

**Universidad de Guanajuato**  
**Campus Guanajuato**  
**División de Ciencias Naturales y Exactas**



**Estudio teórico-computacional del posible efecto de la melatonina  
en el daño renal agudo, inducido por la exposición a gentamicina y  
acetato de plomo**

Tesis que para obtener el título de:

**Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Alberto Jorge González Rodríguez**

Asesor de tesis:

**Dr. Juvencio Robles García**

Coasesor:

**Dra. Minerva Martínez Alfaro**

Guanajuato, Gto., octubre 2021

# Jurado

**Presidente:**

Dra. Yolanda Alcaraz Contreras

**Secretario:**

Dra. Marco Antonio García Revilla

**Vocal:**

Dr. Francisco Méndez Ruiz

**Sinodal suplente:**

Dra. Brenda Manzanilla Viveros

# Agradecimientos

A la Universidad de Guanajuato por la grandiosa oportunidad de realizarme como profesionista.

A la División de Ciencias Naturales y Exactas por los conocimientos adquiridos y vivencias con profesores y amigos.

Al Dr. Juvencio Robles García por la oportunidad dada principalmente, por su tiempo, sus consejos y sus conocimientos sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible, un enorme gracias por todo el apoyo y paciencia.

A la Dr. Minerva Martínez Alfaro, Dra. Yolanda Alcaraz, Dr. Marco García, Dr. Francisco Méndez y a la Dra. Brenda Manzanilla que gracias a sus consejos este trabajo pudo mejorar.

A todos mis amigos, que, aunque pocos han sido, siempre los mejores dándome su compañía y consejos, Paul, Alex y Dani.

Un especial gracias a Diana M. sin importar el futuro, durante este proyecto fue la mayor motivación para continuar adelante, gracias por todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca recibida durante el estudio de la maestría.

Al ingeniero Adán y el clúster supercómputo “PÍPILA” por el tiempo de cómputo facilitado.

## **Dedicatoria**

A mi familia entera que siempre ha sido un pilar de apoyo en este proceso complicado e incierto llamado vida.

«... fue una de las raras batallas en que los muertos victoriosos tienen peor entierro que los vencidos»

Jorge Ibarregüen

# Índice

I.	Listado de figuras	8
II.	Términos y abreviaturas	11
III.	Resumen	12
Capítulo 1:	Introducción	13
Capítulo 2:	Antecedentes	16
Capítulo 3:	Hipótesis	23
Capítulo 4:	Objetivos	
	4.1. Objetivo general	23
	4.2. Objetivos particulares	23
Capítulo 5:	Generalidades	
	5.1. El riñón	24
	5.2. Funciones del riñón	24
	5.3. Anatomía del riñón	24
	5.4. Causas de una falla renal	26
	5.5. Estadios del daño renal	27
	5.6. Tratamientos	28
	5.7. Citocinas	28
	5.8. Función de las citocinas	29
	5.9. Citocinas y proceso inflamatorio	30
	5.10. Melatonina	31
	5.11. Química computacional	32
	5.11.1. Aspectos fundamentales	33
	5.11.2. Describiendo el sistema	33
	5.11.3. Ecuación dinámica	34
	5.11.4. Funciones base	35
	5.12. Teoría de los funcionales de la densidad	36
	5.12.1. Teorema de Kohn-Sham	37
	5.12.2. Derivadas de los funcionales	38
	5.12.3. Descriptores globales de la reactividad	40
	5.12.4. Descriptores locales de la reactividad	42
	5.13. Herramientas computacionales	43
	5.14. Desarrollo insilico de fármacos	43
	5.15. Modelado por homología	44
	5.16. Acoplamiento molecular o docking	45
	5.16.1. Metodología docking	45
	5.16.2. Funciones de puntuación	46
Capítulo 6:	Metodología computacional	
	6.1. Hardware utilizado	48
	6.2. Detalles computacionales	48
	6.2.1. Modelado por homología	48
	6.2.2. Optimización y cálculos CDFT	49
	6.2.3. Características del acoplamiento molecular	50
Capítulo 7:	Análisis y resultados	

7.1. Modelo homólogo: IL-18	51
7.1.1. Validación	51
7.1.2 Selección del modelo	54
7.2. Acoplamiento molecular	57
7.2.1. Estudios docking: IL18 con MT y sus metabolitos activos	57
7.2.2. Optimización con disolvente	59
7.2.3. Docking flexible y dirigido	60
7.2.4. Interacciones: IL18 con MT	62
7.2.5. Interacciones: IL18 con AMK	64
7.2.6. Interacciones: IL18 con AFMK	67
7.2.7. Interacciones: IL18 con 3OHM	70
7.2.8. Estudios docking: IL13 con MT y sus metabolitos activos	74
7.2.9. Docking dirigido y flexible de la citocina IL13	76
7.2.10. Interacciones: IL13 con MT	78
7.2.11. Interacciones: IL13 con AMK	80
7.2.12. Interacciones: IL13 con AFMK	83
7.2.13. Interacciones: IL13 con 3OHM	85
7.2.14. Comparación IL18 con IL13	87
7.2.15. Estudios docking: MCP-1 con MT y sus metabolitos activos	89
7.2.16. Docking dirigido y flexible de la quimiocina MCP-1	92
7.2.17. Interacciones: MCP-1 con MT	93
7.2.18. Interacciones: MCP-1 con AMK	96
7.2.19. Interacciones: MCP-1 con AFMK	98
7.2.20. Interacciones: MCP-1 con 3OHM	101
7.3. Docking proteína-proteína	104
7.3.1. Efecto equilibrado de la MT en la formación del dímero	106
7.3.2. Efecto electrostático de la MT en la formación del dímero	107
7.3.3. Efecto hidrofóbico de la MT en la formación del dímero	108
7.3.4. Efecto de la MT en las interacciones VdW en la formación del dímero	109
7.3.5. Efecto de los metabolitos de la MT en la formación del dímero	110
7.4. Descriptores de la DFT conceptual para los ligandos MT y sus metabolitos activos	112
7.4.1. Descriptores globales para la MT y sus metabolitos activos	113
7.4.2. Descriptores locales para la MT y sus metabolitos activos	114
Capítulo 8: Conclusiones	118
Capítulo 9: Trabajo futuro	120
Capítulo 10: Bibliografía	121

# Listado de figuras

Figura 1.	Tasa de defunciones registradas por insuficiencia renal por cada 10 000 habitantes 2010-2019	13
Figura 2.	Probabilidad de supervivencia para diálisis peritoneal, hemodiálisis y trasplante renal	14
Figura 3.	Niveles de plomo en diferentes muestras. Estudio de Díaz et. al.	16
Figura 4.	Niveles de plomo en diferentes muestras. Estudio de Hernández-plata et. al.	17
Figura 5.	Efecto de la exposición al Pb en la proteína ZIP8 en órganos de ratas	17
Figura 6.	Estructuras de A) melatonina, B) AFMK, C) AMK y D) 3OHM	18
Figura 7.	Energías de enlace en kcal/mol (E) y eficiencia del ligando (LE) en kcal/mol para las mejores poses obtenidas de los cálculos de docking	19
Figura 8.	Energías libres de Gibbs para la complejación de todos los sistemas estudiados	20
Figura 9.	Anatomía interna del riñón	25
Figura 10.	Componentes funcionales de la nefrona	25
Figura 11.	Mecanismos de actuación de citocinas	29
Figura 12.	Actuación de las citocinas	30
Figura 13.	Derivadas de la energía hasta el tercer orden	39
Figura 14.	Puntos clave del Docking	46
Figura 15.	Clasificación convencional de las más populares funciones de puntuación	47
Figura 16.	Moléculas de melatonina y sus metabolitos activos diseñadas en GaussView. Se presenta en gris los átomos de carbono, en blanco los átomos de hidrógeno, en azul el nitrógeno y finalmente en rojo el oxígeno	49
Figura 17.	Resultados de calidad general para el modelo homólogo de la citocina IL-18 (humano) obtenidos mediante ProSA-Web	51
Figura 18.	Modelo de calidad local para la plantilla número 5	52
Figura 19.	Comparación de modelos: A) descargado directamente de PDB B) Mejor modelo calculado por I-TASSER	53
Figura 20.	Secuencia de aminoácidos de la citocina IL-18 de rattus norvegicus	54
Figura 21.	Modelos de calidad general de la citocina IL-18 (rata) obtenidos mediante ProSA-Web	54
Figura 22.	Modelos de calidad local de la citocina IL-18 (rata) obtenidos mediante ProSA-Web	55
Figura 23.	Modelos tridimensionales de las plantillas homologas correspondientes a la citocina IL-18 (rata) obtenidos mediante I-TASSER	56
Figura 24.	Se presentan los 10 mejores modos de unión con energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) obtenidos mediante el acoplamiento de la citocina IL-18 y la melatonina junto con sus metabolitos activos	57
Figura 25.	Energías de afinidad para el acoplamiento entre la citocina IL-18 y los ligandos melatonina y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego	58
Figura 26.	Resultados de energía de enlace y eficiencia del ligando, donde se ha optimizado el ligando en medio gas (arriba) y en medio acuoso (abajo), del acoplamiento entre IL-18 y melatonina y sus metabolitos	59
Figura 27.	Energías de afinidad para docking ciego (azul) y docking dirigido y flexible (naranja) entre la citocina IL-18 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina	60
Figura 28.	Grafica comparativa de afinidad entre la citocina IL-18 y la MT, así como sus metabolitos	61
Figura 29.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	62
Figura 30.	Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la citocina IL-18 y el ligando MT	63
Figura 31.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando MT en modelo 3D A) y modelo 2D B).	63
Figura 32.	Interacciones entre la citocina IL-18 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	63
Figura 33.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	65
Figura 34.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando AMK	65
Figura 35.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando AMK en modelo 3D (izquierda) y B) 2D (derecha)	66
Figura 36.	Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando AMK. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B)	66
Figura 37.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.	68
Figura 38.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK	68
Figura 39.	Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B)	69
Figura 40.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK en modelo 3D (A) y 2D (B)	69
Figura 41.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	71
Figura 42.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM	71
Figura 43.	Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B)	71

