de los dominios seleccionados.

8.2.2.1 Validación del método de homología

Control: Estructura del dominio 2I1P, estructura de 48 aa de la duodécima repetición de unión a ligando rica en cisteína en megalina de rata (Figura 24), con un peso de 5.14 kDa.

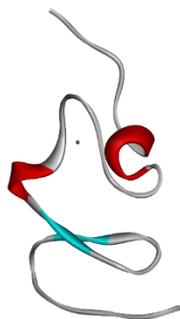


Figura 24. Estructura de 48 aa de la duodécima repetición de unión a ligando rica en cisteína en megalina de rata con un peso de 5.14 kDa. Estructura obtenida de PDB con código de identificación 2I1P.

Modelo homólogo de la estructura obtenida por RMN: Obtención de la estructura homóloga de la duodécima repetición de unión a ligando rica en cisteína en megalina de rata, mediante método de homología.

Generación del modelo de 2I1P homologo mediante I-TASSER

Mediante el programa I-TASSER se generaron las cinco propuestas de modelos que se presentan a continuación (Figura 25).

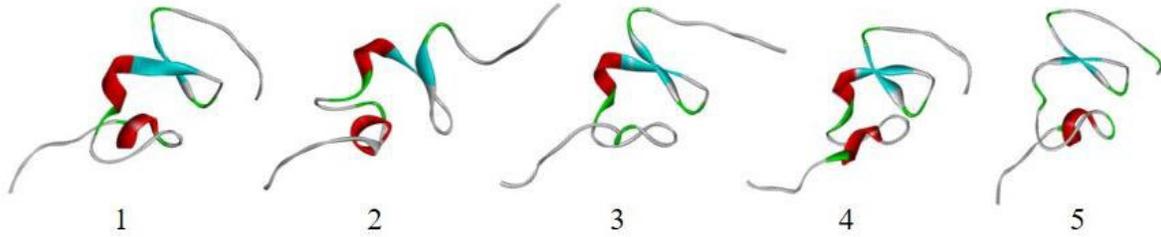


Figura 25. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio 2I1P de la megalina de rata. La enumeración de los modelos propuestos se establece de izquierda a derecha, empezando con el modelo 1 y finalizando con el modelo 5.

Los modelos homólogos, de la estructura del dominio 2I1P, presentan una notable semejanza entre sí. Todos los modelos homólogos contienen dos bucles y dos hojas β plegadas en uno de los extremos.

Evaluación de la calidad de los modelos homólogos de 2I1P mediante ProSaI

Las evaluaciones de las energías estructurales de cada uno de los modelos generados por I-TASSER se llevaron a cabo con el programa ProSaI de manera global y local (Figura 26).

En este programa se posiciona el valor de la energía estructural global y local en un promedio de las energías estructurales de las proteínas cristalizadas y se realiza una comparación entre estos, reportando los siguientes valores.

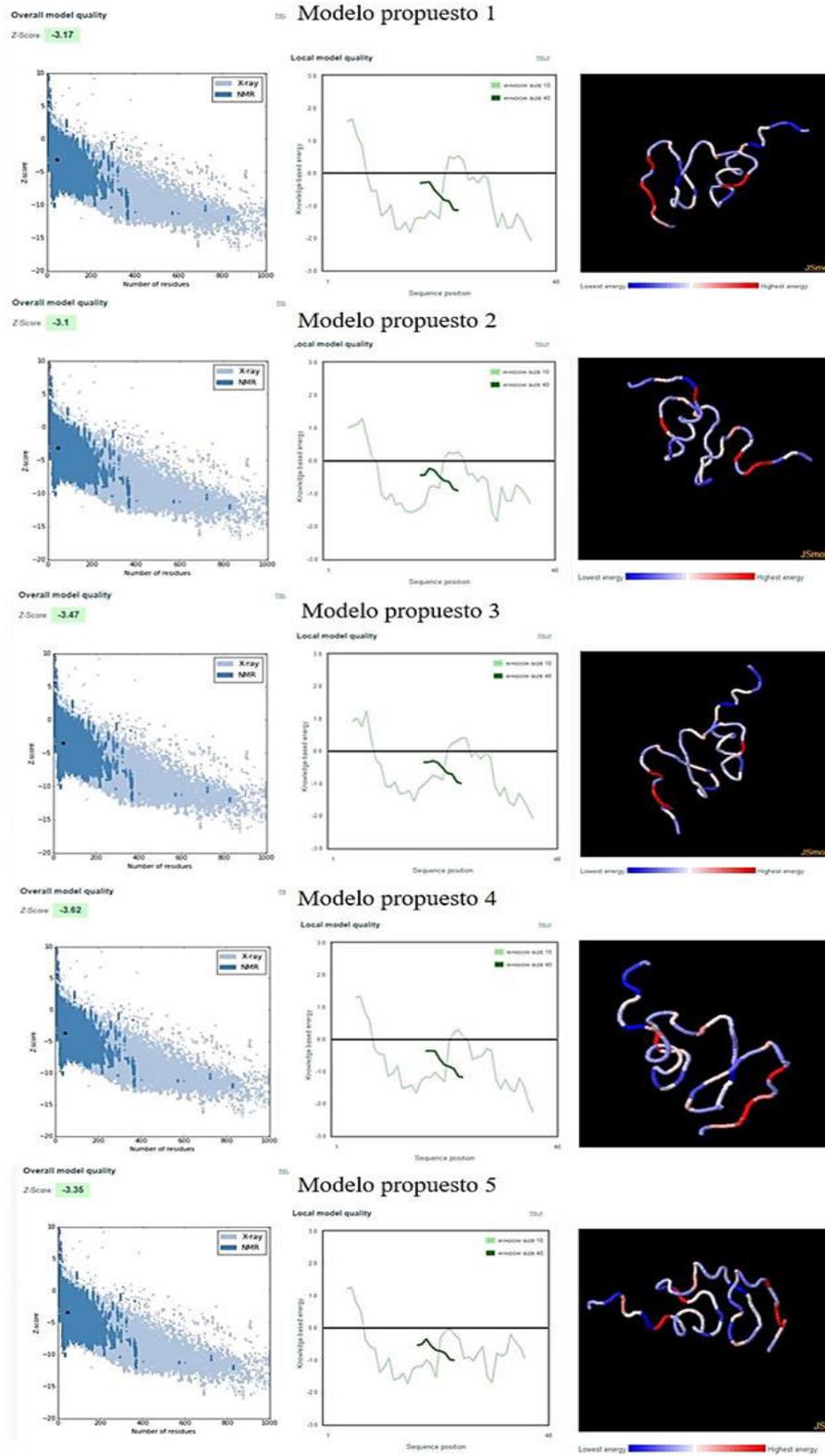


Figura 26. Evaluación de la energía de manera global (izquierda), local (centro) y la estructura del dominio 2I1P en donde las zonas en azul representan zonas de baja energía (estable) y las zonas en rojo representan las zonas de alta energía (inestables).

La evaluación de la energía global estructural de los cinco modelos propuestos (Figura 26. Izquierda) generó los valores de Z-score reportados en la tabla 17.

2I1P homologo	Z-score
Modelo 1	-3.17
Modelo 1	-3.10
Modelo 3	-3.47
Modelo 4	-3.62
Modelo 5	-3.35

Tabla 17. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio 2I1P. El valor de Z-score del modelo 4 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

Los valores de Z-score son puntajes de alineación basados en el perfil y en la estructura de la proteína que se obtienen a través de un método estadístico establecido por el programa de ProSaI. Cada energía derivada de la estructura tridimensional, de manera global, se compara con las energías que poseen las proteínas de tamaño semejante reportadas en PDB en su forma cristalina. De esta manera, la proteína homóloga se posiciona en la gráfica con su valor de Z-score respecto del número de aminoácidos que la conforman.

En la figura anterior (Figura 26. A la izquierda de cada modelo), el punto negro representa a la proteína homóloga obtenida y los puntos azules representan a las proteínas que ya han sido reportadas, mientras más centrado a la zona azul se encuentre nuestro modelo homólogo quiere decir que se asemeja más a lo reportado experimentalmente. En esta evaluación, el modelo homólogo que se centra mejor es el número 4, con un Z-score de -3.62.

En el caso de la evaluación de la energía estructural de manera local se realiza tomando en cuenta la posición de cada aminoácido dentro del modelo homólogo. Así, se obtiene el valor optimizado de la energía. Esta energía puede ser alta o baja, lo que está relacionado con una alta reactividad o estabilidad respectivamente. En el caso de 2I1P, modelado por homología, todos los aminoácidos se encuentran debajo de una línea de referencia (Figura 26. Central) lo que determina una posición estable dentro del dominio. Además, se determinó las zonas con baja y alta energía por medio de una imagen proporcionada por el mismo programa (Figura 26. Derecha).

Con la evaluación de la energía local (Figura 26. central) y el valor de Z-score (Tabla 17) de cada propuesta resulta ser que el modelo número 4 es estadísticamente el mejor modelo homólogo obtenido (Figura 26. Centro).

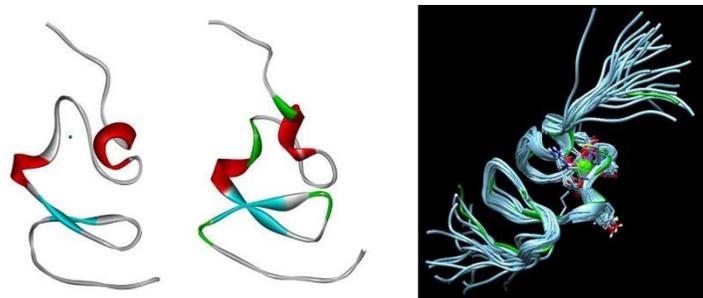


Figura 27. Estructura cristalina de 2I1P (izquierda), estructura homóloga obtenida (centro). Además, se presenta el match entre ambas estructuras terciarias (derecha) con un valor RMSD < 1 obtenido mediante el programa UCSF Chimera versión 1.11.2.

Una vez obtenido el modelo homólogo del dominio 2I1P (Figura 27. Central) se comparó con la estructura cristalizada y reportada de 2I1P en PDB (Figura 27. Izquierda). Esta comparación se realizó haciendo un emparejamiento o alineamiento entre las dos estructuras y se obtuvo una excelente coincidencia entre ambas (Figura 27. Derecha), con este resultado se puede validar la metodología y obtener los demás dominios de la megalina, las cuales no cuentan con estructuras cristalizadas para ser comparadas.

8.2.2.2 Modelos homólogos de los dominios de la megalina.

Smart00135

Generación del modelo Smart00135 mediante I-TASSER

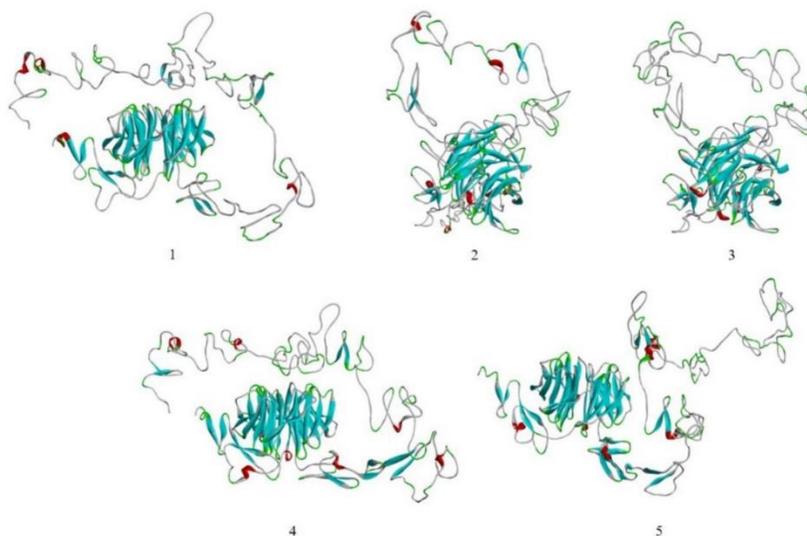


Figura 28. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Smart00135 de la megalina de rata.

Los modelos homólogos obtenidos del dominio Smart00135 presentan una estructura semejante a un canal, rica en hojas β plegadas unidas por segmentos flexibles, sobre una de las caras del canal se estructuró una cadena de aminoácidos que cubre esta zona (Figura 28). Este tipo de estructuras se atribuyen a proteínas de membrana celular.