Figura 44.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM en modelo 3D (A) y 2D (B)	72
Figura 45.	Energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) entre la citocina IL-13 y la MT y sus metabolitos, datos obtenidos por acoplamiento molecular. Docking ciego	74
Figura 46.	Energías de afinidad para el acoplamiento entre la citocina IL-13 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego	75
Figura 47.	Energías de afinidad para docking ciego (morado) y docking dirigido y flexible (azul) entre la citocina IL-13 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina	76
Figura 48.	Grafica comparativa de afinidad entre la citocina IL-13 y la MT, así como sus metabolitos	77
Figura 49.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus. Se advierte como ambas cavidades coinciden	78
Figura 50.	Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la citocina IL-13 y el ligando MT	79
Figura 51.	Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	79
Figura 52.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando MT en A) modelo 3D y B) modelo 2D	79
Figura 53.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	81
Figura 54.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-13 y el ligando AMK	81
Figura 55.	Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando AMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	81
Figura 56.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando AMK en modelo 3D (izquierda) y B) 2D (derecha)	82
Figura 57.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	83
Figura 58.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK	83
Figura 59.	Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	84
Figura 60.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK en modelo 3D (A) y 2D (B)	84
Figura 61.	Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	85
Figura 62.	Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM	86
Figura 63.	Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	86
Figura 64.	Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM en modelo 3D (A) y 2D (B)	86
Figura 65.	Comparación de afinidad entra la citocina IL-18 (morado) y la citocina IL-13 (Azul) con los ligandos MT y sus metabolitos activos. Datos de afinidad obtenidos mediante AutoDock Vina	88
Figura 66.	Comparación entre las interacciones detectadas resultantes entre la citocina IL-18 así como IL-13 con la MT y sus metabolitos activos	88
Figura 67.	Energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos, datos obtenidos por acoplamiento molecular. Docking ciego	90
Figura 68.	Energías de afinidad para el acoplamiento entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego	91
Figura 69.	Energías de afinidad para docking ciego (azul) y docking dirigido y flexible (naranja) entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina	92
Figura 70.	Grafica comparativa de afinidad entre la quimiocina MCP-1 y la MT, así como sus metabolitos	93
Figura 71.	Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus. Se advierte como ambas cavidades coinciden	94
Figura 72.	Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT	94
Figura 73.	Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	95
Figura 74.	Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT en A) modelo 3D y B) modelo 2D	95
Figura 75.	Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	96
Figura 76.	Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK	97
Figura 77.	Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	97
Figura 78.	Interacciones detectadas entre la citocina MCP-1 y el ligando AMK en modelo 3D (A) y 2D (B)	97
Figura 79.	Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus	99
Figura 80.	Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK	99
Figura 81.	Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	99

Figura 82.	Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK en modelo 3D (A) y 2D (B)	100
Figura 83.	Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidades donde se ubicó la unión del ligando con la quimiocina MCP-1	101
Figura 84.	Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM	101
Figura 85.	Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica	102
Figura 86.	Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM en modelo 3D (A) y 2D (B)	102
Figura 87.	Diagrama esquemático de la formación de los complejos IL18/R $\alpha$ /R $\beta$ . Imagen obtenida de Tsutsumi et al	104
Figura 88.	Dímero formado entre la citocina IL-18 (verde) y su receptor IL18R $\alpha$ (azul). Complejo de energía ponderada obtenido mediante el servidor ClusPro.	105
Figura 89.	puntuación ponderada de los clústeres formados entre la citocina IL18 y su receptor alfa	105
Figura 90.	Puntuación ponderada equilibrada entre el complejo IL8_MT y el IL18R $\alpha$ (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$ (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose entre IL18_MT (amarillo) y el IL18R (morado).	106
Figura 91.	Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras electrostáticamente favorecidas entre el complejo IL8_MT y el IL18R $\alpha$ (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$ (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose electrostáticamente favorecida entre IL18_MT (amarillo) y el IL18R (morado).	107
Figura 92.	Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras hidrofóbicamente favorecidas entre el complejo IL8_MT y el IL18R $\alpha$ (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$ (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose hidrofóbicamente favorecida entre IL18_MT (amarillo) y el IL18R (morado)	108
Figura 93.	Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras favorecidas por interacciones de tipo VdW entre el complejo IL8_MT y el IL18R $\alpha$ (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$ (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose favorecida por interacciones de tipo VdW entre IL18_MT (amarillo) y el IL18R (morado).	109
Figura 94.	Puntuación ponderada de estructuras equilibradas entre el complejo IL8_X, donde X es MT o sus metabolitos, y el IL18R $\alpha$ (diferentes colores) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$ (morado). Se ha dividido los 30 clústeres en dos grupos para una mejor apreciación de los datos	110
Figura 95.	Analogía de los resultados obtenidos para todos los ligandos al unirse a IL-18 para posteriormente acoplar a su receptor. Se encuentran que la presencia de un ligando (cuadro naranja pequeño) afecta la estabilidad de la formación del dímero pero la metodología usada no permite diferenciar entre uno u otro ligando (azul)	111
Figura 96.	Ligandos con geometría optimizada mediante cálculos DFT utilizando un nivel de teoría M06-2x y una base 6-311+g(d,p). A) melatonina, B) AFMK, C) AMK y D) 3OHM	112
Figura 97.	Descriptores globales de la MT y sus metabolitos activos	113
Figura 98.	Descriptores locales para la molécula de MT. Se incluye numeración atómica y MPE	115
Figura 99.	Descriptores locales para la molécula de AMK. Se incluye numeración atómica y MPE	115
Figura 100.	Descriptores locales para la molécula de AFMK. Se incluye numeración atómica y MPE	116
Figura 101.	Descriptores locales para la molécula de 3OHM. Se incluye numeración atómica y MPE	117

# Términos y abreviaturas

3OHM	Ciclo hidroximelatonina
AFMK	N1-Acetil-N2-formil-5-metoxicianuramina
AG	Aminoglucósidos
AKI	Acute kidney injury (daño renal agudo)
AMK	N1-Acetil-5-metoxicianuramina
CKD	Chronic kidney disease (enfermedad renal crónica)
DD	Capacidad farmacológica
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
ECD	Enfermedades crónico-degenerativas
ERA	Enfermedad renal aguda
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCT	Enfermedad renal crónico terminal
FF	Funciones Fukui
FG	Filtración glomerular
FM	Modelado sin uso de plantillas
GTO	Orbital tipo Gaussiano
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
IFN- $\beta$	Interferón beta
IL-18	Interleucina 18
IL18R $\alpha$	Receptor $\alpha$ de la interleucina IL-18
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MPE	Mapa de potencial electrostático
MT	Melatonina
N	Células <i>Natural Killer</i>
PDB	Proteins Data Bank
STO	Orbital tipo Slater
TBM	Modelado basado en plantillas
u.a.	Unidades atómicas
VdW	Van der Waals

# Resumen

La enfermedad renal tiene un alto impacto directo e indirecto en la mortalidad y morbilidad tanto en México como en el mundo. Su origen es multifactorial, abarcando desde el estilo de vida hasta las nefrotoxinas ambientales, tiene una estrecha relación con otras enfermedades crónico degenerativas y pasa inadvertida por el paciente hasta que llega a una etapa avanzada. En México se reporta hasta el 2019 como la octava causa de muerte en personas mayores a 65 años, así como en jóvenes de 15 a 24 años. El Instituto Mexicano del Seguro Social reporta un total de 13 250 millones de pesos invertidos en los pacientes con enfermedad renal, lo cual representa el 0.8% de los derechohabientes registrados. Estudios anteriores<sup>1-3</sup>, han demostrado el efecto benéfico de la melatonina al ser coadministrada con agentes nefrotóxicos como el Pb, logrando disminuir la concentración de estas especies químicas en distintos órganos y tejidos. Este trabajo estudiará las posibles interacciones formadas entre la citocina IL-18, que participa durante el proceso inflamatorio del daño renal, así como algunas otras proteínas que intervienen en el proceso, con la melatonina y sus metabolitos activos mediante un análisis de acoplamiento molecular tanto macromolécula-ligando como proteína-proteína. Los resultados muestran como los ligandos tienen una buena tendencia a formar estructuras estables con las proteínas estudiadas, el ligando 3OHM muestra la mejor energía de afinidad con respecto a los restantes metabolitos estudiados, por su parte se observó las interacciones formadas donde el ligando AFMK mostró tener la mayor cantidad de interacciones no covalentes entre las cuales se encuentran en mayor medida, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y en algunos casos interacciones catiónicas. El estudio docking proteína-proteína mostró que la adición de un ligando a la citocina IL-18 modifica sus propiedades electrostáticas logrando así disminuir su afinidad por su receptor IL18R $\alpha$  y modificando así la estabilidad del dímero consecuente para desencadenar las reacciones inflamatorias.

# 1 Introducción

## Carga de la enfermedad renal

En la actualidad la adopción de estilos de vida poco o nada saludables, así como la exposición a sustancias dañinas relativas al trabajo o inclusive la edad misma provocan un incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (ECD). Lo anterior, representa un nuevo panorama de retos al país, el aumento de la demanda de servicio médicos y las repercusiones en la economía nacional y de los usuarios ya sean públicos o privados de los servicios de salud.

La enfermedad renal crónica (ERC) representa un grave problema de salud pública en México y el mundo. La ERC puede asociarse a, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial sistémica, así como la exposición a tóxicos. Estas enfermedades están entre las 10 principales causas de muerte en México<sup>4</sup>. La ERC tiene un origen multifactorial, esta enfermedad renal es progresiva y la pérdida de la función renal poder ser total<sup>5</sup>.

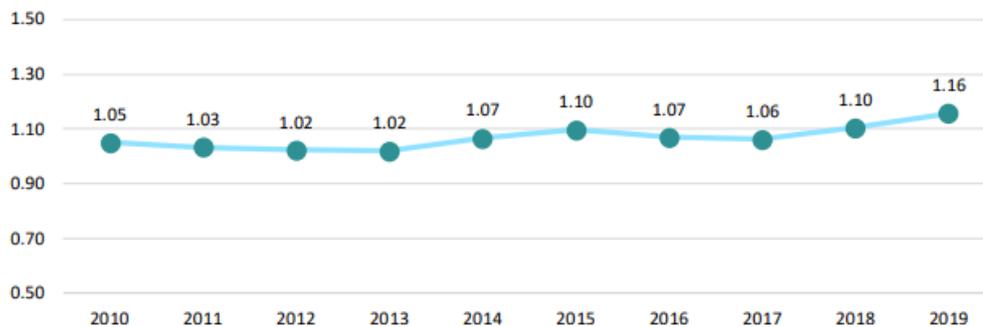


Figura 1. Tasa de defunciones registradas por insuficiencia renal por cada 10 000 habitantes. Tabla extraída de la página del inegi<sup>4</sup> 2010-2019

El reporte de causas de muerte en México por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta un total de 14 630 muertes para el 2019 así como un constante número de defunciones a lo largo de los últimos 9 años (figura 1). Siendo la octava causa de muerte en personas de 65 años o más, así como de 15 a 24 años. En México las entidades con mayor número de defunciones debido a la ERC son la Ciudad de México, Veracruz, Puebla, Guerrero y Morelos<sup>6</sup>. El problema en su mayor parte es consecuencia de una enfermedad renal aguda (ERA) mal atendida, la cual es la primera etapa dentro de un daño renal y se caracteriza por una disminución brusca de la función renal o filtración glomerular<sup>7</sup>.

Desafortunadamente la ERC no ha sido tomada con la rigurosidad necesaria en el país, teniendo como repercusión la falta de accesibilidad a servicios por parte de la población, ya sea con y sin seguridad social. Además, no se cuenta con un informe preciso ya que el país no cuenta con un registro centralizado en casos de padecimientos renales ni tampoco que evalúe una planeación de acciones y recursos así como un análisis de costos<sup>8</sup>.

## Etiología de la nefrotoxicidad

En la actualidad la etiología más frecuente de la ERC en México es como consecuencia secundaria de la diabetes y la hipertensión. La evolución de la enfermedad es lenta y requiere de años. Su evolución es asintomática, lo cual hace que los pacientes no se percaten de ella hasta que alcanza niveles mortales, la etapa final conocida como enfermedad renal crónica terminal (ERCT) se presenta cuando es necesaria la terapia de reemplazo renal, no obstante el paciente tiene de 5 a 10 veces más probabilidad de morir antes de alcanzar la etapa terminal<sup>5</sup>.

Para preservar la vida de los pacientes es necesario hacer uso de las llamadas terapias de soporte de vida, que incluye diálisis peritoneal, hemodiálisis, y el trasplante renal las cuales han demostrado lograr alargar la vida del paciente, siendo el trasplante renal la de mayor probabilidad de supervivencia (figura 2). De acuerdo a datos dados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) estas terapias representaron el 15% de su gasto total anual<sup>5</sup>, esto es aproximadamente 13 250 millones de pesos, dinero que se invirtió en sólo el 0.8 % de los derechohabientes .

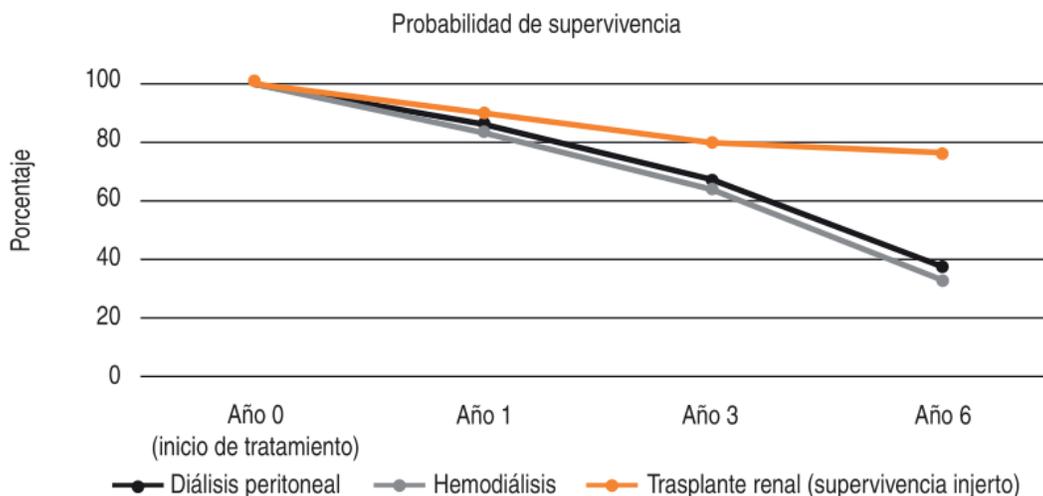


Figura 2. Probabilidad de supervivencia para diálisis peritoneal, hemodiálisis y trasplante renal. Tabla extraída de Sánchez-Cedillo, et al<sup>5</sup>.

En el caso de la exposición a sustancias tóxicas (nefrotoxinas ambientales) como metales pesados<sup>9</sup>, antibióticos, aines, etc. Actualmente, el estudio de los efectos tóxicos en el ser humano ha cobrado gran importancia debido a las grandes cantidades de estos productos, generadas y desechadas como consecuencia de la actividad industrial o inclusive la artesanal, la exposición a metales como el cadmio, el mercurio y principalmente el plomo resultan de gran preocupación debido a la fuerte asociación entre estos y el daño renal. El plomo (Pb) se absorbe principalmente por ingesta e inhalación así como en menor medida a través de la piel, una vez dentro del organismo se une a proteínas del hematíe y es distribuido a tejidos blandos y hueso, afecta por igual a reacciones enzimáticas en las que interviene el calcio<sup>9</sup>. La excreción urinaria es la principal vía de pérdida de Pb. En general no existen tratamientos para disminuir los niveles de Pb en la sangre o para prevenir su toxicidad.

Un ejemplo de fármacos que provocan un daño renal son los aminoglucósidos, siendo una familia de antibióticos ampliamente utilizados dada su actividad bactericida contra organismos gram negativos<sup>10</sup>. Dentro de los aminoglucósidos encontramos la neomicina, la tobramicina, la amikacina la netilmicina y la gentamicina. La nefrotoxicidad por estos agentes terapéuticos tiene una alta incidencia en pacientes hospitalizados, consistente en una lesión renal aguda debida a necrosis tubular aguda secundaria al uso de estos compuestos<sup>11</sup>.

El riñón, es el órgano que tiene la mayor irrigación sanguínea por gramo de tejido, además es la principal vía de eliminación de fármacos. Lo que resulta en la acumulación del antibiótico en la corteza. El número de grupos amino catiónicos por cada molécula es directamente proporcional a la nefrotoxicidad, siendo la gentamicina intermedia en cuanto al daño. Se ha identificado la megalina, una molécula que abunda en la región apical de las células del túbulo proximal renal como una de las protagonistas en la fisiopatología.

Así entonces, podemos concluir que la enfermedad renal representa un gran problema de salud en México al cual no se le ha dado la suficiente atención, siendo poco regulada en cuanto a estadística se refiere, así como representar un alto impacto económico para el paciente o para el gobierno en el caso de contar con seguridad social. Sabemos que su etiología es múltiple y que su desarrollo pasa inadvertido para los pacientes con ECD, las terapias son costosas y de difícil acceso, siendo la última instancia para salvaguardar la vida y no existiendo un protocolo para la prevención e inclusive su detección temprana, es por ello que es de suma importancia diseñar y proponer un posible tratamiento para detener en la medida de lo posible el daño renal crónico y evitar el aumento continuo de este padecimiento.

# 2 Antecedentes

El número de pacientes con ERC va en aumento, los tratamientos son caros y son solamente sintomático. Ningún tratamiento actual previene o disminuye el avance del padecimiento. Por ello es importante la investigación enfocada a descubrir nuevos fármacos que disminuyan el daño renal agudo (AKI por sus siglas en inglés) y la evolución a la enfermedad renal crónica (también conocido como CKD). Una de las moléculas que han tenido más relevancia en este tema, es la melatonina. La melatonina ha demostrado disminuir los efectos tóxicos del plomo en el riñón<sup>1,2,12</sup>.

En el estudio realizado en nuestro grupo se ha estudiado la distribución de plomo en animales cotratados con melatonina, Everardo *et al*<sup>1</sup> se sometió a un grupo de ratas a diferentes dosis de acetato de plomo, algunos de esos grupos se les coadministró melatonina, durante 3 semanas. Los niveles de plomo se observan en la figura 3. Se puede observar que para órganos como cerebro y el riñón los niveles de Pb disminuyeron en comparación con aquellos donde no se les coadministró la melatonina esto para dosis de 15 y 20 mg/kg/día mientras que, en el tejido óseo, donde recordamos se llega a alojar el Pb de manera peligrosa, ha también logrado disminuir su concentración en las dosis previamente indicadas, este resultado se repite para muestras de sangre, mientras que para las orina, salida metabólica principal para la eliminación de Pb, ha logrado aumentar la concentración del metal para todas las dosis. Esto es un buen indicativo de la influencia que ejerce la melatonina para ayudar a eliminar el Pb del cuerpo<sup>1</sup>.