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Smart00135 mediante ProSaI

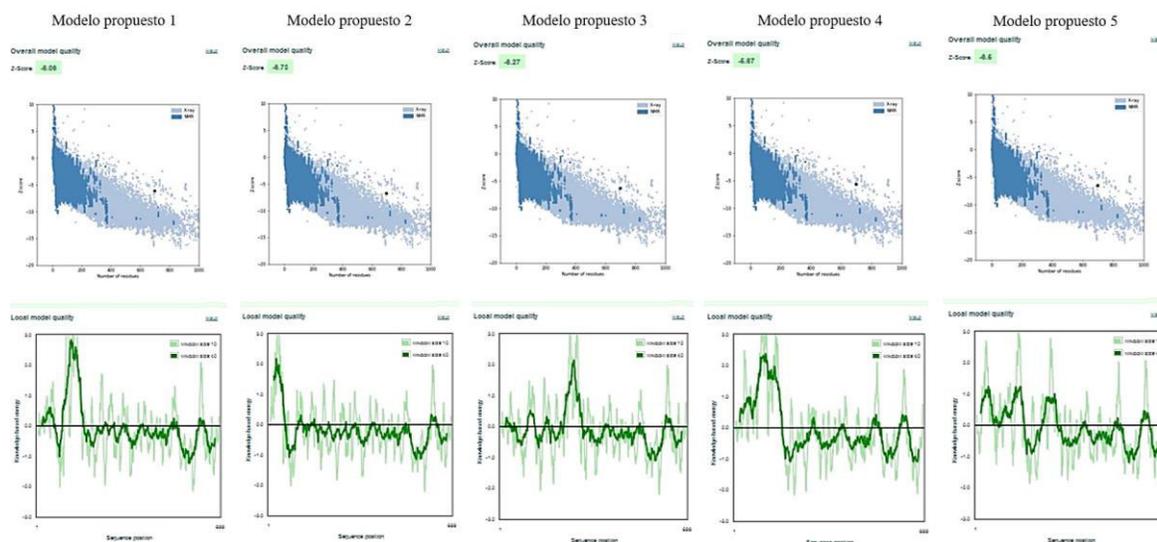


Figura 29. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Smart00135.

En el caso de la evaluación de la energía de las cinco propuestas del dominio Smart00135 se realizó de la misma manera que en la validación de la metodología. Por lo que, el dominio que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 2. Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -8.73 (Figura 29. Superior) como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 18). La mayoría de los aminoácidos que lo conforman tienen posiciones estables, a excepción de un extremo de la cadena (Figura 29. Inferior).

Smart00135 modelo homologo	Z-score
Modelo 1	-8.08
Modelo 2	-8.73
Modelo 3	-8.27
Modelo 4	-6.87
Modelo 5	-8.6

Tabla 18. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Smart00135. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

Cd00112

Generación del modelo homólogo Cd00112 mediante I-TASSER

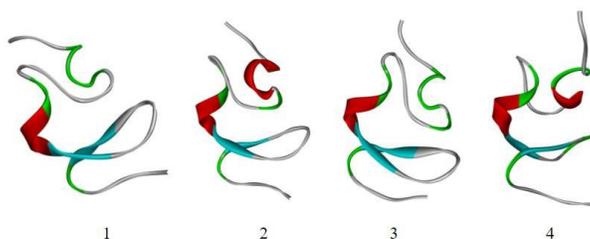


Figura 30. Cuatro modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Cd00112 de la megalina de rata.

Los modelos homólogos obtenidos del dominio Cd00112 fueron solo cuatro, ya que estos presentaban la mejor estructura establecida por las propiedades de los aminoácidos (Figura 30). Estos modelos homólogos contienen un giro establecido por un segmento flexible y dos hojas β -plegadas a los costados.

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Cd00112 mediante ProSaI

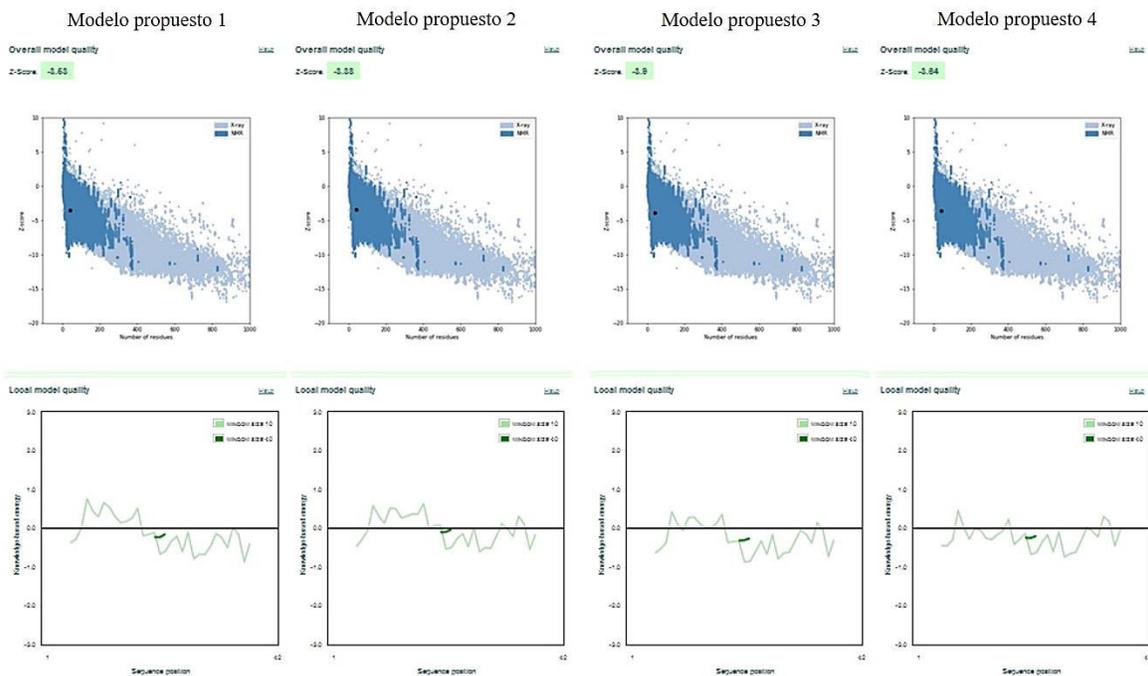


Figura 31. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Cd00112.

Cd00112 modelo homologo	Z-score
Modelo 1	-3.63
Modelo 1	-3.38
Modelo 3	-3.90
Modelo 4	-3.84

Tabla 19. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Cd00112. El valor de Z-score del modelo 3 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

En el caso del dominio Cd00112 el modelo que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 3 (Figura 31. Superior). Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -3.90 como se muestra en la tabla anterior (Tabla 19). En todos los casos de los modelos homólogos obtenidos, los aminoácidos que los conforman tienen posiciones estables, encontrándose el valor de la energía local por debajo de la línea de referencia (Figura 31. Inferior).

Smart00192

Generación del modelo homologo Smart00192 mediante I-TASSER

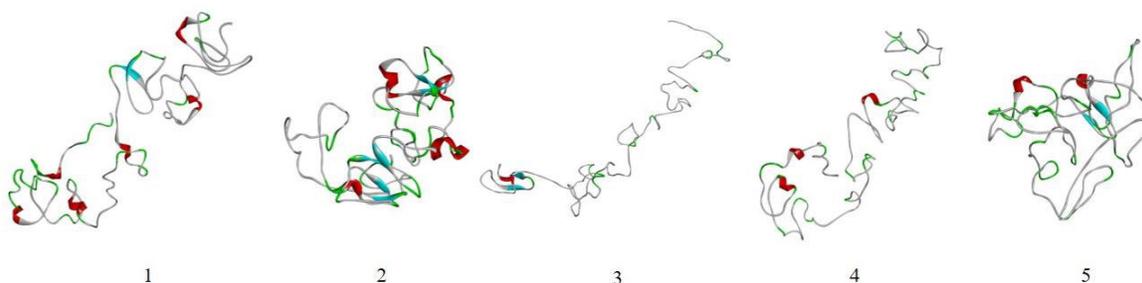


Figura 32. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Smart00192 de la megalina de rata.

En el caso de los modelos homólogos obtenidos para el dominio Smart00192 se obtuvieron diferencias significativas entre cada una de las estructuras generadas por el programa I-TASSER. El modelo 1, 3 y 4 presentan estructuras que están constituidas en su mayoría por segmentos flexibles y en su minoría presentan cadenas α -hélice o hojas β -plegadas. En el caso de los modelos 2 y 5, contienen también segmentos flexibles, lo que genera una ligera contorsión de la proteína (Figura 32).

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Smart00192 mediante ProSaI

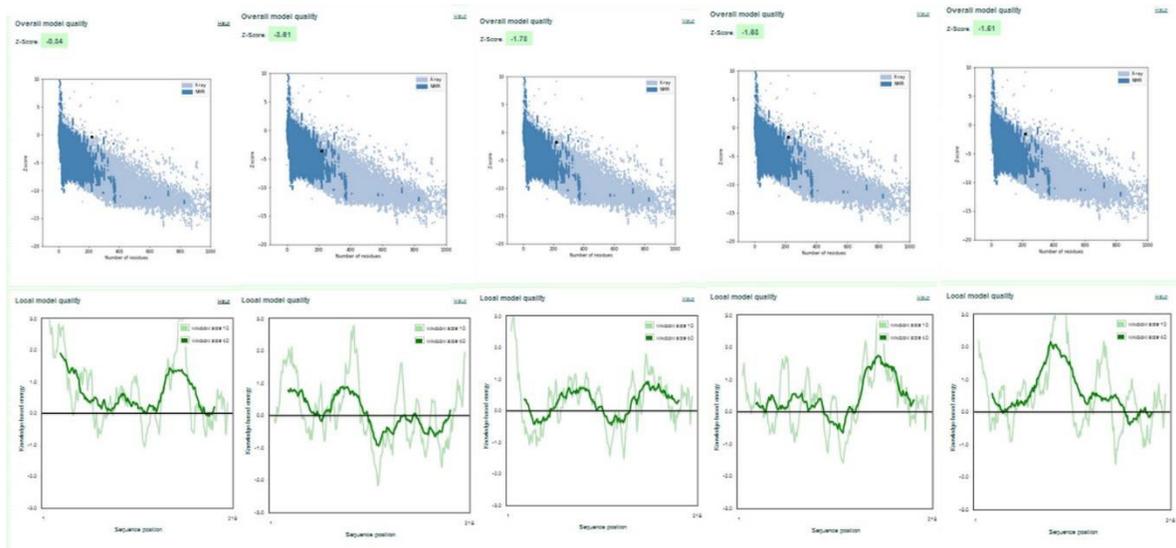


Figura 33. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Smart00192.

En el caso del dominio Smart00192, el modelo que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 2. Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -3.61 (Figura 33. Superior) como se muestra en la tabla inferior (Tabla 20). En todos los casos de los modelos homólogos obtenidos, la mayoría de los aminoácidos que los conforman tienen posiciones inestables, encontrándose el valor de la energía local por arriba de la línea de referencia (Figura 33. Inferior), debido a esta evaluación local se toma al modelo 2 como la mejor propuesta, ya que además de tener el Z-score similar a lo reportado experimentalmente, también contiene menos zonas inestables en la posición de los aminoácidos.

Smart00192 modelo homologo	Z-score
Modelo 1	-0.34
Modelo 2	-3.61
Modelo 3	-1.78
Modelo 4	-1.63
Modelo 5	-1.61

Tabla 20. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Smart00192. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

Pfam00057-58

Generación del modelo homólogo Pfam00057-58 mediante I-TASSER

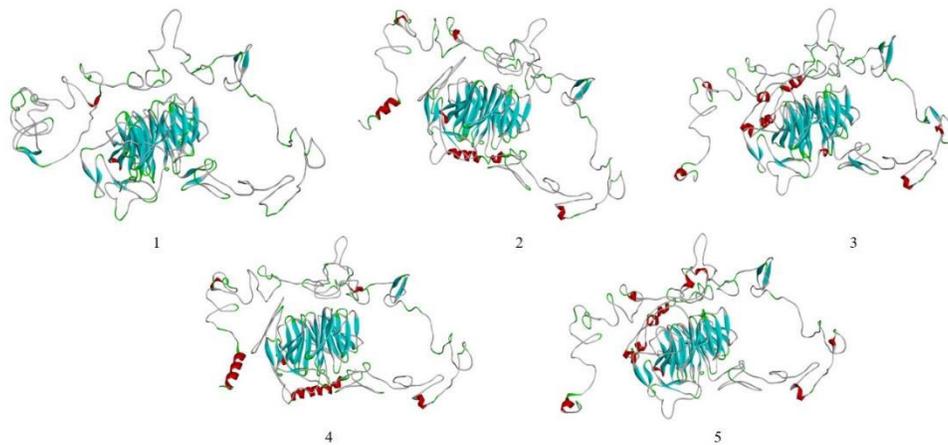


Figura 34. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam00057-58 de la megalina de rata.

Los modelos homólogos obtenidos del dominio Pfam00057-58 presentan una estructura semejante a un canal, de la misma manera que el dominio Smart00135. La diferencia de estas propuestas varía en la cadena que esta junto a una de las caras del canal, esta cadena en el dominio Pfam00057-58 contiene mayor cantidad de cadenas α -hélice y menor cantidad de hojas β -plegadas (Figura 34).