	Blood		Bone		Brain		Dregs		Kidney		Liver		Urine	
	µg/dl	SE	µg/g	SE	µg/g	SE	µg/g	SE	µg/g	SE	µg/g	SE	µg/dl	SE
Control	2.11	0.08	0.16	0.06	0.01	0.00	0.71	0.16	0.13	0.03	0.07	0.02	0.88	0.44
Pb10	26.61 <sup>a</sup>	5.11	74.49 <sup>a</sup>	23.66	0.57 <sup>a</sup>	3.01	6.97 <sup>a</sup>	0.99	46.18 <sup>a</sup>	3.41	23.44 <sup>a</sup>	11.11	11.84 <sup>a</sup>	4.07
Pb10 M	35.54 <sup>a</sup>	5.48	94.98 <sup>a</sup>	4.72	0.54 <sup>a</sup>	0.05	63.48 <sup>a</sup>	0.87	67.36 <sup>a</sup>	12.64	17.18 <sup>a</sup>	2.32	16.93 <sup>a</sup>	3.65
Pb15	35.30 <sup>a</sup>	1.77	128.41 <sup>a</sup>	4.61	0.93 <sup>a</sup>	0.13	46.38 <sup>a</sup>	1.36	62.93 <sup>a</sup>	18.53	18.94 <sup>a</sup>	3.89	14.39 <sup>a</sup>	3.07
Pb15 M	26.83 <sup>b</sup>	6.27	70.06 <sup>a,b</sup>	21.17	0.50 <sup>a,b</sup>	0.13	40.05 <sup>a</sup>	12.67	51.81 <sup>a</sup>	13.17	23.74 <sup>a,b</sup>	14.79	32.22 <sup>b</sup>	2.67
Pb20	53.64 <sup>a</sup>	10.88	130.08 <sup>a</sup>	29.83	0.82 <sup>a</sup>	0.24	65.12 <sup>a</sup>	4.75	75.34 <sup>a</sup>	1.35	42.60 <sup>a</sup>	19.70	18.61 <sup>a</sup>	17.28
Pb20 M	22.54 <sup>b</sup>	5.01	49.42 <sup>b</sup>	19.51	0.61 <sup>a,b</sup>	0.19	47.18 <sup>a,b</sup>	9.28	45.58 <sup>a,b</sup>	6.10	117.12 <sup>a,b</sup>	6.28	46.09 <sup>b</sup>	1.67

Figura 3. Niveles de plomo en diferentes muestras. Tabla extraída de Díaz *et. al*.<sup>6</sup>

En otro de nuestros trabajos que apoya los resultados obtenidos sobre el comportamiento de la melatonina sobre los niveles del Pb, es el realizado por Karla *et al*<sup>13</sup>. En este trabajo un grupo de ratas a las cuales se les sometió a ciclos de luz oscuridad de 12/12 h y se les administró acetato de plomo en diferentes dosis, algunos de estos grupos de manera conjunta se les coadministró una dosis fija de melatonina para así observar el efecto de la neurohormona, de manera diaria durante 3 semanas<sup>2</sup>, posteriormente fueron sacrificadas para obtener muestras de hígado, riñón y sangre. Los resultados obtenidos para este experimento nos revelan detalles similares a los mencionados previamente, en este caso podemos observar en la figura 4 como para las dosis altas de Pb la melatonina logró

reducir la concentración del metal en la sangre y en el riñón, donde recordemos son puntos de interés para nuestro trabajo, como segundo punto, notamos que la melatonina a concentraciones bajas de acetato de plomo no logró realizar el efecto reductor deseado y en su caso se observa un ligero incremento en los niveles del metal, esto no obstante, no genera un problema dado que lo que se busca es eliminar el Pb del organismo a altas concentraciones, que es cuando genera un efecto negativo sobre el espécimen.

Condition	Blood		Kidney		Liver	
	µg/dl	SE	µg/g	SE	µg/g	SE
Control	2.56	0.45	0.42	0.30	0.34	0.44
MEL	3.48	0.58	0.54	0.45	0.51	0.67
1	20.2 <sup>a</sup>	0.1	210 <sup>a</sup>	103.4	30.2 <sup>a</sup>	7.2
1M	28.1 <sup>b</sup>	0.6	303 <sup>a</sup>	106.1	21.2 <sup>b</sup>	7.1
2	31.3 <sup>a</sup>	0.6	316 <sup>a</sup>	94.3	28.8 <sup>a</sup>	6.5
2M	19.4 <sup>b</sup>	0.7	213 <sup>b</sup>	75.1	46.1 <sup>a</sup>	109
3	43.2 <sup>a</sup>	0.9	847 <sup>a</sup>	902.1	73.4 <sup>a</sup>	37.1
3M	28.2 <sup>b</sup>	0.5	265 <sup>b</sup>	188.0	46.3 <sup>a</sup>	23.3

Figura 4. Niveles de plomo en diferentes muestras. Tabla extraída de Hernández-Plata et. al.<sup>9</sup>

Otro de los aspectos estudiados en este artículo fue el efecto de la administración de plomo y plomo melatonina en la expresión de las proteínas transportadoras de metales, las cuales se ha demostrado tienen un papel importante en la absorción, distribución y excreción del cadmio<sup>14,15</sup>. Aquí es posible observar como una mayor expresión de la proteína ZIP8 en hígado a comparación del riñón, mientras que en aquellos experimentos donde se coadministro la melatonina se observa una reducción poco significativa de la expresión de ZIP8. Mientras que la exposición al Pb redujo la expresión de ZIP8 de manera no dependiente de la dosis, y la melatonina altero de manera poco significativa los niveles.

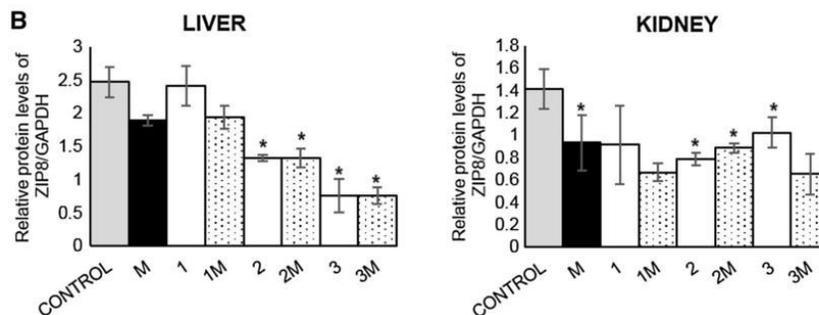


Figura 5. Efecto de la exposición al Pb en la proteína ZIP8 en órganos de ratas. Gráficas extraídas de Hernández-Plata et. al.<sup>9</sup>

Así como la proteína acarreadora del metal zinc ZIP8, otra proteína importante en el transporte del plomo es la transportadora de metales DMT1. Nuestro grupo ha estudiado Tayde et al<sup>13</sup> abarca el estudio de la formación de complejos de las proteínas transportadoras

de metales con la melatonina<sup>13</sup> MT y de manera conjunta son integrados los metabolitos activos. Los metabolitos son parte importante a considerar en nuestro estudio, dado que el tiempo de vida media de la MT en el organismo es relativamente corto, los metabolitos se consideran importantes para la actividad biológica. Por lo que estudiamos los metabolitos N1-acetil-N2-formil-5-metoxicianuramina (AFMK), N1-acetil-5-metoxicianuramina (AMK) y la ciclo hidroximelatonina (3OHM) cuyas estructuras se pueden observar en la figura 6. Se ha reportado que gran parte de la MT se metaboliza en AFMK y AMK, estos dos últimos median gran parte de las reacciones en el organismo, no obstante se observa una considerable cantidad de 3OHM en condiciones de estrés oxidativo<sup>16</sup>.

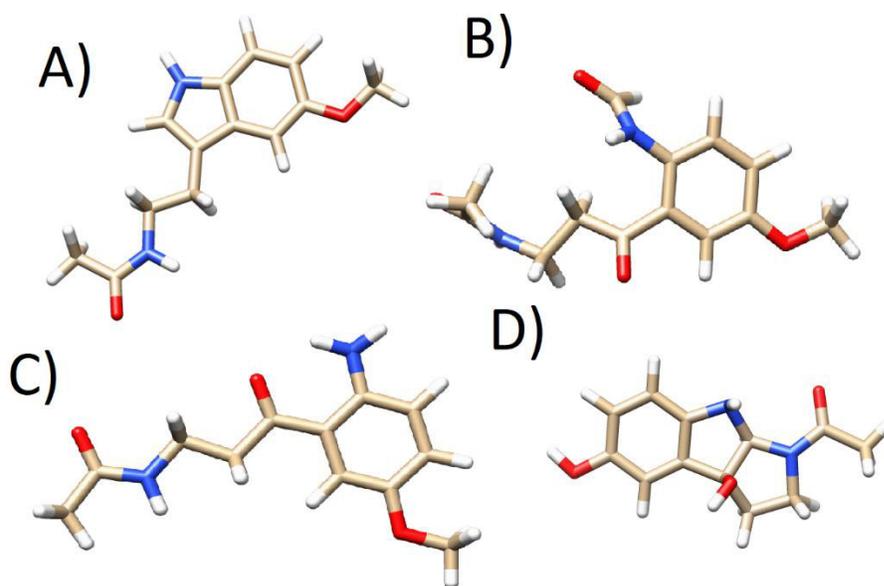


Figura 6. Estructuras de A) melatonina, B) AFMK, C) AMK y D) 3OHM

Durante este trabajo se ha realizado un estudio *in silico* sobre la naturaleza de unión entre las proteínas transportadoras de metal, el acetato de plomo y la MT, así como sus metabolitos activos, por medio de la técnica de acoplamiento molecular (*docking*) donde se logró obtener la unión entre las ya mencionadas especies químicas, de igual manera con esta información se generó datos fisicoquímicos, como la energía de enlace, la longitud de enlace, eficiencia del ligando, algunas descripciones particulares para puentes de hidrogeno así como modelos 3D del acoplamiento.

	DMT1		ZIP8	
	E*	LE <sup>†</sup>	E	LE
Melat <sup>‡</sup>	-115.98	-6.82	-108.87	-6.4
AFMK	-116.22	-6.12	-102.80	-5.41
AMK	-108.25	-6.37	-98.78	-5.81
OH-Met	-103.39	-5.74	-99.78	-5.54
Melat-Pb <sup>§</sup>	-131.78	-7.32	-134.63	-7.48
AFMK-Pb	-116.87	-5.84	-128.40	-6.42
AMK-Pb	-122.38	-6.80	-128.32	-7.13
OH-Met-Pb	-106.69	-5.61	-99.83	-5.25
Melat-Pb-AcO <sup>**</sup>	-125.88	-5.04	-130.25	-5.92
AFMK-Pb-AcO	-142.29	-5.93	-131.55	-5.48
AMK-Pb-AcO	-137.83	-6.26	-125.22	-5.69
OH-Met-Pb-AcO	-123.84	-5.38	-94.45	-4.11
Melat-Pb-AcO2 <sup>††</sup>	-149.55	-5.75	-132.06	-5.08
AFMK-Pb-AcO2	-143.96	-5.54	-128.63	-4.59
AMK-Pb-AcO2	-139.71	-5.37	-146.46	-5.63
OH-Met-Pb-AcO2	-130.54	-4.83	-105.37	-3.90

Figura 7. Energías de enlace en kcal/mol (E) y eficiencia del ligando (LE) en kcal/mol para las mejores poses obtenidas de los cálculos de docking. Tabla extraída de Villaseñor-Granados et. al.<sup>13</sup>

Visualizando los resultados de la figura 7 tendremos las energías de enlace para las diferentes especies químicas estudiadas y acopladas con las dos proteínas DMT1 y ZIP8, todos presentan energías negativas, dando lugar a interacciones estables, para la DMT1 la energía más estable se presenta con la unión del complejo Melat-Pb-AcO2 mientras que con ZIP8 tenemos al complejo AMK-Pb-AcO2, si bien estas energías no están normalizadas con respecto a la cantidad de átomos del complejo, cabe resaltar la eficiencia del ligando de dichos resultados, llevando una energía más estable con DMT1 el complejo Melat-Pb, y de manera análoga con ZIP8 está presente AMK-Pb, dando lugar a una buena afinidad por dicho metal, no obstante los resultados no difieren mucho entre sí, permitiéndonos deducir que los complejos de MT y sus derivados tendrán buena afinidad con el Pb.

Otro de los aspectos importantes a evaluar es la capacidad de la melatonina frente a un compuesto ya conocido por sus propiedades de formar complejos estables con metales dentro del organismo, así como su efecto con otros metales tanto endógenos como exógenos. Consideraremos al EDTA, este compuesto químico mejor conocido por sus propiedades quelantes y de uso médico para el tratamiento de las intoxicaciones por metales pesados. Sin embargo, el EDTA no distingue entre metales esenciales y tóxicos para el organismo para formar complejos. En el trabajo realizado por Erik *et al*<sup>3</sup> se realiza un estudio in silico comparando la eficiencia, así como energía de unión entre el EDTA, la MT y sus metabolitos activos (figura 6) con diferentes tipos de metales<sup>3</sup>, así como el estudio fisicoquímico y electrónico de dichas uniones.

Se realizó el modelado molecular con su respectiva optimización, así como el cálculo de las superficies de potencial electrostático, la energía libre de Gibbs de las reacciones de complejación, así como interacciones de repulsión de Pauli. Se estudiaron metales endógenos del cuerpo humano como lo son el Mg, Ca, Cu, Zn, así como el Pb aislado y su equivalente metabólico el acetato de plomo, de igual manera se incluyó en el estudio otros metales pesados que tienen toxicidad, el As y el Cd. Los resultados correspondientes a las energías libres de Gibbs se observan en la figura 8, aquí inmediatamente notamos como los metales forman complejos con energías estables con todos los metales, salvo la forma más oxidada del acetato de plomo, en este caso la melatonina y el 3OHM poseen las únicas energías negativas aunque algo bajas, no obstante para el resto de los sistemas tenemos una buena afinidad, el EDTA como cabe esperar mostró en su mayoría de caos las energías libres de Gibbs más estables, la MT y sus metabolitos muestran resultados variables pero favorables, la MT como tal tiene buena afinidad por los metales pesados como el Cd y el As mayores a los del Mg y Ca dando un buen panorama para proteger los metales endógenos, por otro lado si bien la afinidad con el Pb y sus metabolitos no fue la mejor si sigue estando en valores adecuados para tomarse en cuenta, por su parte los metabolitos activos de la MT mostraron una tendencia a unirse a los diferentes metales con energías estables, como ya se ha mencionado el AFMK y el AMK representan las especies de interés dado su mayor concentración en el organismo con respecto a 3OHM que se presenta en menor concentración en el cuerpo. El AMK refleja energías más estables a comparación del AFMK, dándonos una visión de un posible metabolito a tener en cuenta, de manera general, el comportamiento entre AMK y 3OHM es muy parecido, ambos compiten con las mejores energías entre los metabolitos, siendo ligeramente mejores las energías para AMK, en cuanto al Pb y sus derivados, el resultado es más variado encontrando incluso el 3OHM con energías más estables, lo que nos permite dar lugar a no descartar ningún metabolito como posible actor de la eliminación metabólica del Pb.

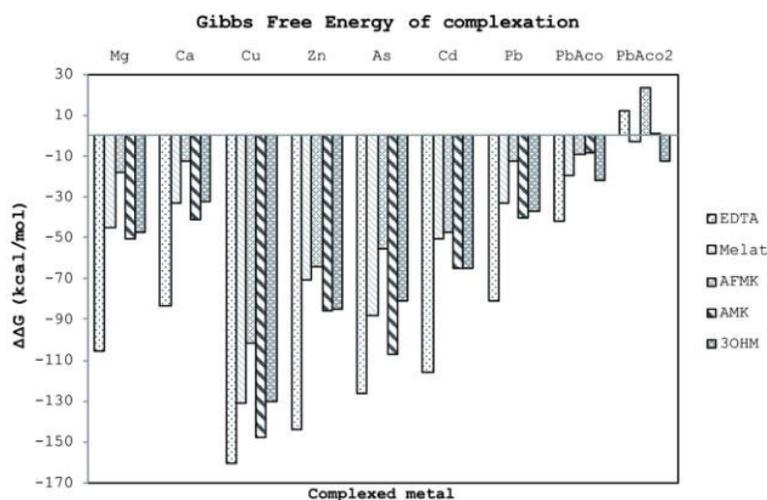


Figura 8. Energías libres de Gibbs para la complejación de todos los sistemas estudiados. Gráfica extraída de Díaz-Cervantes *et al*<sup>3</sup>.

## Fibrosis sistémica

La inflamación es un proceso que se desarrolla durante la enfermedad renal. Se ha sugerido que la inflamación crónica produce fibrosis que es una alteración patológica que se encuentra en la IRC<sup>17-20</sup>. En la IRC se estima FG menor a 30 ml/min. La edad media de estos pacientes es de (50-60 años)<sup>19</sup>. Recordando que la unidad funcional del riñón es la nefrona, y que se componen tanto del corpúsculo renal, así como la red tubular, como parte de esta red tubular encontramos<sup>20</sup>:

1. Células intersticiales tipo 1: fibroblastos que regulan la síntesis y degradación de la matriz extracelular.
2. Células intersticiales tipo 2: monocitos derivados de macrófagos.
3. MEC: colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, fluido intersticial.
4. Células tubulares: transporte de sustancias

Cuando ocurre una lesión, producto de un traumatismo, una obstrucción, o la ingesta de sustancias dañinas, se produce una respuesta reparadora inflamatoria que, si se perpetua con el tiempo, deriva en una respuesta fibrótica y posterior fallo orgánico<sup>21</sup>. El tejido renal activará células con capacidad de secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, tendrá un aumento de la permeabilidad vascular<sup>22</sup>.

El proceso se caracteriza por la deposición excesiva de matriz extracelular en el compartimiento intersticial<sup>23</sup>, que conduce a una formación de cicatrices. Se ha observado el protagonismo de una forma activada de fibroblastos intersticial, el miofibroblasto positivo de actina de músculo liso alfa, como principal productor de matriz en el riñón. Otra hipótesis sugiere que el metabolismo de los ácidos grasos en las células epiteliales tubulares tienen un papel crucial en la patogénesis de la fibrosis<sup>23</sup>. Se caracteriza por la expresión de enzimas clave y reguladores de la oxidación de ácidos grasos y en un aumento de la deposición de lípidos intracelulares, de manera que una disminución de los ácidos grasos afectaría al metabolismo de los lípidos al alterar el equilibrio entre la síntesis, la captación y el consumo de ellos, provocando una acumulación de lípidos intracelulares desregulada. Los fenómenos oxidativos juegan un papel clave en la señalización y el manejo de la fase inicial, los neutrófilos activados generan una explosión oxidativa que dirige la toxicidad hacia los agentes invasores mientras que la generación de especies reactivas de oxígeno en el tejido dañado produce un gradiente de concentración que dirige a los leucocitos al sitio de la lesión tisular así como promover la adhesión celular endotelial<sup>24</sup>.

## Inflamasomas involucradas en la enfermedad renal

Durante el daño renal existen respuestas inflamatorias que son consecuencia de la detección de células inmunitarias las cuales desencadenan una cadena de proceso que influyen al interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interferón beta (IFN- $\beta$ ) así como citocinas proinflamatorias como la interleucina 18 (IL-18)<sup>25</sup>.