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Pfam00057-58 mediante ProSaI

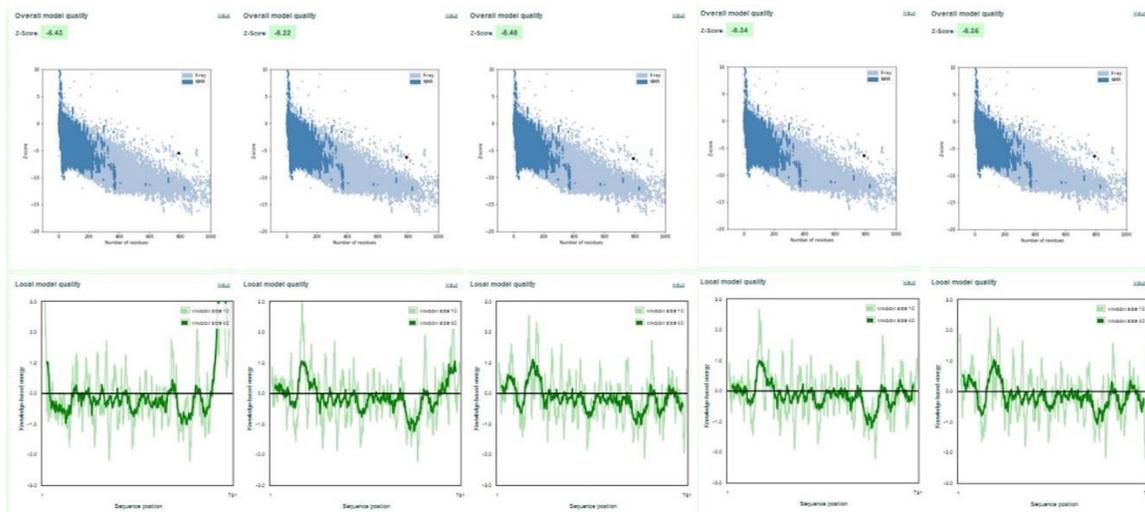


Figura 35. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam00057-58.

Pfam00057-58 modelo homologo	Z-score
Modelo 1	-6.43
Modelo 2	-8.22
Modelo 3	-8.48
Modelo 4	-8.34
Modelo 5	-8.36

Tabla 21. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam00057-58. El valor de Z-score del modelo 3 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

En el caso del dominio Pfam00057-58 el modelo que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 3. Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -8.48 (Figura 35. Superior) como se muestra en la tabla anterior (Tabla 21). En todos los casos de los modelos homólogos obtenidos, la mayoría de los aminoácidos que los conforman tienen posiciones estables, encontrándose el valor de la energía local por debajo de la línea de referencia (Figura 35. Inferior).

Pfam12662

Generación del modelo homologo Pfam12662 mediante I-TASSER

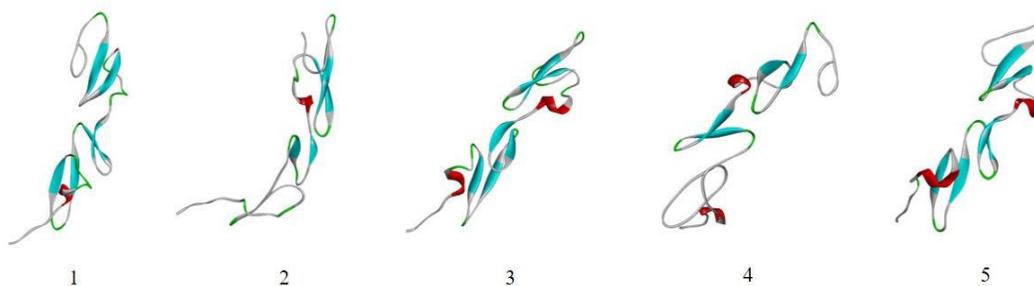


Figura 36. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam12662 de la megalina de rata.

Las estructuras homólogas obtenidas del dominio Pfam12662 fueron semejantes entre sí. Son estructuras alargadas y están conformadas en su mayoría por hojas β -hélice. Tres de las cinco propuestas contienen un par de cadenas α -hélice que permiten girar la cadena (Figura 36).

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Pfam12662 mediante ProSaI

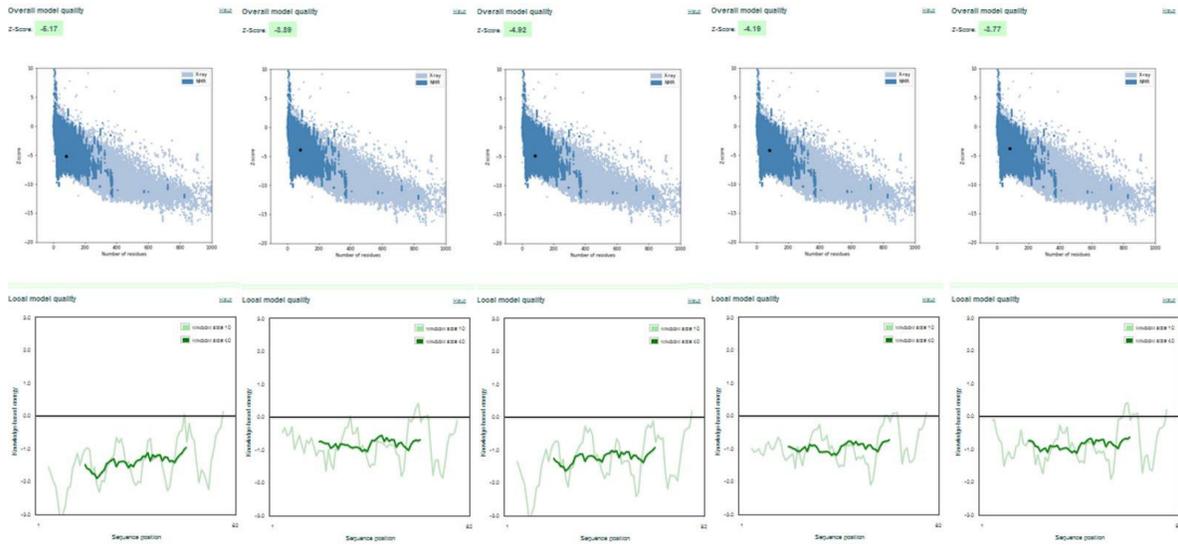


Figura 37. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam12662.

Pfam12662 modelo homólogo	Z-score
Modelo 1	-6.17
Modelo 2	-3.89
Modelo 3	-4.82
Modelo 4	-4.19
Modelo 5	-3.77

Tabla 22. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam12662. El valor de Z-score del modelo 1 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

Del dominio Pfam12662 el modelo que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 1. Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -6.17 (Figura 37. Superior). En la tabla anterior (Tabla 22) se muestran las comparaciones entre los valores de cada modelo propuesto. En todos los casos de los modelos homólogos obtenidos, los aminoácidos que los conforman tienen posiciones estables, encontrándose el valor de la energía local muy por debajo de la línea de referencia (Figura 37. Inferior).

Pfam14670

Generación del modelo homólogo Pfam14670 mediante I-TASSER

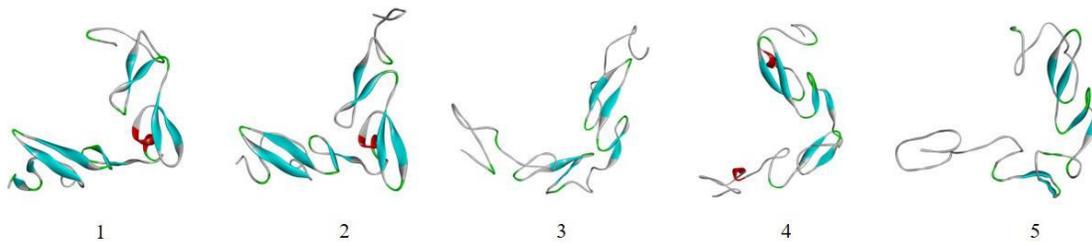


Figura 38. Cinco modelos propuestos como modelos homólogos al dominio Pfam14670 de la megalina de rata.

Las estructuras obtenidas del dominio Pfam14670 presentan una estructura curvada que es permitida por un pequeño segmento flexible entre varias hojas β -plegadas que conforman a los extremos de las propuestas generadas por el programa I-TASSER (Figura 38).

Evaluación de la calidad del modelo homólogo Pfam14670 mediante ProSaI

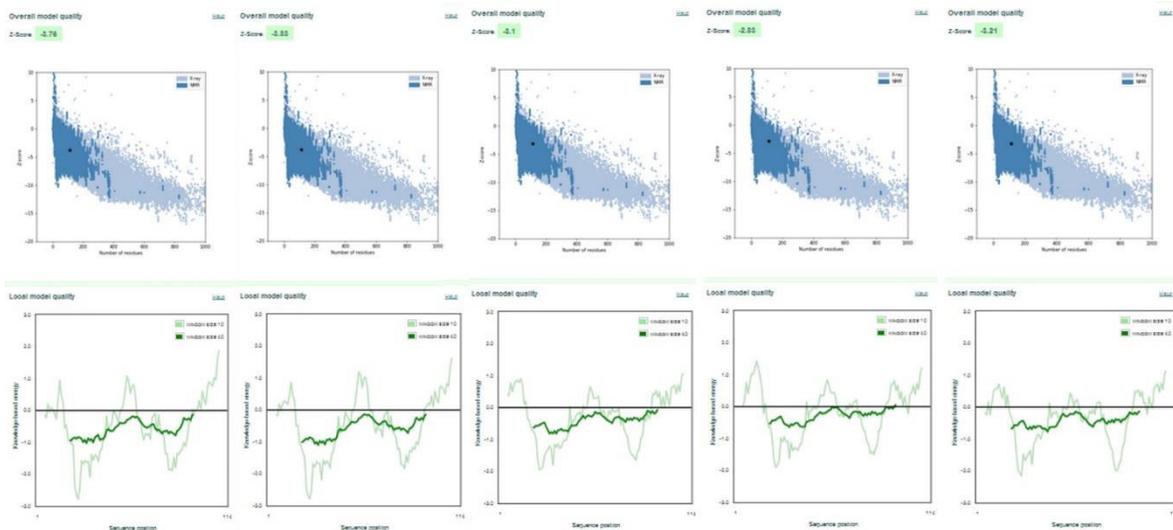


Figura 39. Evaluación de la energía de manera global (superior), local (inferior) de la estructura del dominio Pfam14667.

Del dominio Pfam14667 el modelo que tiene la mejor evaluación en su estructura es el modelo propuesto número 2. Este modelo obtuvo un valor de Z-score de -3.83 (Figura 39. Superior). En la tabla siguiente se muestran las comparaciones entre los valores de cada modelo propuesto (Tabla 23). En todos los casos de los modelos homólogos obtenidos, los aminoácidos que los

conforman tienen posiciones estables, encontrándose el valor de la energía local optimizada por debajo de la línea de referencia (Figura 39. Inferior).

Pfam14670 modelo homologo	Z-score
Modelo 1	-3.78
Modelo 2	-3.83
Modelo 3	-3.1
Modelo 4	-2.83
Modelo 5	-3.21

Tabla 23. Valores de Z-scores obtenidos de cada propuesta de modelo para el dominio Pfam14667. El valor de Z-score del modelo 2 es el que representa un valor más cercano a los valores experimentales reportados.

Con las evaluaciones anteriores de todos los modelos homólogos, se seleccionó la mejor propuesta por cada uno de los dominios estudiados de la megalina, dando como resultado final los modelos presentados en la siguiente Figura (Figura 40).

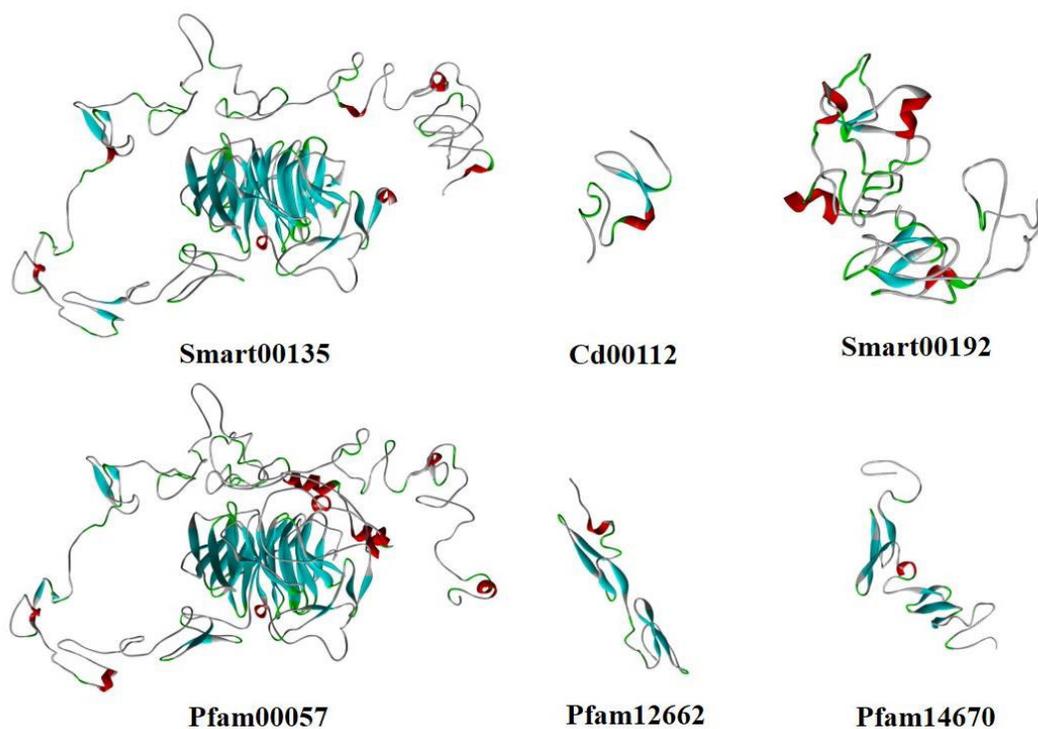


Figura 40. Modelos homólogos seleccionados: Smart00135, Cd00112, Smart00192, Pfam4670, Pfam12662 y Pfam00057-58.