La citocinas IL-18 así como la IL-1 $\beta$  causan daño renal después de unirse a sus receptores, estos se encuentran expresados abundantemente en leucocitos infiltrados, células endoteliales renales así como células epiteliales tubulares<sup>26</sup>. Así mismo ambas citocinas promueven la expresión de moléculas de adhesión como lo son la molécula de adhesión celular vascular-1, la molécula de adhesión intercelular-1 y factores de crecimiento endotelial vascular, pueden activar vías de señalización que conducen a la producción de óxido nítrico, ciclooxigenasa-2 y superóxidos<sup>27</sup>,

---

# 3

## ***Hipótesis***

Se ha documentado que la melatonina tiene propiedades inmunoregulatoras que disminuyen la inflamación. La unión de la melatonina a la IL18 que es una citocina proinflamatoria podría ser uno de los mecanismos por el que la melatonina disminuya el daño renal y su evolución. La acción inflamatoria podrá describirse a partir de los descriptores globales y locales de la DFT conceptual y la comprensión de sus interacciones a partir de estudios de acoplamiento molecular (docking).

---

# 4

## ***Objetivos***

### 4.1 Objetivo general:

Se realizarán estudios computacionales para determinar la naturaleza de la unión entre la melatonina y algunas proteínas proinflamatorias que se producen en el daño renal agudo.

### 4.2 Objetivos Particulares:

- i. Se realizarán análisis de acoplamiento *in silico* y modelos de homología para determinar la naturaleza de la unión entre la melatonina y algunas proteínas proinflamatorias (MCP-1 e IL-18) que se sospecha que causan inflamación durante el AKI.
- ii. Se estudiará la molécula de la melatonina, así como sus metabolitos activos mediante descriptores globales y locales de la DFT conceptual para conocer y comparar la reactividad de las moléculas mediante el análisis de su estructura electrónica.

# 5 Generalidades

## 5.1 El riñón

El riñón es un órgano par que se ubica en la región retroperitoneal, detrás del hígado y los intestinos, en la parte baja de la espalda en el nivel de la doceava vértebra torácica y la tercera vértebra lumbar<sup>28,29</sup>. Por el hilio renal, a cada riñón le llega una arteria y egresa una vena, están rodeadas de grasa perirrenal y en la parte superior de los riñones se encuentran las glándulas suprarrenales. Cada día, los riñones de una persona procesan aproximadamente 190 litros de sangre que conlleva a la eliminación aproximada de 2 litros de productos de desecho y agua en exceso<sup>30</sup>, los desechos son expulsados por medio de la orina que fluye hacia la vejiga a través de los uréteres.

## 5.2 Funciones del Riñón

Los riñones trabajan constantemente y cumplen diversas funciones que incluyen<sup>29</sup>:

- Excreción de residuos y sustancias extrañas en la orina
- Producción de Calcitriol, forma activa de la vitamina D
- Síntesis de Eritropoyetina, que estimula la producción de glóbulos rojos
- Producción de renina
- Regulación de propiedades en la sangre:
  - Composición iónica
  - pH
  - Osmolaridad
  - Volumen
  - Tensión arterial
  - Niveles de glucosa

## 5.3 Anatomía del Riñón

Un corte a la mitad de la estructura del riñón nos permite observar dos regiones perfectamente diferenciadas (figura 9), la corteza renal, localizada en la parte exterior y la médula renal en la región interna. La corteza renal es la zona de textura lisa que se extiende desde el exterior o cápsula renal hasta las bases de las estructuras llamadas pirámides renales<sup>29</sup>, por su parte la médula renal consta de entre 8 y 18 pirámides renales.

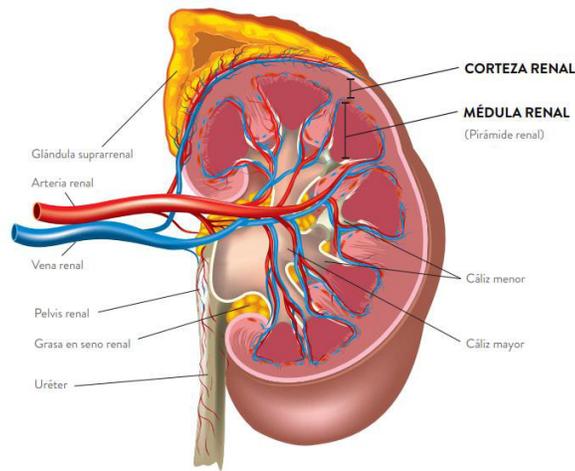


Figura 9. Anatomía interna del riñón. Imagen extraída de NIDDK<sup>30</sup>.

La unidad funcional del riñón es la nefrona (figura 10), de las cuales hay aproximadamente un millón por cada riñón, consta de tanto la corteza renal como la médula renal. Existen dos estructuras que componen cada una de estas nefronas, un corpúsculo renal y un túbulo renal<sup>28-31</sup>. El corpúsculo a su vez se compone del glomérulo (una red capilar) más la cápsula de Bowman. En conjunto forman una capa fina, una membrana de filtración, que permite el paso de agua y solutos pequeños, pero evita a su vez la filtración de la mayoría de proteínas plasmáticas, células sanguíneas y plaquetas, finalmente el líquido filtrado pasa al túbulo renal. El túbulo renal por su parte se compone en tres partes diferenciadas, el túbulo contorneado proximal, la asa de Henle y el túbulo contorneado distal<sup>29</sup>. En el túbulo proximal es donde ocurre la mayor absorción de solutos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  así como agua, de manera alterna se desechan productos como amonio o urea a la orina. El asa de Henle cumple una función de reabsorción para los iones y el agua restantes y finalmente el tubo distal termina por reabsorber del 90-95% de los solutos y agua procesados para finalmente excretar los productos de desecho en la orina<sup>29</sup>.

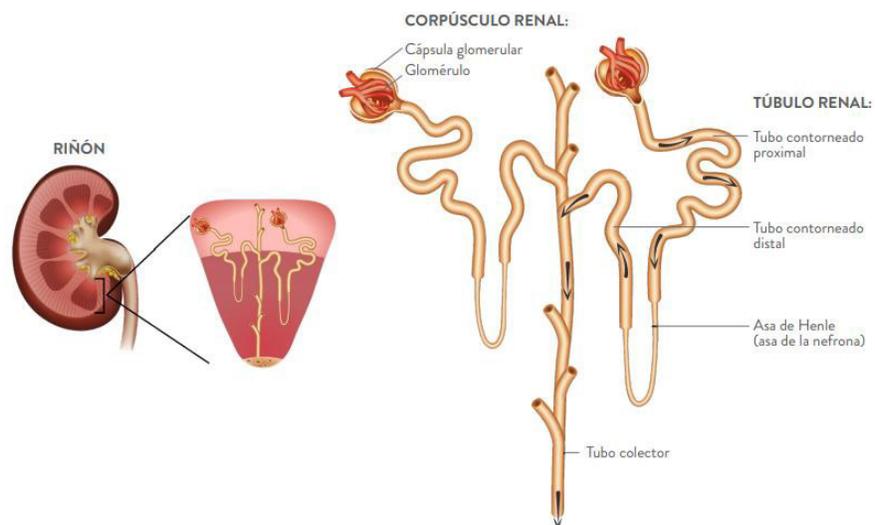


Figura 10. Componentes funcionales de la nefrona. Imagen extraída de NIDDK<sup>30</sup>

## 5.4 Causas de una falla renal

Siendo que la unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual se encarga de la filtración glomerular, es natural que la mayoría de las enfermedades de los riñones tengan relación con las nefronas, dicho daño puede ser resultado de lesiones o envenenamiento con tóxicos. El proceso de la destrucción de las nefronas generalmente es lento y pasa inadvertido, siendo este último su mayor riesgo a pacientes que no se dan cuenta del problema hasta ya muy avanzado. Como ya se ha hablado en el capítulo anterior, las principales causas de insuficiencia renal son la diabetes y la hipertensión, así como la exposición a sustancias nefrotóxicas como lo son los metales pesados o inclusive algunos medicamentos de venta libre como los antiinflamatorios no esteroideos al ser tomados con regularidad durante un largo período. Además de antibióticos como los aminoglucósidos, comentados anteriormente.

Para la diabetes, la cual es una enfermedad que se caracteriza por una alteración en el metabolismo de la glucosa, esta alta concentración en la sangre de glucosa resulta dañina para el riñón<sup>29,32</sup>, debido a que induce estrés oxidativo. Además de la hiperglicemia, la hipertensión arterial alta puede a su vez dañar los vasos sanguíneos en los riñones y si estos vasos presentan daños les resulta imposible filtrar los desechos con la misma capacidad que lo harían en su estado normal<sup>29,33</sup>.

Los agentes químicos industriales pueden llegar a ocasionar daños sobre el riñón, los metales pesados se encuentran en productos de desecho de la industria cuya mala regulación o tratamiento provoca la exposición prolongada a trabajadoras o inclusive personas que de manera indirecta están expuestas ya sea por una mala contención o una incorrecta eliminación de los desechos. El Pb ha mostrado tener un rol causal en el desarrollo de la enfermedad renal<sup>9,35</sup>. La nefropatía crónica, consecuencia de la prolongada exposición a Pb, se caracteriza por un lento y progresivo desarrollo de nefritis intersticial, acompañado de una reducción de la tasa de filtración glomerular. La intoxicación ocurre tanto por ingesta como inhalación y en algunos casos puede ser a través de la piel. El Pb en sangre se une a proteínas del hematíe y es distribuido a tejidos blandos y hueso, este último resulta un lugar preferente por el Pb para invadir, mientras que a nivel intracelular el metal causa daño mitocondrial, forma radicales libres, y apoptosis<sup>9</sup>. Consecuencias mortales como un infarto al miocardio así como accidentes cerebrovasculares fueron encontrados en pacientes con concentraciones altas de Pb en sangre<sup>35</sup>.

Por otra parte existen medicamentos que pueden provocar nefrotoxicidad, algunos de ellos son los antibióticos como los aminoglucósidos (AG)<sup>10,36</sup>. Los aminoglucósidos son una familia de antibióticos introducidos en 1944 y que han demostrado tener una gran actividad bactericida contra microorganismos gram negativos, entre ellos encontramos la neomicina, tobramicina, amikacina, netilmicina y la gentamicina. Diversos estudios han mostrado un

incremento en la producción del factor activador de plaquetas PAF, en ratas tratadas con gentamicina<sup>37,38</sup>, lo que sugiere que dicho fármaco pudiera estar implicado en el mecanismo tóxico a través de un efecto vasoconstrictor que provoca un efecto vasoconstrictor y a su vez un descenso en la tasa de filtración glomerular<sup>10</sup>. En general los AG son eliminados vía renal al ser filtrados en el glomérulo, no obstante, cierta parte de los AG puede llegar a acumularse en el segmento apical de las células tubulares proximales alcanzando una mayor concentración e inclusive llegan a ser reabsorbidos. Dicha acumulación provoca la toxicidad en el túbulo, se unen a los fosfolípidos de la membrana tubular, favorecido por el receptor megalina y el gp330<sup>36</sup>. Sujetos con función renal normal al ser sometidos a un tratamiento con Gentamicina tienen probabilidad considerable de desarrollar nefrotoxicidad, indicada por el aumento de creatinina en sangre.

## 5.5 Estadios del daño renal

La tasa de filtración glomerular es una medida fisiológica de la función renal que se basa en el cálculo aproximado de la cantidad de sangre que pasa a través de los glomérulos cada minuto. Al ser la ERC algo progresivo, va evolucionando en diferentes estadios con sus respectivas manifestaciones clínicas, estos estadios se clasifican según la filtración glomerular (FG)<sup>39,40</sup>:

Tabla 1. clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica según la National Kidney Foundation

Estadio	FG (ml/min/m <sup>2</sup> )	Descripción
1	90	Daño renal con FG normal, por lo general asintomático
2	89-60	Daño renal con FG ligeramente disminuido, asintomático
3	59-30	FG moderadamente disminuido, acumulación de sustancias tóxicas en el torrente sanguíneo, presentan síntomas y alteraciones del metabolismo óseo.
4	29-15	FG gravemente disminuido, alto riesgo de complicaciones cardiovasculares, mayor cantidad de síntomas, como alteraciones nerviosas, entumecimiento, anorexia.
5	<15	Fallo renal, estadio de la ERCT, es necesario tratamiento sustitutivo

## 5.6 Tratamientos

Actualmente el tratamiento de la ERC es sintomático. Consiste en compensar la deficiencia de algunas funciones renales de depuración y de secreción de hormonas. La compensación del metabolismo ácido-base y el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico, la profilaxis, así como el tratamiento de la osteodistrofia, la anemia y alteraciones del metabolismo lipídico<sup>41</sup> son parte del tratamiento de estos pacientes. Para llevarse a cabo un tratamiento nos enfocaremos en los niveles de FG, si esta es superior a 30 ml/min se limitará a un control de la hipertensión arterial, mantenimiento hidroelectrolítico, así como aportes calóricos suficientes, para niveles inferiores a 30 ml/min debe haber un control muy riguroso para salvaguardar la vida del paciente. La restricción proteica, el aporte calórico, de líquidos, de sales, la hiperfosfatemia, la hipocalcemia, la anemia son algunos de los puntos clave a monitorear para un paciente con ERC<sup>41</sup>.

Actualmente no existen tratamientos curativos de la ERC. Considerando que la inflamación crónica se relaciona con la fibrosis renal característica de la ERC se ha estudiado la regulación de la inflamación.

## 5.7 Citocinas

Las citocinas (o citoquinas) son un grupo de proteínas y glucoproteínas que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamación así como intervenir como factores de crecimiento, entre ellas las células hematopoyéticas<sup>42</sup>. Presentan retroregulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas, sino con otras citoquinas que pueden ser producidas por la misma célula teniendo un efecto de inducir o inhibir la producción de otras citoquinas<sup>43</sup>. Las citoquinas actúan como reguladores sistémicos, modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares. Tienen el papel de actuar como reguladores de crecimiento locales (figura 11). Es importante destacar que la actuación biológica se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana<sup>42</sup>.

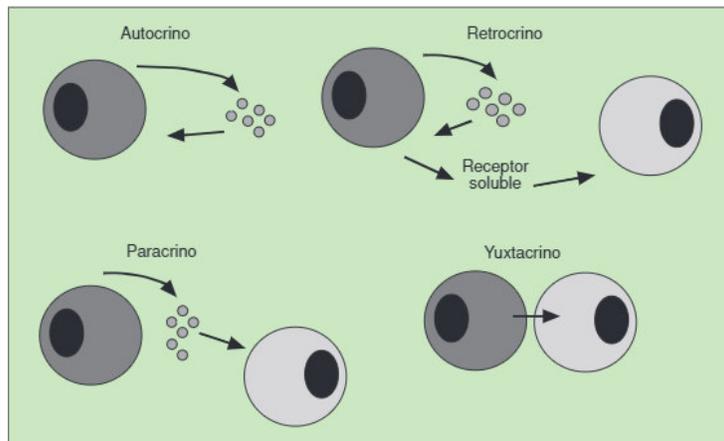


Figura 11. Mecanismos de actuación de citocinas. Imagen extraída de Ostagal *et al*<sup>42</sup>.

## 5.8 Función de las citocinas

Las citocinas forman parte de una compleja red de interacciones celulares, en las que cada una actúa al inducir o suprimir su propia síntesis y/o la de otras citocinas o sus receptores. Favorecen de manera sinérgica la acción de otras citocinas o actúan como antagonistas, pueden tener entonces, un efecto redundante<sup>42</sup>. Tienen la capacidad de actuar sobre diversos tejidos y producir múltiples efectos biológicos como se observa en la figura 12. Generalmente actúan en cascada, de manera que una citocina estimula sus células blanco para que produzcan más citocinas, de igual manera influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y supervivencia de las células inmunológicas<sup>44</sup>, regulan a otras citocinas que pueden aumentar (proinflamatorias) o atenuar (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria. Entre las citocinas proinflamatorias, se tienen las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7, 18, mientras que las antiinflamatorias son las IL-4, IL-10, IL-13. Son entonces las citocinas mediadores necesarios para conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión, favoreciendo la cicatrización apropiada de la herida, no obstante, su sobreproducción a partir de una lesión puede manifestarse sistémicamente como una inestabilidad hemodinámica o con problemas metabólicos<sup>45</sup>.

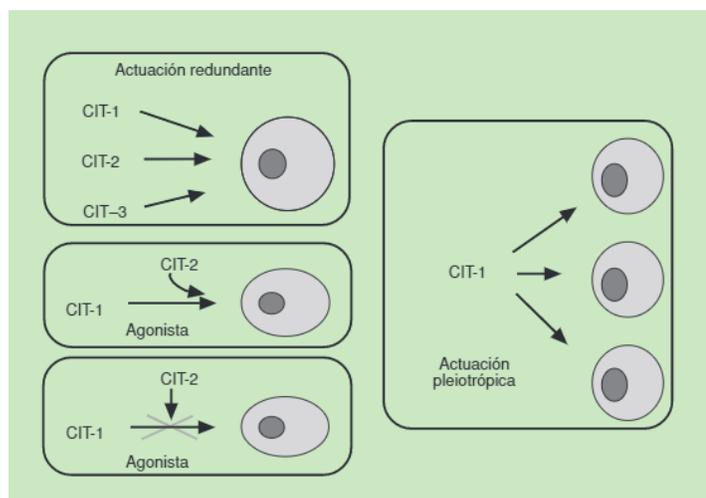


Figura 12. Actuación de las citocinas<sup>42</sup>. Imagen extraída de Ostagal *et al*<sup>42</sup>.

Las citocinas tienen su origen en muchos tipos de células que las producen, cabe destacar a los macrófagos y las células T en el sistema inmune, dado que las citocinas son esenciales para que se produzca la respuesta inmune<sup>43</sup>. Se unen a receptores específicos donde iniciarán una cascada de transducciones intracelulares. Su producción es breve dado que se limita a la duración del estímulo y pueden actuar de diferentes maneras con características distintas, lo que se conoce como pleiotropía, incluso pueden ejercer el mismo efecto diferentes citoquinas, redundancia, así como tener efectos de sinergismo y antagonismo, donde potencian o inhiben a otras citocinas respectivamente<sup>43</sup>.

El efecto biológico de las citocinas está determinado por las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2. IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  constituyen el patrón de expresiones para células tipo Th1, mientras que las células de tipo Th2 expresan IL-4, 5, 10 y 13. Las citocinas al interactuar entre sí, constituyen un mecanismo de regulación entre el balance de inmunidad celular y humoral. De modo que el IFN- $\gamma$  inhibe la proliferación de células Th2 y las IL-4 y 10 inhiben la proliferación de células Th1<sup>42,43</sup>.

## 5.9 Citocinas y proceso inflamatorio

Las citocinas tienen un papel protagónico en el proceso inflamatorio el cual está influenciado por el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias<sup>42</sup>. Dentro de las citocinas proinflamatorias encontramos a las quimiocinas, entre ellas la IL-8, que participa en la activación de distintos tipos de células que participan en la inflamación, mientras que IL-1 y TNF- $\alpha$  tiene un efecto sinérgico sobre la inflamación, por otro lado, encontramos dentro de las citocinas antiinflamatorias la IL-10, el IL-1ra.