8.2.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR: DOCKING

Lo que se estableció para el acoplamiento molecular fue una interacción entre los tres componentes principales de la gentamicina C1, C1a y C2 con cada uno de los modelos homólogos que se obtuvieron en el método de homología: Smart00135, Cd00112, Smart00192, Pfam4670, Pfam12662 y Pfam00057-58 (Figura 41).

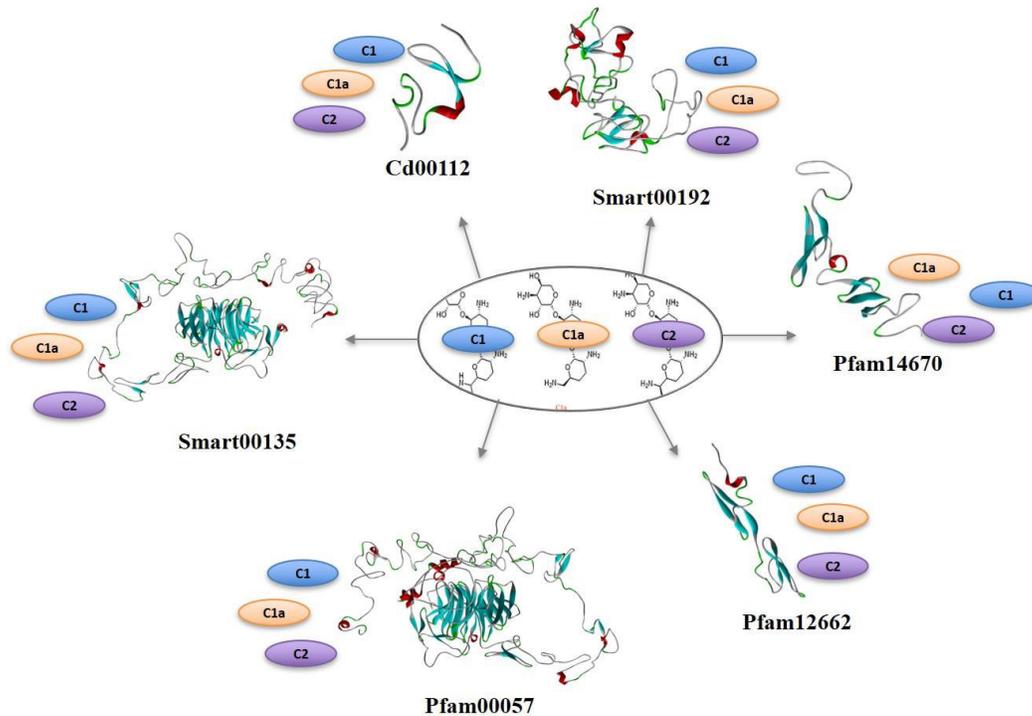


Figura 41. Esquema establecido para el acoplamiento molecular entre los tres componentes principales de la gentamicina C1, C1a y C2 con cada uno de los modelos homólogos que se obtuvieron en el método de homología: Smart00135, Cd00112, Smart00192, Pfam4670, Pfam12662 y Pfam00057-58.

8.2.3.1 Interacción GentaC1-Dominios

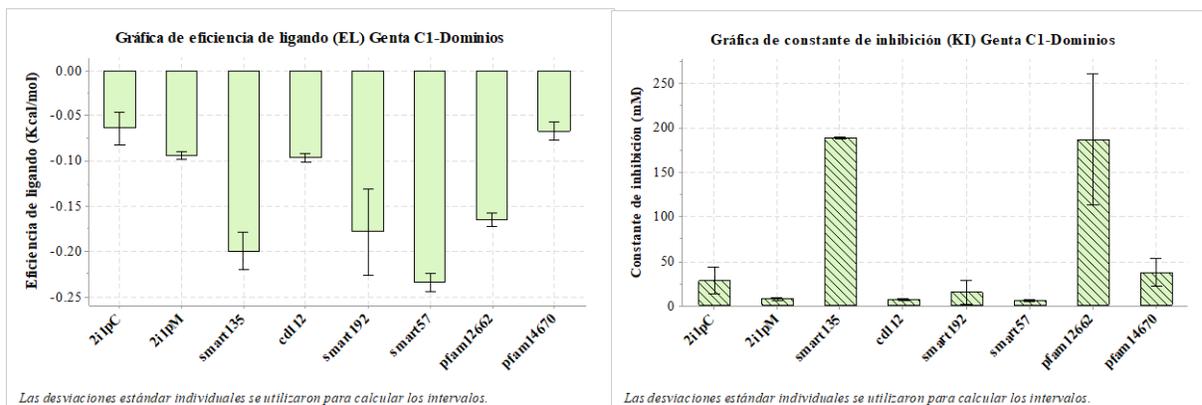


Figura 42. Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares entre el componente principal C1 de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).

La interacción de C1 con los dominios de 2IIP cristalizado y homólogo presento un valor menor de eficiencia de ligando (energía de interacción o actividad dividida entre el total de átomos pesados del ligando) y muy bajo valor de la constante de inhibición, como se ha reportado en estudios anteriores con la metodología docking (Wolf et al. 2007). El componente C1 tiene un valor de eficiencia de ligando más negativo con los dominios Smart00135 y Smart00057-58 (Figura 42. Izquierda). Los valores más negativos de la eficiencia de ligando indican una mejor interacción entre el fármaco y la macromolécula, ya que representa la energía que está involucrada en la unión de los átomos involucrados. Los dominios que obtuvieron los mejores valores de eficiencia de ligando presentan una estructura similar a un canal, y la interacción se da sobre la cara del canal que esta junto al asa que lo envuelve (Figura 43).

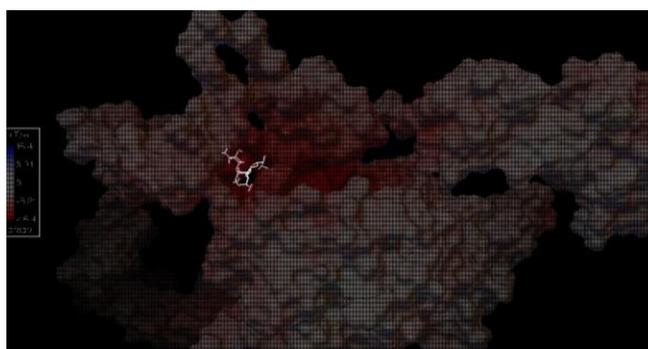


Figura 43. Mapa de la superficie del potencial del dominio Smart00135 con el ligando GentaC1. La interacción se da cerca de cavidad central del dominio, la cual se asemeja a un túnel. El color rojo indica las zonas con mayor cantidad de densidad electrónica y el azul a la de menor, la escalada del potencial electrostático es de 15.4 Kcal/mol a -15.4 Kcal/mol.

En el caso de la constante de inhibición, solo los dominios Smart00135 y Pfam12662 tienen valores altos, cercanos a 175 mM (Figura 42. Derecha). Los valores altos de la constante de inhibición indican que se necesitaría una gran cantidad del fármaco, en este caso del componente de la gentamicina, para inhibir la interacción del fármaco y la macromolécula.

La interacción del componente de la gentamicina y el dominio homólogo Smart00135 es la única que presenta una fuerte energía de eficiencia de ligando, lo que determina la gran estabilidad que posee, y un valor alto de constante de inhibición, lo que indica que, la unión entre el componente C1 y el modelo homólogo Smart00135 se dará hasta que haya gran cantidad de fármaco.

Posiblemente, este dominio de la megalina, el modelo Smart00135, es el que permite la acumulación del componente C1 en las células tubulares proximales, debido a las propiedades que posee.

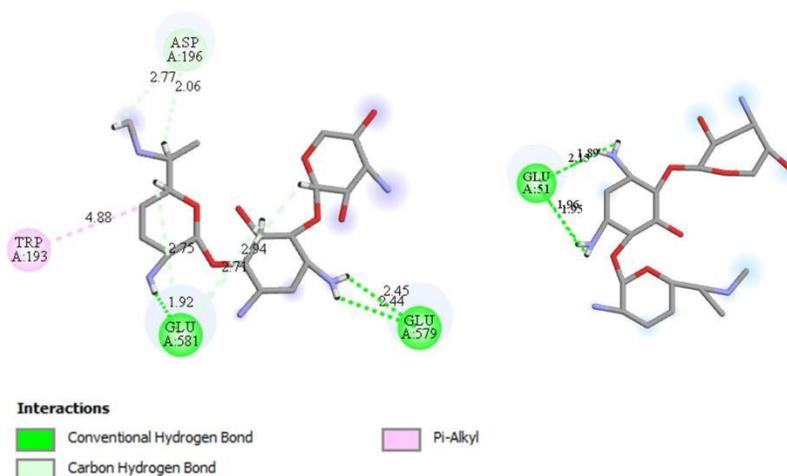


Figura 44. Tipos de interacciones entre el componente C1 de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart00135 (izquierda) y los aminoácidos del dominio Pfam14670 de la megalina (derecha).

Las interacciones entre el componente C1 con la macromolécula se da gracias a los aminoácidos que la conforman. Estas interacciones pueden ser de baja o de alta fuerza, dependiendo del enlace que une al aminoácido con el ligando.

En el caso del componente C1 de la gentamicina se obtuvieron tres tipos de interacciones con el modelo Smart00135 de la megalina. Estas tres interacciones son enlaces de hidrógeno, enlaces carbono-hidrógeno e interacciones pi-alquilo. Este conjunto de interacciones permite una fuerte unión de C1 con el dominio Smart00135 de la megalina (Figura 43. Izquierda). En cambio, hay uniones de C1 con otros dominios de la megalina que presentan interacciones débiles o bajas en número, como lo es la unión con el dominio Pfam14670 (Figura 43. Derecha), en donde solo existen interacciones de enlaces de hidrógeno.

El tipo de interacciones entre el ligando y la macroproteína son de suma importancia ya que el tipo de enlace proporciona la información de la energía que involucra a la eficiencia de ligando y a la constante de inhibición, que nos dirán que tan fácil o difícil será que un fármaco interactúe y/o permanezca en el receptor biológico.

8.2.3.2 Interacción GentaC1a-Dominios

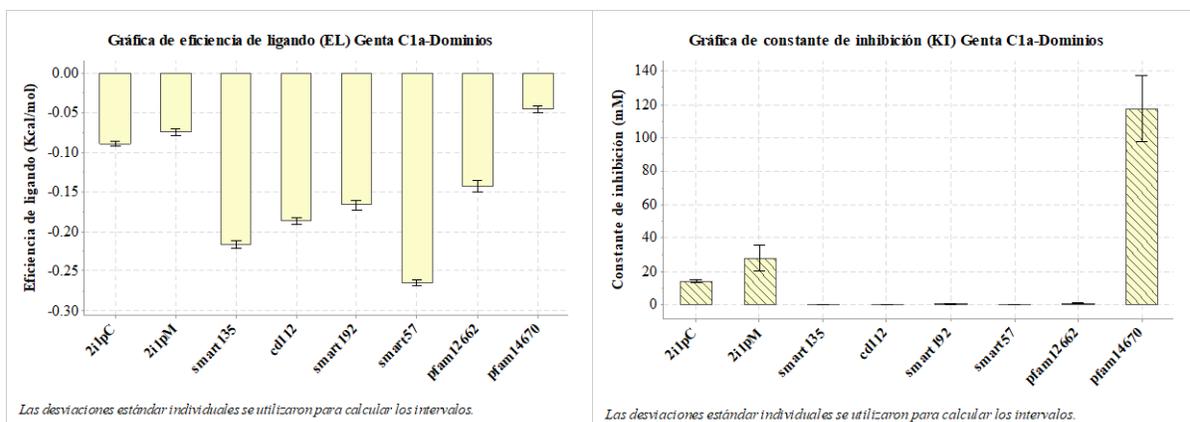


Figura 45. Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares entre el componente principal C1a de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).

El acoplamiento del componente C1a de la gentamicina con el modelo homólogo Smart00057-58 presentó el valor más negativo de eficiencia de ligando (EL). Los valores menos negativos, que serán los acoplamientos menos estables, se obtuvieron con los modelos homólogos de 2I1P cristalizado, 2I1P homólogo y Pfam14670 (Figura 44. Izquierda). Contrario a estos valores desfavorables de EL en los tres dominios, los valores de constante de inhibición fueron los más altos, teniendo un notable incremento para el dominio Pfam14670, alrededor de 120 mM (Figura 44. Derecha).

Con estos resultados se tiene que, el componente C1a de la gentamicina tiene una buena estabilidad al unirse al dominio Smart00135, pero se necesitaría de muy poca concentración del componente para inhibir la interacción, por lo que no podría acumularse en las CTPs.

El modelo Pfam14670 y ambas estructuras de 2I1P muestran una mala estabilidad al interactuar con el componente C1a. Sin embargo, estos mismos dominios requieren de grandes cantidades del fármaco para inhibir esta interacción.

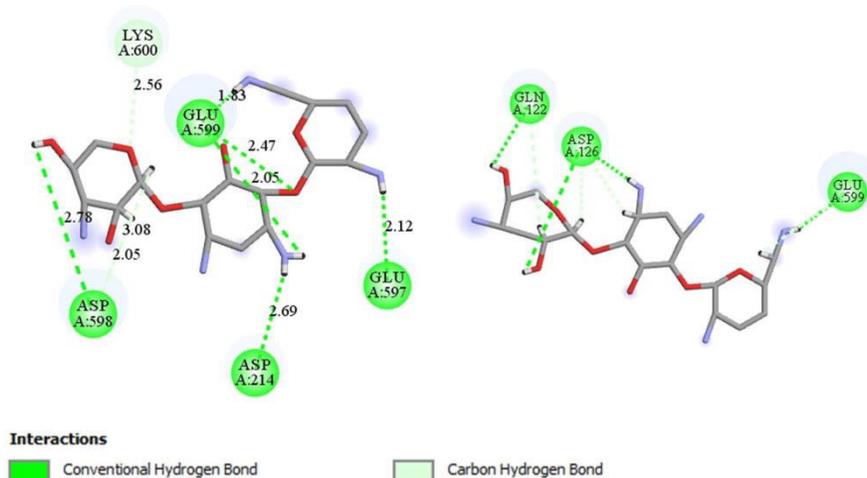


Figura 46. Tipos de interacciones entre el componente C1a de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart0057-58 (izquierda) y los aminoácidos del dominio Pfm14670 de la megalina (derecha).

El tipo de interacciones que tiene el componente C1a de la gentamicina con el modelo homólogo Smart00135 son puentes de hidrogeno y enlaces covalentes carbono-hidrogeno. En el caso de la interacción con el modelo Pfm14670 solo se presentan enlaces carbono hidrogeno y se encuentran en menor cantidad (Figura 45. Izquierda). Además, C1a es el único componente principal de la gentamicina que muestra una interacción en el grupo funcional que hace diferentes a los componentes de la gentamicina (Figura 45. Derecha), esta única interacción es de tipo carbono-hidrogeno, la cual no es una interacción fuerte.

8.2.3.3 interacción GentaC2-Dominios

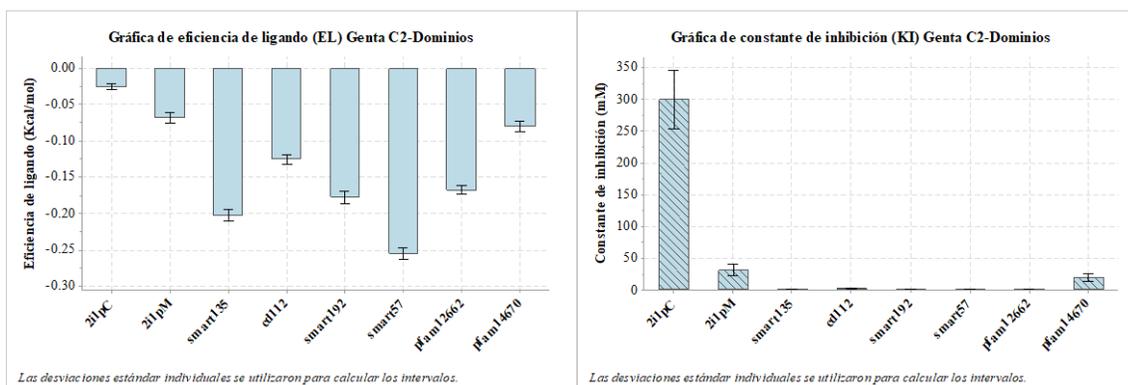


Figura 47. Gráfica de los resultados obtenidos de los acoplamiento molecular entre el componente principal C2 de la gentamicina y cada uno de los modelos homólogos obtenidos. Se muestra el resultado de la energía de eficiencia de ligando (izquierda) y el valor de la constante de inhibición (derecha).

El componente principal de la gentamicina C2 tiene un valor más negativo de eficiencia de ligando (EL) con los dominios que se asemejan a un canal, Smart00135 y Smart00057-58. Sin embargo, los valores de la constante de inhibición, en estos casos, son muy bajos (Figura 46. Izquierda). Esto indica que el componente C2 de la gentamicina tiene una interacción estable con los modelos Smart00135 y Smart00057-58 pero se requiere de una escasa cantidad del fármaco para inhibir esta unión.

C2 es el único componente principal que tiene notable incremento en la constante de inhibición (KI) con el dominio 2I1P cristalizado y bajos valores con los modelos homólogos obtenidos. Además, parece ser que la respuesta de KI es inversamente proporcional a la eficiencia de ligando, en donde se tiene un valor menos negativo para el caso de la interacción con el dominio 2I1P en solución por RMN (Figura 46. Derecha).

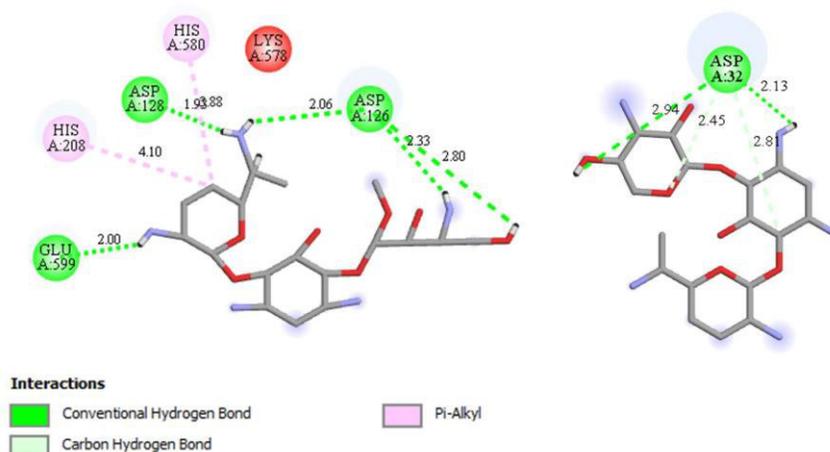


Figura 48. Tipos de interacciones entre el componente C2 de la gentamicina con los aminoácidos del dominio Smart00057-58 (izquierda) y los aminoácidos del dominio 2I1P de la megalina (derecha).

Las interacciones que muestra el componente C2 de la gentamicina con los dominios con una eficiencia de ligando estable, dominio Smart00057-58, y con una eficiencia de ligando no estable, dominio 2I1P homólogo, son de distintos tipos. En el caso de la unión con el dominio Smart00057-58, se tienen tres interacciones del tipo enlaces carbono-hidrogeno y dos interacciones pi-alquilo (Figura 47. Izquierda). La unión con el dominio 2I1P homólogo es inestable debido al tipo de interacciones que posee, las cuales son dos enlaces de hidrogeno y solo un enlace carbono-hidrogeno (Figura 47. Derecha).

8.2.3.4 Efectos principales

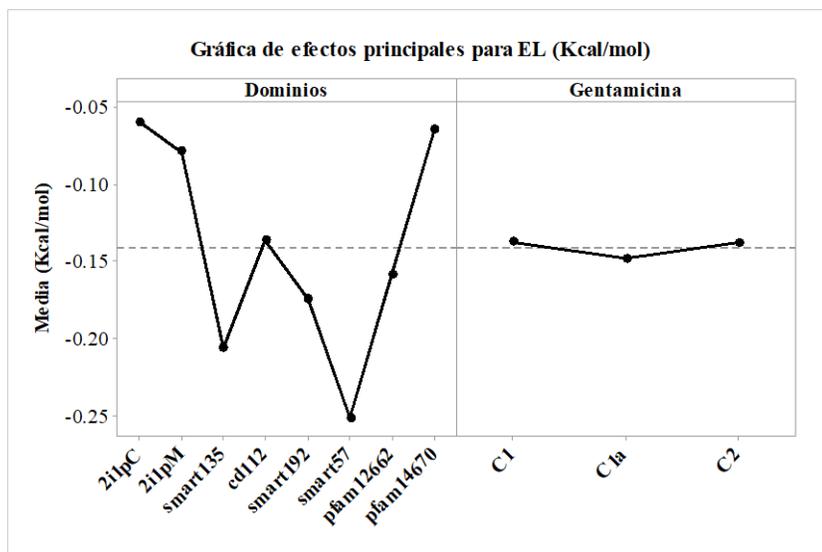


Figura 49. Gráfica de los efectos principales entre cada factor estudiado. Se muestra el efecto de la eficiencia de ligando entre los dominios de la megalina (izquierda) y el efecto de la eficiencia de ligando sobre los componentes principales de la gentamicina (derecha).

En caso de la respuesta de eficiencia de ligando que se obtuvo con cada uno de los factores estudiados, dominios y componentes principales de la gentamicina, se tiene una diferencia notoria entre las medias de los modelos homólogos de la megalina. Esta diferencia indica un efecto marcado entre las variables del factor estudiado. Además, se puede notar que ninguna media de un dominio tiene semejanza con otro. Para la respuesta en el factor de los componentes de la gentamicina, las medias de las variables son muy similares, por lo que la unión entre las tres se asemeja a una línea recta, esta característica entre las variables indica que el efecto estudiado no es marcado (Figura 48).

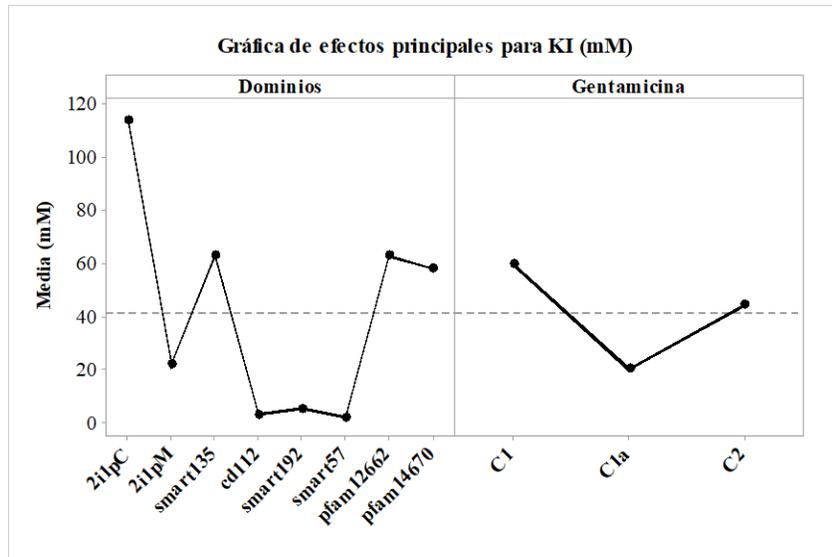


Figura 50. Gráfica de los efectos principales entre cada factor estudiado. Se muestra el efecto de constante de inhibición entre los dominios de la megalina (izquierda) y el efecto de la eficiencia de ligando sobre los componentes principales de la gentamicina (derecha).

El efecto en la respuesta de la constante de inhibición se muestra más marcado para el caso de los componentes de la gentamicina que en la respuesta de la eficiencia de ligando.

En la gráfica anterior (Figura 49), se puede observar los valores de las medias entre las respuestas obtenidas. En los dos factores estudiados, dominios de la megalina y componentes principales de la gentamicina, no se observa la formación de una línea recta, lo que indica que no existe un efecto principal entre los factores.

Existe una similitud entre las medias de tres dominios de la megalina, Cd00112, Smart00192 y Smart00057-58. Esta similitud de medias indica que no existe un efecto principal entre estas variables.

8.4 PROPIEDADES ADMET DE LOS COMPONENTES DE LA GENTAMICINA

PROPIEDADES	Clave	Compuesto de gentamicina					
		C1	C1A	C2	C2A	C2b	
A	Permeabilidad en las células Caco-2	Caco-2	6.41	4.37	5.12	5.12	6.02
	Absorción intestinal humana	HIA	3.34	2.12	2.31	2.31	3.05
	Permeabilidad en las células de riñón de perro Madin-Darby	MDCK	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51
	Permeabilidad de la piel	SP	-5.26	-5.27	-5.26	-5.26	-5.27
D	Penetración de la barrera hematoencefálica	LogBB	0.06	0.42	0.28	0.28	0.10
	Unión a proteínas plasmáticas	PPB	44.80	41.82	42.54	42.54	43.98
	logaritmo de coeficiente de partición octanol-agua	LogP	-3.68	-4.22	-3.85	-3.85	-4.05
M	Citocromo P450-2D6/Inhibición	CYP_2D6-I	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor
	Citocromo P450-2D6/Sustrato	CYP_2D6-S	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato	Sustrato
	Citocromo P450-3A4/Inhibición	CYP_3A4-I	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor	Inhibidor
	Citocromo P450-3A4/Sustrato	CYP_3A4-S	Débil	Débil	Débil	Débil	Débil
E	Solubilidad en agua (mg/mL)	SA	70.41	34.81	21.48	21.48	114.20
T	Prueba Ames	AMES	Mutagénico	Mutagénico	Mutagénico	Mutagénico	Mutagénico
	<i>Salmonella typhimurium</i> cepa 100	TA100	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	<i>Salmonella typhimurium</i> cepa 1535	TA1535	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 24. Propiedades calculadas de absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad (ADMET) de cada uno de los componentes de la gentamicina.

Usando el software PreADMET, se determinaron las propiedades ADMET de cada uno de los componentes de la gentamicina (Tabla 24). Se verificaron las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano heterogéneo (células Caco-2) y modelos de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) para la absorción de drogas orales y la predicción de la permeabilidad de la piel y el modelo de absorción intestinal humana para la predicción de absorción de drogas. La célula

MDCK tiene una vida útil menor que la vida útil de las células Caco-2, por lo tanto, se dice que la correlación entre ellas es alta. El sistema celular MDCK puede servir como una buena herramienta para la detección rápida de permeabilidad. Todos los componentes de la gentamicina mostraron una permeabilidad media en las células Caco-2. Para el caso de la línea celular canina, solo el componente C1 mostro una absorción buena y los demás componentes mostraron una mala absorción. Los datos de la absorción intestinal humana representan la suma de biodisponibilidad y absorción evaluada a partir de la excreción acumulada en orina, bilis y heces. Todos los componentes de la gentamicina mostraron una mala absorción intestinal mediante el modelo empleado. Estos resultados computacionales concuerdan con datos experimentales (Ranaldi, Islam, and Sambuy 1992), en donde la ineficiente permeabilidad de la gentamicina a las células intestinales se relaciona a que el aminoglucósido es una molécula hidrófila de gran tamaño, por lo que es poco probable que se difunda a través de las membranas o a través de las uniones estrechas. En algunos estudios experimentales, se recomiendan el uso de potenciadores de la permeabilidad para aumentar la biodisponibilidad oral de este tipo de fármacos (Moghimpour et al. 2016). En el caso de la administración transdérmica de medicamentos, los componentes de la gentamicina mostraron una buena absorción en el estrato corneo de la epidermis, la zona más externa de la piel. De manera general los componentes de la gentamicina no presentan una absorción eficiente cuando son administrados de manera oral, la mejor vía de administración podrá ser dérmica u otra alterna , como se propone experimentalmente (L. Chen et al. 2008).

Algunos fármacos liposolubles (p. ej., tiopental) penetran con facilidad en el encéfalo, pero los compuestos polares no. Esto es debido a la denominada barrera hematoencefálica, que está formada por el endotelio de los capilares encefálicos y la capa de astrocitos. Para el caso de los componentes C1a, C2 y C2a de la gentamicina, presentan una absorción media al sistema nervioso central.

El coeficiente de reparto, que es un modelo físico que se obtiene del logaritmo de la concentración del fármaco en una fase orgánica entre la concentración de este en fase acuosa (polar), indica el carácter hidrófilo o hidrófobo de una sustancia, es decir su mayor o menor tendencia a disolverse en disolventes polares (como el agua) o en disolventes apolares (como los disolventes orgánicos). Los coeficientes de partición o reparto son usados, por ejemplo, para estimar la distribución de fármacos en el cuerpo. Los fármacos con elevados coeficientes de partición son hidrófobos y se distribuyen preferentemente en entornos hidrófobos como las bicapas lipídicas de las células, mientras que los fármacos con coeficientes de reparto bajos son hidrófilos. Todos los componentes de la gentamicina presentaron valores bajos del logaritmo de partición, lo que indica que son componentes hidrófilos y se encontraran preferentemente en los entornos hidrófilos como el suero sanguíneo.

El porcentaje de unión a proteínas indica cuando un fármaco tendrá una alta o baja afinidad a las proteínas transportadoras que se encuentran en el plasma sanguíneo. Un fármaco con un porcentaje mayor a 90% permanece unido a las proteínas transportadoras en el suero sanguíneo, sin llegar a su sitio de acción. Los componentes de la gentamicina tienen un valor bajo de unión a las proteínas plasmáticas, por lo que podría llegar fácilmente a su sitio de acción.

Los compuestos seleccionados se estudiaron frente a enzimas de la familia del citocromo P450 que incluyen CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 y CYP2C19. Estas son las enzimas más importantes

para el metabolismo de las drogas en humanos. Cuando un fármaco inhibe a las enzimas quiere decir que no hay riesgo de que la descomposición de este fármaco de lugar a metabolitos tóxicos. De los componentes de la gentamicina todos inhiben a dos de las más importantes enzimas metabólicas, CYP3A4 y CYP2D6 a pesar de ser un sustrato de inhibición débil frente a esta última enzima.

El funcionamiento normal del hígado y los riñones (principalmente) es responsable de la eliminación completa de un medicamento del cuerpo. Por esa razón se busca que el fármaco tenga una buena solubilidad en agua para una eliminación eficiente a través de la orina. Lo que se obtuvo como propiedad de eliminación de los compuestos de la gentamicina fue la solubilidad. Cada uno de los componentes mostraron un valor de solubilidad muy eficiente.

La prueba de AMES utiliza cepas de *S. typhimurium* auxótrofas a histidina (cepas que necesitan histidina en el medio de cultivo para poder crecer). Las cepas TA_1535 y TA_100 son auxótrofas a histidina que, si llegan a estar en presencia de un agente mutagénico, que sea capaz de revertir esta propiedad, podrán crecer en un medio sin histidina, convirtiéndose en cepas prototrofas a histidina (cepas que no necesitan histidina en el medio de cultivo para poder crecer). Esta propiedad les confiere la capacidad de detectar compuestos que causan mutaciones genéticas por corrimiento del marco de lectura (causada por la inserción o eliminación de un número de nucleótidos que no es múltiplo de tres en una secuencia de ADN) o por sustitución de pares de bases de ADN. La cepa TA_100 generalmente tiene una mayor sensibilidad a la agresión mutagénica en comparación con la cepa TA_1535 ya que contiene un gen mucAB en el plásmido pKM101, el cual es eficaz para promover la mutagénesis (Zeiger, Risko, and Margolin 1985). Sin embargo, nuestros resultados muestran que para la cepa TA_1535 todos los componentes de la gentamicina tienen la capacidad de mutar a la bacteria y hacerla capaz de crecer en un medio en el que normalmente no lo haría. En el caso de la cepa TA_100 el crecimiento solo con C1 dio positivo. Este resultado podría deberse a que el número de revertientes inducidos es pequeño y similar en las dos cepas bacterianas. La mutagenicidad de la gentamicina se detectará, en general, más fácilmente en la cepa TA_1535 porque el recuento de mutantes de fondo es mucho menor (8-20) que en la cepa de TA_100 (90-160). Este tipo de casos se ha reportado experimentalmente con otras sustancias mutagénicas (Prival and Zeiger 1998). Con ambos resultados, se dice que todos los componentes de la gentamicina son mutagénicos en la prueba de AMES, lo que concuerda con la literatura (Mitchell et al. 1980).

9. CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que los niveles de KIM-1 siempre se correlacionan con la expresión de p-ERK ½ citoplasmática en riñón. Ninguna otra de las proteínas estudiadas mostró correlación con KIM-1. Con esto se podría decir que la activación de KIM-1 y la expresión de p-ERK ½ comparten un mecanismo molecular común en la progresión del daño renal.

El biomarcador KIM-1 se hace presente en una exposición aguda y subaguda de diferentes tóxicos con un patrón distinto. Los valores de KIM-1 son mayores en la exposición a plomo que a gentamicina. En el caso del plomo observamos que los riñones procesan a una regeneración celular. En el caso de gentamicina se dirigen hacia una necrosis.

Para la gentamicina, en las primeras etapas de administración hay un aumento significativo respecto a la dosis que luego disminuye en los tiempos de recuperación, lo que significa que el daño en el tejido es irreversible.

En el caso de la intoxicación con el plomo se ve el mismo aumento durante la administración del tóxico y una disminución en las primeras etapas de recuperación. Sin embargo, ocurre un aumento en las últimas etapas de recuperación. Este aumento hace suponer que, se debe al crecimiento y proliferación celular, como lo que se ha encontrado en KIM-1. El biomarcador facilita el proceso de reparación promoviendo la migración y proliferación celular para ocupar los espacios vacíos de la membrana (primer paso de la reparación) regulando la unión célula-célula (Z. Zhang and Cai 2016).

Tomando en cuenta el proceso de diferenciación celular, con p-ERK ½ se observan valores elevados en los tiempos posteriores del modelo de plomo, p-ERK ½ activada en el citoplasma en grandes concentraciones indica un proceso de crecimiento y proliferación celular. Lo que está relacionado con que el biomarcador KIM-1 es dependiente de la dosis. Zhang y colaboradores (Z. Zhang and Cai 2016) encontraron que la expresión de KIM-1 facilita el proceso de reparación, promoviendo la migración y proliferación celular, lo que está ampliamente regulado por la ruta de señalización ERK-MAPK. El movimiento y proliferación celular es para cubrir sitios vacíos de la membrana, siendo éste el primer paso de la reparación. La modulación de la expresión de KIM-1 en las CTPs podría representar un enfoque terapéutico para facilitar la recuperación de AKI. Con gentamicina ocurre una activación temprana para después desaparecer y con plomo la activación del proceso de diferenciación ocurre en los tiempos posteriores, siendo dependiente de la dosis.

La expresión de TRPV5, DMT1 y p21 tienen diferencias entre tóxicos, pero no existe una correlación, hay pocos datos reportados en donde se sugiere que la localización citoplasmática de ERK está relacionada con el transporte de iones. DMT1 y TRPV5 se relaciona con el transporte de metales pesados presentando diferentes comportamientos entre la administración de gentamicina y de plomo. El tratamiento con gentamicina no presenta cambios en los niveles de DMT1, caso contrario al modelo de toxicidad con plomo en donde se ve un aumento poco significativo respecto a la dosis durante el tratamiento. Por lo que se sugiere a DMT1-1 como un acumulador de plomo en órganos por estar relacionado en la absorción y metabolismo de muchos metales esenciales.

TRPV5 disminuye ligeramente en gentamicina y en el modelo de plomo aumenta ligeramente durante el tiempo de exposición para posteriormente disminuir en los tiempos de recuperación. Esta irregularidad de TRPV5 está relacionada con el incremento de la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis. Así mismo, como la hipercalcemia está relacionada como factor de riesgo mayor para la formación de enfermedades renales. Los cambios en estas 2 proteínas transportadoras de metales fueron mayormente expresados en los animales expuestos al plomo.

La fase de modelado en el cálculo de las propiedades fisicoquímicas y electrónicas aporta diferencias entre cada uno de los componentes de la gentamicina. En el caso de la reactividad local, calculada mediante nuestros cálculos de DFT conceptual, los átomos de nitrógeno son los que presentan mayor susceptibilidad a ataques nucleofílicos y radicalarios. Lo que hace a la molécula reactiva por los grupos amina.

De nuestros resultados experimentales las estructuras aproximadas, obtenidas mediante el método de homología ante la carencia de estructuras cristalográficas en los bancos de datos, fueron modeladas y validadas para ser analizadas como las estructuras terciarias de cada uno de los dominios conservados, presentes en la secuencia de aminoácidos del receptor, megalina. Los modelos homólogos que presentan una estructura terciaria semejante a un canal, Smart00135 y el modelo Pfam00057, son los que cuentan con una energía de eficiencia de ligando, determinadas mediante nuestros cálculos de acoplamiento moleculares (*docking*), más estable cuando el componente C1 de la gentamicina interacciona con el dominio. Además, el dominio Smart00135 presenta una elevada constante de inhibición hacia este componente, lo que se determina como la vía de entrada más eficiente y de la mayor cantidad del componente C1 a las células renales.

A diferencia del componente C1, C1a tiene energías de unión menos estables con los dominios que presentan una constante de inhibición alta, sin llegar a ser comparable con la cantidad molar que presenta C1. El componente C2 de la gentamicina pareciera ser el que requiere menor cantidad de fármaco para inhibir la interacción con la proteína de unión. Lo que hace suponer que este componente no es el causante de la acumulación de gentamicina en las células tubulares proximales.

De las propiedades ADMET, concluimos que todos los componentes de la gentamicina presentan una permeabilidad media a las células. Por lo que no se absorberán rápida ni completamente del canal alimenticio. Además, no se unirán ni interaccionarán con las proteínas séricas, llegando más rápidamente a su sitio de acción. Por el alto valor de LogBB, los componentes C1a, C2 y C2a de la gentamicina tienen posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Los componentes C1 y C2b no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica ya que presentan un bajo valor de LogBB, lo que les confiere un carácter hidrofílico, lo que los hará permanecer en el suero sanguíneo. De manera general, con el coeficiente de partición y la solubilidad en agua de los componentes, se determinó un carácter hidrofílico. Su metabolismo principal se da por el citocromo P450/2D6. Además, son inhibidores de las enzimas metabólicas, lo que evitaría la formación de posibles metabolitos tóxicos. Con la prueba de AMES podemos decir que todos los componentes son positivos a la prueba de mutagenicidad. Lo que representa un efecto no deseado de este fármaco.

Mediante el análisis multifactorial, en donde se estudiaron los factores del tipo de dominio de la megalina y el tipo de componente de la gentamicina, se observó que el factor del tipo de dominio que conforman al receptor de la megalina presenta un efecto mayor en la respuesta de la interacción que el que presenta el tipo de componente de la gentamicina. Esto significa que, en la acumulación de la gentamicina en las células tubulares proximales, es de mayor importancia el tipo de dominio de la megalina que se encuentra activada y de menor importancia el tipo de componente de la gentamicina. Lo que dirige el problema de la nefrotoxicidad de la gentamicina hacia su blanco biológico.

10. CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Analizar los niveles de otras proteínas cinasas citoplasmáticas involucradas en la vía MAPK, estas proteínas podrían ser MEK ½, TPA, PKC, proteínas Ras o proteínas Raf. Además, se podrían analizar factores de transcripción como c-Fos, Elk-1, Ets-1 y SP-1. Esto ayudaría a completar el estudio del mecanismo de acción de ERK ½ y su implicación con el biomarcador KIM-1.

Además de las cinasas involucradas en la vía MAPK, se analizarían proteínas involucradas en procesos celulares como la apoptosis. En este caso, se podría seleccionar proteínas como la caspasa-3 y algunas histonas, como histona H2AX.

Establecer tratamientos con acetato de plomo en una sola aplicación de 36 horas, para determinar con KIM-1 si una sola exposición es capaz de causar daño al tejido renal.

Para el caso del receptor biológico de la gentamicina, la megalina, se agregarían otros dominios para realizar el modelado homólogo y tener un mayor panorama de la estructura tridimensional de la proteína.

En los cálculos de *docking* o acoplamiento molecular, se evaluarían los dos componentes de la gentamicina que se encuentran en menor cantidad en la forma farmacéutica, C2a y C2b. Una vez teniendo las interacciones de cada uno de los componentes de la gentamicina con cada uno de los dominios de la megalina se procedería a realizar un *docking* con la macromolécula flexible, lo que aumentaría el costo computacional. También se podría considerar, en ambos casos, un ambiente salino (fuerza iónica) o posibles deprotonaciones.

Obtener un modelo simplificado de la cavidad o sitio activo obtenidos previamente por *docking* (la interacción entre el ligando y los aminoácidos de la macromolécula) para mejorar el nivel de cálculo de las interacciones entre los componentes y los aminoácidos, con la finalidad de estudiar sus propiedades electrónicas con la Teoría de Funcionales de la Densidad.

En un trabajo en extenso *in vitro*, se llevaría a cabo la cristalización de cada uno de los dominios de la megalina.

11. CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

- Akour, Amal A., Mary Jayne Kennedy, and Phillip M. Gerk. 2015. "The Role of Megalin in the Transport of Gentamicin Across BeWo Cells, an In Vitro Model of the Human Placenta." *AAPS Journal* 17(5): 1193–99.
- Almog, Tal, and Zvi Naor. 2008. "Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) as Regulators of Spermatogenesis and Spermatozoa Functions." *Molecular and Cellular Endocrinology* 282(1–2): 39–44.
- Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston. 1973. "An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens (Salmonella Typhimurium/Lipopolysaccharide/Frameshift Mutations)." 70(3): 782–86.
- Ayers, Paul W., and Mel Levy. 2000. "Perspective on 'Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity.'" *Theoretical Chemistry Accounts* 103(3–4): 353–60.
- Becerra, Alejandro Treviño. 2004. "Insuficiencia Renal Crónica: Enfermedad Emergente, Catastrófica Y Por Ello Prioritaria." *Cirugia y Cirujanos* 72: 3–4.
- Berkowitz, Max, and Robert G. Parr. 1988. "Molecular Hardness and Softness, Local Hardness and Softness, Hardness and Softness Kernels, and Relations among These Quantities." *The Journal of Chemical Physics* 88(4): 2554–57.
- Buscà, Roser, Jacques Pouysségur, and Philippe Lenormand. 2016. "ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy?" *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4(June): 1–23.
- Chandrasekaran, Balakumar et al. 2018. Dosage Form Design Parameters *Chapter 21. Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X>.
- Chen, Lilach et al. 2008. "Structure-Toxicity Relationship of Aminoglycosides: Correlation of 2'-Amine Basicity with Acute Toxicity in Pseudo-Disaccharide Scaffolds." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16(19): 8940–51.
- Chen, Yu Chian. 2015. "Beware of Docking!" *Trends in Pharmacological Sciences* 36(2): 78–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001>.
- Chu, Ju et al. 2002. "Factors Affecting the Biosynthesis and Secretion of Gentamicin." *Process Biochemistry* 38(5): 815–20.
- Collier, Justin B., and Rick G. Schnellmann. 2017. "Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Regulates Mouse Kidney Injury Molecule-1 Expression Physiologically and Following Ischemic and Septic Renal Injury." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 363(3): 419–27.
- Cook, Simon J., Kate Stuart, Rebecca Gilley, and Matthew J. Sale. 2017. "Control of Cell Death and Mitochondrial Fission by ERK1/2 MAP Kinase Signalling." *FEBS Journal* 284(24): 4177–95.
- Crews, Deidra C., Aminu K. Bello, and Gamal Saadi. 2019. "2019 World Kidney Day Editorial - Burden, Access, and Disparities in Kidney Disease." 95: 242–48.

- Cuarental, Leticia et al. 2019. "MAP3K Kinases and Kidney Injury." *Nefrología* 39(6): 568–80.
- Cueto-Manzano, Alfonso M. et al. 2005. "Prevalence of Chronic Kidney Disease in an Adult Population." *Archives of Medical Research* 68(6): S11–17.
- Cueto-Manzano, Alfonso M., and Enrique Rojas-Campos. 2007. "Status of Renal Replacement Therapy and Peritoneal Dialysis in Mexico." *Peritoneal Dialysis International* 27(2): 142–48.
- Davidson, Ernest R., and Subhas Chakravorty. 1992. "A Test of the Hirshfeld Definition of Atomic Charges and Moments." *Theoretica Chimica Acta* 83(5–6): 319–30.
- Denamur, Sophie et al. 2016. "Subcellular Mechanisms Involved in Apoptosis Induced by Aminoglycoside Antibiotics: Insights on P53, Proteasome and Endoplasmic Reticulum." *Toxicology and applied pharmacology* 309: 24–36.
- Dieterle, Frank et al. 2010. "Renal Biomarker Qualification Submission: A Dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium." *Nature Biotechnology* 28(5): 455–62.
- Edson, Randall S., and Christine L. Terrell. 1999. "The Aminoglycosides." *Mayo Clinic Proceedings* 74(5): 519–28.
- El-Gebali, Sara et al. 2019. "The Pfam Protein Families Database in 2019." *Nucleic Acids Research* 47(D1): D427–32.
- El-Khishin, Iman A., Yara Mohamed Medhat El-fakharany, and Omaima I. Abdel Hamid. 2015. "Role of Garlic Extract and Silymarin Compared to Dimercaptosuccinic Acid (DMSA) in Treatment of Lead Induced Nephropathy in Adult Male Albino Rats." *Toxicology Reports* 2: 824–32.
- Feigelstock, Dino et al. 1998. "The Human Homolog of HAVcr-1 Codes for a Hepatitis A Virus Cellular Receptor." *Journal of Virology* 72(8): 6621–28.
- Fisher, Carolyn E., and Sarah E.M. Howie. 2006. "The Role of Megalin (LRP-2/Gp330) during Development." *Developmental Biology* 296(2): 279–97.
- Forouzanfar, M. H. et al. 2015. "Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks in 188 Countries, 1990-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *The Lancet* 386(10010): 2287–2323.
- Frisch, J. et al. 2009. "Gaussian09."
- Fuentealba, Patricio, and Carlos Cárdenas. 2013. "On the Exponential Model for Energy with Respect to Number of Electrons." *Journal of Molecular Modeling* 19(7): 2849–53.
- Garrick, Michael D., and Laura M. Garrick. 2004. "Divalent Metal Transporter." In *Membrane Transporter Diseases*, State University of New York, 107–22.
- Gartel, Andrei L., and Senthil K. Radhakrishnan. 2005. "Lost in Transcription: P21 Repression, Mechanisms, and Consequences." *Cancer Research* 65(10): 3980–85.
- Georgakilas, Alexandros G., Olga A. Martin, and William M. Bonner. 2017. "P21: A Two-Faced Genome Guardian." *Trends in Molecular Medicine* 23(4): 310–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.001>.
- Goodsell, David S, Garrett M Morris, and Arthur J Olson. 1996. "Automated Docking." *Journal of Molecular Recognition* 9(November 1995): 1–5.

- Götz, C, P Wagner, O G Issinger, and M Montenarh. 1996. "P21WAF1/CIP1 Interacts with Protein Kinase CK2." *Oncogene* 13(2): 391–398. <http://europepmc.org/abstract/MED/8710378>.
- Gupta, Meenakshi, Ruchika Sharma, and Anoop Kumar. 2018. "Docking Techniques in Pharmacology: How Much Promising?" *Computational Biology and Chemistry* 76(September 2017): 210–17.
- Herz, Joachim, and Hans H. Bock. 2002. "Lipoprotein Receptors in the Nervous System." *Annual Review of Biochemistry* 71(1): 405–34.
- Hirshfeld, F. L. 1977. "Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge Densities." *Theoretica Chimica Acta* 44(2): 129–38.
- Hjälml, Göran et al. 1996. "Cloning and Sequencing of Human Gp330, a Ca²⁺-Binding Receptor with Potential Intracellular Signaling Properties." *European Journal of Biochemistry* 239(1): 132–37.
- Hohenberg, P. 1964. "Inhomogeneous Electron Gas." *Integral Equations and Operator Theory* 40(4): 391–402.
- Huo, Wenqian et al. 2010. "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A Novel Kidney-Specific Injury Molecule Playing Potential Double-Edged Functions in Kidney Injury." *Transplantation Reviews* 24(3): 143–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trre.2010.02.002>.
- Hussain, M. Mahmood, Dudley K. Strickland, and Ahmed Bakillah. 1999. "The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family." *Annual Review of Nutrition* 19(1): 141–72.
- Ichimura, Takaharu et al. 2004. "Kidney Injury Molecule-1: A Tissue and Urinary Biomarker for Nephrotoxicant-Induced Renal Injury." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 286(3 55-3): 552–63.
- Iczkowski, Raymond P, and John L Margrave. 1961. "Electronegativity." *Journal of the American Chemical Society* 83(17): 3547–51. <https://doi.org/10.1021/ja01478a001>.
- Ingersoll, David W., Paul M. Bronstein, and Joseph Bonventre. 1976. "Chemical Modulation of Agonistic Display in Betta Splendens." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 90(2): 198–202.
- J.G., Hoenderop, van der Kemp A., Hartog A., and van de Graaf S.F. 1999. "Molecular Identification of the Apical Ca²⁺ Channel in 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃-Responsive Epithelia." *Biochemistry*: 8375–78.
- Kayaalti, Zeliha, Dilek Kaya Akyüzlü, and Tülin Söylemezoğlu. 2015. "Evaluation of the Effect of Divalent Metal Transporter 1 Gene Polymorphism on Blood Iron, Lead and Cadmium Levels." *Environmental Research* 137: 8–13.
- Kim, Eun Kyung, and Eui Ju Choi. 2010. "Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1802(4): 396–405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
- Kim, Hyun Soo, Yeo Jin Kim, and Young Rok Seo. 2015. "An Overview of Carcinogenic Heavy Metal: Molecular Toxicity Mechanism and Prevention." *Journal of Cancer Prevention* 20(4): 232–40.
- Kirberger, Michael, Hing C Wong, Jie Jiang, and Jenny J Yang. 2013. "Metal Toxicity and Opportunistic Binding of Pb(2+) in Proteins." *Journal of inorganic biochemistry* 125: 40–49.

- Kohn, W., and L. J. Sham. 1965. "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects." *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 140(5): 289–95.
- Kramer, Andrea B. et al. 2009. "Reduction of Proteinuria in Adriamycin-Induced Nephropathy Is Associated with Reduction of Renal Injury Molecule (Kim-1) over Time." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 296(5).
- Krieger, Elmar, Sander B. Nabuurs, and Gert Vriend. 2005. "Homology Modeling." *Structural Bioinformatics* 857: 509–23.
- Krishnan, R., J. S. Binkley, R. Seeger, and J. A. Pople. 1980. "Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions." *The Journal of Chemical Physics* 72(1): 650–54.
- Kukida, Masayoshi, Hisashi Sawada, Alan Daugherty, and Hong S. Lu. 2020. "Megalin: A Bridge Connecting Kidney, the Renin-Angiotensin System, and Atherosclerosis." *Pharmacological Research* 151: 104537. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104537>.
- Lazzerini, Marzia, and David Tickell. 2011. "Antibiotics in Severely Malnourished Children: Systematic Review of Efficacy, Safety and Pharmacokinetics." *Bulletin of the World Health Organization* 8: 545–620. <https://www.who.int/bulletin/volumes/89/8/es/%0A>.
- Lee, S.K., and G.S. Chang. 2004. "The PreADME: PC-Based Program for Batch Prediction of ADME Properties." : 1–6.
- Lee, Sung et al. 2002. "The PreADME Approach: Web-Based Program for Rapid Prediction of Physico-Chemical, Drug Absorption and Drug-like Properties." *euro QSAR 2002 - Designing Drugs and Crop Protectants: Processes Problems and Solutions*: 418–20.
- Letunic, Ivica, Tobias Doerks, and Peer Bork. 2015. "SMART: Recent Updates, New Developments and Status in 2015." *Nucleic Acids Research* 43(D1): D257–60.
- Liang, Ya Jing, and Wan Xi Yang. 2019. "Kinesins in MAPK Cascade: How Kinesin Motors Are Involved in the MAPK Pathway?" *Gene* 684(September 2018): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.042>.
- Lipinski, Christopher A., Franco Lombardo, Beryl W. Dominy, and Paul J. Feeney. 2012. "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(SUPPL.): 4–17.
- Liu, Zhifeng et al. 2018. "Application of Molecular Docking for the Degradation of Organic Pollutants in the Environmental Remediation: A Review." *Chemosphere* 203: 139–50. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.179>.
- Loeb, Walter F. 1998. "The Measurement of Renal Injury." *Toxicologic Pathology* 26(1): 26–28.
- Longoni, Mauro, Sibel Kantarci, Dian Donnai, and Barbara R Pober. 2019. "Donnai-Barrow Syndrome Summary Suggestive Findings." *GeneReviews*.
- Lu, Shennan et al. 2020. "CDD/SPARCLE: The Conserved Domain Database in 2020." *Nucleic acids research* 48(D1): D265–68.
- Ma, Xiao Lei, Cheng Chen, and Jie Yang. 2005. "Predictive Model of Blood-Brain Barrier Penetration of Organic Compounds." *Acta Pharmacologica Sinica* 26(4): 500–512.
- Mandell, GERALD L., JOHN E. Bennett, and RAPHAEL Dolint. 2005. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed.

- Mao, Shan-ping, and Jeng-da Chai. 2005. "What ' s New in Q-Chem." 67(412): 3–4.
- Marchler-Bauer, Aron, and Stephen H. Bryant. 2004. "CD-Search: Protein Domain Annotations on the Fly." *Nucleic Acids Research* 32(WEB SERVER ISS.): 327–31.
- Marenich, Aleksandr V, Christopher J Cramer, and Donald G Truhlar. 2009. "Supporting Information (PART I) Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions Contents :." *J. Phys. Chem. B* 113(18): 6378.
- Mathew, T H. 1992. "Drug-Induced Renal Disease." *The Medical journal of Australia* 156(10): 724—728. <http://europepmc.org/abstract/MED/1620020>.
- Meloche, S, and J Pouysségur. 2007. "The ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway as a Master Regulator of the G1- to S-Phase Transition." *Oncogene* 26(22): 3227–39. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>.
- Méndez-Durán, Antonio et al. 2010. "Diálisis y Trasplante." 31(1): 7–11.
- Meurer, Manuel, and Klaus Höcherl. 2019. "Renal Ischemia-Reperfusion Injury Impairs Renal Calcium, Magnesium, and Phosphate Handling in Mice." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 25: 901–14.
- Mitchell, G., P. A. Dixon, P. J. Gilbert, and D. J. White. 1980. "Mutagenicity of Antibiotics in Microbial Assays: Problems of Evaluation." *Mutation Research* 79: 91–105.
- Moghimpour, Eskandar et al. 2016. "Brush Border Membrane Vesicle and Caco-2 Cell Line: Two Experimental Models for Evaluation of Absorption Enhancing Effects of Saponins, Bile Salts, and Some Synthetic Surfactants." *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 7(3): 75–79.
- Moonen, Lies, Patrick C D'Haese, and Benjamin A Vervaet. 2018. "Epithelial Cell Cycle Behaviour in the Injured Kidney." *International journal of molecular sciences* 19(7).
- Morris, Garrett M. et al. 2009. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility." *Journal of computational chemistry* 32: 174–82.
- Nielsen, Morten Schak et al. 2013. "Gap Junctions." 2(3): 159.
- Niemeyer, Barbara A. 2005. "Structure-Function Analysis of TRPV Channels." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371(4): 285–94.
- Nijenhuis, Tom, Joost G.J. Hoenderop, and René J.M. Bindels. 2005. "TRPV5 and TRPV6 in Ca²⁺ (Re)Absorption: Regulating Ca²⁺ Entry at the Gate." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 451(1): 181–92.
- Orzáez, Mar, and John M Walker. 2016. "Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors IN Series Editor." 1336(1): 123–39.
- Ozbek, Emin et al. 2009. "Atorvastatin Prevents Gentamicin-Induced Renal Damage in Rats through the Inhibition of P38-MAPK and NF-KB Pathways." *Renal Failure* 31(5): 382–92.
- Parr, Robert G., and Weitao Yang. 1989. "Density Functional Theory of Atoms and Molecules."
- Pecoits-Filho, Roberto et al. 2007. "Overview of Peritoneal Dialysis in Latin America." *Peritoneal Dialysis International* 27(3): 316–21.
- Perdew, John P, and Yue Wang. 1992. "Accurate and Simple Analytic Representation of the Electron-

- Gas Correlation Energy.” *Phys. Rev. B* 45(23): 13244–49.
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.45.13244>.
- Peeverati, Roberto, and Donald G. Truhlar. 2014. “Quest for a Universal Density Functional: The Accuracy of Density Functionals across a Broad Spectrum of Databases in Chemistry and Physics.” *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 372(2011).
- Prival, Michael J., and Errol Zeiger. 1998. “Chemicals Mutagenic in Salmonella Typhimurium Strain TA1535 but Not in TA100.” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 412(3): 251–60.
- Pruitt K, Brown G, Tatusova T, et al. 2002. “The NCBI Handbook.” (Md): 1–8.
- Ramos, Joe W. 2008. “The Regulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Mammalian Cells.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(12): 2707–19.
- Rana, Mohammad Nasiruddin, Jitbanjong Tangpong, and Md Masudur Rahman. 2018. “Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- Induced Kidney Toxicity and Treatment Strategy: A Mini Review.” *Toxicology Reports* 5(April): 704–13.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.012>.
- Ranaldi, G., K. Islam, and Y. Sambuy. 1992. “Epithelial Cells in Culture as a Model for the Intestinal Transport of Antimicrobial Agents.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36(7): 1374–81.
- Riedmiller, Martin, and Heinrich Braun. 1993. “Direct Adaptive Method for Faster Backpropagation Learning: The RPROP Algorithm.” *1993 IEEE International Conference on Neural Networks*: 586–91.
- Roskoski, Robert. 2012. “ERK1/2 MAP Kinases: Structure, Function, and Regulation.” *Pharmacological Research* 66(2): 105–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.
- Sabath, Ernesto, and M. Ludivina Robles-Osorio. 2012. “Medio Ambiente y Riñón: Nefrotoxicidad Por Metales Pesados.” *Nefrologia* 32(3): 279–86.
- Samanta, Pabitra Narayan, and Kalyan Kumar Das. 2017. “Noncovalent Interaction Assisted Fullerene for the Transportation of Some Brain Anticancer Drugs: A Theoretical Study.” *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 72: 187–200.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmkgm.2017.01.009>.
- Shin, Jung Hun et al. 2007. “Lead-Induced Procoagulant Activation of Erythrocytes through Phosphatidylserine Exposure May Lead to Thrombotic Diseases.” *Chemical Research in Toxicology* 20(1): 38–43.
- Singh, S., and J. Singh. 1993. “Transdermal Drug Delivery by Passive Diffusion and Iontophoresis: A Review.” *Medicinal Research Reviews* 13(5): 569–621.
- Soto-Arredondo, Karla J. et al. 2018. “Effects of Lead and Lead–Melatonin Exposure on Protein and Gene Expression of Metal Transporters, Proteins and the Copper/Zinc Ratio in Rats.” *BioMetals* 31(5): 859–71.
- Sousa, Sérgio Filipe, Pedro Alexandrino Fernandes, and Maria João Ramos. 2007. “General Performance of Density Functionals.” *Journal of Physical Chemistry A* 111(42): 10439–52.
- Springer, Timothy A. 1998. “An Extracellular β -Propeller Module Predicted in Lipoprotein and Scavenger Receptors, Tyrosine Kinases, Epidermal Growth Factor Precursor, and Extracellular

- Matrix Components.” *Journal of Molecular Biology* 283(4): 837–62.
- State College, PA: Minitab, Inc. 2018. “Minitab 18 Statistical Software.” www.minitab.com.
- Tan, Dun Xian et al. 2007. “One Molecule, Many Derivatives: A Never-Ending Interaction of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species?” *Journal of Pineal Research* 42(1): 28–42.
- Taylor, Sarah A. et al. 1997. “The Assessment of Biomarkers to Detect Nephrotoxicity Using an Integrated Database.” *Environmental Research* 75(1): 23–33.
- Teo, Su Hooi, and Zoltán Huba Endre. 2017. “Biomarkers in Acute Kidney Injury (AKI).” *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology* 31(3): 331–44.
- Thomas, L. H. 1927. “The Calculation of Atomic Fields.” *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 23(5): 542–548.
- Tsuneda, Takao. 2013. 9784431548 Density Functional Theory in Quantum Chemistry *Density Functional Theory in Quantum Chemistry*.
- Verma, Pragma, and Donald G. Truhlar. 2020. “Status and Challenges of Density Functional Theory.” *Trends in Chemistry* 2(4): 302–18. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2020.02.005>.
- Villaseñor-Granados, Tayde et al. 2019. “Binding of Pb-Melatonin and Pb-(Melatonin-Metabolites) Complexes with DMT1 and ZIP8: Implications for Lead Detoxification.” *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(1): 137–48.
- Vogetseder, Alexander et al. 2007. “Proximal Tubular Epithelial Cells Are Generated by Division of Differentiated Cells in the Healthy Kidney.” *American journal of physiology. Cell physiology* 292(2): C807-13.
- Volpini, R. A., A. P.C. Balbi, R. S. Costa, and T. M. Coimbra. 2006. “Increased Expression of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Related to the Acute Renal Lesions Induced by Gentamicin.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39(6): 817–23.
- Walker, John M. 2009. 531 Methods in Molecular Biology *Homology Modeling: Methods and Protocols*. <http://books.google.com/books?id=Ku2wPAAACAAJ>.
- Warn-Cramer, Bonnie J. et al. 1996. “Characterization of the Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on the Connexin-43 Gap Junction Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 271(7): 3779–86.
- Wavefunction, Inc 18401 Von Karman. Pleasanton, C. A. 2018. “Spartan18 for Windows.”
- Weaver, Virginia M. et al. 2005. “Associations among Lead Dose Biomarkers, Uric Acid, and Renal Function in Korean Lead Workers.” *Environmental Health Perspectives* 113(1): 36–42.
- White, L. D. et al. 2007. “New and Evolving Concepts in the Neurotoxicology of Lead.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 225(1): 1–27.
- Wiederstein, Markus, and Manfred J. Sippl. 2007. “ProSA-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins.” *Nucleic Acids Research* 35(SUPPL.2): 407–10.
- Wissenbach, Ulrich. 2014. “Pharmacology of TRPV Channels.” *Pathologies of Calcium Channels*: 549–75.
- Wolf, Christian A. et al. 2007. “Solution Structure of the Twelfth Cysteine-Rich Ligand-Binding

- Repeat in Rat Megalin.” *Journal of Biomolecular NMR* 37(4): 321–28.
- Yamashita, Shinji et al. 2000. “Optimized Conditions for Prediction of Intestinal Drug Permeability Using Caco-2 Cells.” *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 10(3): 195–204.
- Yang, Jianyi et al. 2010. “I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction.” *Current protocols in bioinformatics* 5(4): 725–38. http://www.proteopedia.org/w/Ramachandran_Plot&oldid=1772128%0Ahttp://www.jove.com/details.php?id=3259.
- Zeiger, Errol, Kenneth J. Risko, and Barry H. Margolin. 1985. “Strategies to Reduce the Cost of Mutagenicity Screening with the Salmonella Assay.” *Environmental Mutagenesis* 7(6): 901–11.
- Zhang, Yang. 2008. “Progress and Challenges in Protein Structure Prediction.” *Current Opinion in Structural Biology* 18(3): 342–48.
- Zhang, Zhiwei, and Cindy X Cai. 2016. “Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) Mediates Renal Epithelial Cell Repair via ERK MAPK Signaling Pathway.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 416(1): 109–16. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2700-7>.
- Zhao, Yan, and Donald G. Truhlar. 2008. “The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Function.” *Theoretical Chemistry Accounts* 120(1–3): 215–41.
- Zhao, Yuan H. et al. 2001. “Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure - Activity Relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90(6): 749–84. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1031>.
- Zheng, Wei, Chengxin Zhang, Eric W. Bell, and Yang Zhang. 2019. “I-TASSER Gateway: A Protein Structure and Function Prediction Server Powered by XSEDE.” *Future Generation Computer Systems* 99: 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.future.2019.04.011>.
- Zou, Zhiying et al. 2004. “Linking Receptor-Mediated Endocytosis and Cell Signaling: Evidence for Regulated Intramembrane Proteolysis of Megalin in Proximal Tubule.” *Journal of Biological Chemistry* 279(33): 34302–10.

APÉNDICE. Artículo enviado en coautoría:

CORRELATION BETWEEN KIM-1 IN URINE AND PROTEIN EXPRESSION OF p-ERK IN KIDNEY, FOLLOW UP AFTER DAMAGE IN RATS EXPOSED TO GENTAMICIN OR LEAD ACETATE, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, Martínez- Alfaro, Minerva; **Ruiz Ramírez, Dulce Carolina**; Antaño-Martínez, Alejandro Raúl; Robles, Juvencio; Gallegos-Corona, Marco Alonso; Gallegos-Reyes, Marco Alonso; Avila, Eva-Edilia, enviado **2020**.