Durante el daño renal se presenta una rápida acumulación de neutrófilos y monocitos macrófagos, aquí se presenta una fuerte relación con diferentes citocinas, entre ellos la IL-8, IL-1 y la IL-2 que tienen un efecto específico sobre monocitos y la IL-5 que opera en general atrayendo a los monocitos y linfocitos<sup>21</sup>. Para nuestro proyecto nos enfocaremos en algunas citocinas, específicamente en la familia de las interleucinas que están estrechamente relacionadas en el proceso inflamatorio:

La citocina IL-18 que induce la síntesis de IFN- $\gamma$  y tiene un efecto sinérgico con la IL-12 respecto a la producción de IFN- $\gamma$  y por parte de los linfocitos T, probablemente a causa del aumento de expresión de receptores para la IL18 producidos por la IL-12. Igualmente, la IL18 aumenta la producción de IL-2 y la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2, mientras que de manera paralela inhibe la producción de IL-10<sup>42</sup>. La IL-18 está clasificada como un miembro de la familia de las IL-1 al compartir características en común, como lo es la ausencia de un péptido señal. Aunque se conoce su principal función como factor que induce la producción de IFN- $\gamma$  a partir de células Th1, también actúa sobre las células T, las células *natural killer* NK, células B, dendríticas, y macrófagos para producir IFN- $\gamma$  en presencia de IL-12, por otro lado, al estar con IL-2 en lugar de IL-12 induce la producción de citocinas Th2 a partir de células NK e incluso células Th1. De manera sinérgica con IL-3 induce a los mastocitos y basófilos a producir IL-4 e IL-13, estimulando la inmunidad tanto innata como adquirida<sup>46</sup>. Otra citocina de interés es la IL-13 la cual es producida por células T y que

regula la función de monocitos y células B. Disminuye por igual la producción de interleucinas proinflamatorias y de quimiocinas, a la vez que aumenta la producción de IL-1Ra.

Otra de las citocinas de las cuales hemos hablado pero no profundizado son las quimiocinas, las cuales son una familia perteneciente a la citocinas quimioatrayentes, las cuales se dividen en familias en función del residuo de cisteína conservado en el extremo N-terminal<sup>47</sup>. Juegan un papel importante en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como la inducción de quimiotaxis mediante la activación de receptores acoplados a proteína G. La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) es clave en la regulación de la migración de monocitos/macrófagos, es necesaria para la vigilancia inmunológica, así como en respuesta a la inflamación. La MCP-1 y sus receptores son cruciales en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento de células inmunes en el sitio de inflamación<sup>47,48</sup>.

## 5.10 Melatonina

La melatonina es una hormona que se aisló por primera vez de glándulas pineales bovinas y se identificó estructuralmente en 1958, es bien conocida por ser la molécula promotora del sueño, una molécula señal de la luz y la oscuridad conocida como reguladora de fotoperiodos. Gracias a ella los vertebrados sincronizan tanto sus ritmos circadianos como sus actividades reproductivas<sup>16</sup>, tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y actuar sobre receptores de membrana, citosólicos y nucleares.

Su producción ocurre principalmente en la glándula pineal y se regula por el núcleo supraquiasmático, el nombrado reloj biológico del organismo. De manera que la ausencia de luz estimula la producción de dicha molécula<sup>49</sup>. Las concentraciones séricas varían según la edad del individuo, presentando mayores niveles en niños entre uno a tres años de edad y alcanzando concentraciones de 325 pg/ml en comparación con las concentraciones de adultos jóvenes; 10 a 60 pg/ml<sup>49,50</sup>. La melatonina se metaboliza principalmente en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P-450, al ser administrado por vía intravenosa, se distribuye de manera sistémica rápidamente con vida media de 0.5 a 5 minutos aproximadamente, según la actividad enzimática del paciente<sup>50,51</sup>. Las acciones farmacológicas son ejercidas mediante dos receptores conocidos como MT1 y MT2, de alta y baja afinidad respectivamente. Los receptores se encuentran en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, aunque también se ha observado en ciertos tejidos como el intestino, el endotelio de vasos sanguíneos y los ovarios. El receptor MT1 genera el efecto promotor del sueño, mientras que a MT2 se le atribuyen propiedades cronobióticas, es decir la capacidad de modificar la fase o periodo del ciclo circadiano<sup>50,51</sup>, siendo entonces una conocida terapia el uso de la melatonina en los trastornos del sueño.

La melatonina también tiene la capacidad antioxidante, al activar enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión-peroxidasa, glutatión-reductasa y la catalasa, además de facilitar el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo cual tiene el efecto de reducir la pérdida neuronal por apoptosis, la lipoperoxidación, la formación de carbonilos y el daño secundario al ADN<sup>50,52</sup>. La melatonina induce la

proliferación de células T y la regulación positiva de las citocinas proinflamatorias, aumenta el número de células NK y potencia la fagocitosis<sup>53-55</sup>.

Evidencia científica ha puesto a la melatonina como una alternativa viable para reducir la lesión provocada por inflamación como consecuencia de algún padecimiento. Aunque su mecanismo de acción aun es desconocido, se ha observado la tendencia a disminuir la concentración de citocinas proinflamatorias como la IL-6 e IL-8<sup>56</sup>. Mejorando clínicamente la reducción progresiva de los parámetros clínicos de inflamación. Otra de las características importantes es su capacidad antioxidante inclusive durante una operación<sup>57</sup>, donde logro disminuir los parámetros del estrés oxidativo sin modificar los parámetros hemodinámicos. La melatonina tiene un efecto sobre los leucocitos, dado que responden en función del ciclo circadiano así como los leucocitos pueden sintetizar melatonina por sí mismos, así la melatonina al tener efectos tanto endócrinos como paracrinos puede modular diferencialmente las enzimas proinflamatorias<sup>24</sup>. De tal modo que la evidencia sugiere que la molécula de melatonina puede promover las fases tempranas de la inflamación y contribuir a la atenuación de la misma, para así evitar complicaciones de la inflamación crónica.

## 5.11 Química computacional

La química teórica y computacional, es como muchos conocerán una ciencia relativamente joven, que emana de lo que inicialmente se conoce como Química Cuántica. El término “teórica” es una primera generalización para englobar aquellos tratamientos no cuánticos que junto con la Química Cuántica nos permiten entender y tratar un amplio abanico de fenómenos químicos<sup>58</sup>. Hoy en día, la vinculación de la química experimental y la química teórica es un hecho, debido a que las moléculas estudiadas experimentalmente ya son calculables a niveles de teoría confiables, inclusive actualmente cuentan con una interfaz gráfica que facilita su uso, claro está que se requiere del conocimiento básico de los aspectos teóricos en que se sustentan los diferentes métodos y de la comparación de los resultados obtenidos con los resultados experimentales<sup>59</sup>.

### 5.11.1 Aspectos fundamentales

Uno de los problemas importantes y cuyo uso de recurso aumenta considerablemente, es el problema de muchos cuerpos, para sistemas de dos partículas es posible llegar a una solución mediante métodos matemáticos para producir soluciones analíticas. No obstante, para sistemas compuestos por más de dos partículas no pueden resolverse por los métodos analíticos. Aquí entra la química computacional la cual puede proveernos soluciones aproximadas, que en principio pueden refinarse hasta cualquier grado de precisión<sup>60,61</sup>. Las tareas numéricamente intensivas están relacionadas generalmente con la simulación del comportamiento del mundo real, el principal problema de dichas simulaciones es la naturaleza de múltiples escalas, que van desde sub-nanométrica hasta milimétricas de manera espacial, así como desde femto a milisegundos de manera temporal.

## 5.11.2 Describiendo el sistema

Para poder describir nuestro sistema es necesario comenzar con 4 características fundamentales<sup>59,60</sup>:

- La descripción del sistema: partículas a estudiar, así como el número de ellas
- Condiciones iniciales: ambiente de las partículas y velocidad que tienen.
- Interacción: definir matemáticamente la forma de las fuerzas entre las partículas.
- Ecuación dinámica: forma matemática de la evolución del sistema en el tiempo.

Con base en la elección de partículas definimos que es lo que podemos o no podemos estudiar del sistema, si elegimos núcleos atómicos y electrones, podemos describir átomos o moléculas, pero no la estructura interna del núcleo atómico. Si elegimos átomos, podemos describir estructuras moleculares, pero no los detalles de la distribución de electrones, al elegir aminoácidos describiremos la estructura general de una proteína, pero no el detalle de los movimientos atómicos. Por su parte la elección de las condiciones iniciales nos determinará efectivamente lo que estamos tratando de describir, el espacio fase es enorme y sólo podremos describir una pequeña parte de él. Una vez elegidos estos dos parámetros es importante definir la interacción entre las partículas, en el nivel fundamental, la única fuerza importante a nivel atómico es la interacción electromagnética<sup>60</sup>, no obstante, esto puede resultar en diferentes fuerza efectivas. Si usamos un método de campo de fuerza, por ejemplo, las interacciones se parametrizan como interacciones de estiramiento, flexión, torsión, Van der Waals (VdW). La ecuación dinámica describe la evolución temporal del sistema, se da como una ecuación diferencial que involucra derivadas tanto en el tiempo como en el espacio y la forma exacta depende de las masas y velocidades de las partículas<sup>60,62</sup>.

## 5.11.3 Ecuación dinámica

Para describir la evolución de nuestro sistema es necesario identificar las características de este, ya que de ello dependen las matemáticas a usar. La mecánica newtoniana se aplica a partículas “pesadas” y de “movimiento lento”. Los efectos relativistas cobran importancia cuando la velocidad es comparable a la velocidad de la luz, lo cual provoca un aumento en la masa  $m$  en relación con la masa en reposo  $m_0$ . Por su parte las partículas de luz muestran características tanto de onda como de partícula y por ello deben ser descritas por la mecánica cuántica<sup>60,61</sup>.

Los electrones al ser mucho más ligeros pueden describirse mediante la mecánica cuántica, mientras que los átomos y las moléculas, se comportan, en general, como

partículas clásicas. Una diferencia importante entre la mecánica cuántica y la clásica es que la mecánica clásica es determinista mientras que la mecánica cuántica es probabilística, o mejor dicho, su interpretación es probabilística<sup>60,62</sup>. La mecánica cuántica entonces, permite el cálculo de la probabilidad de que una partícula esté en un lugar determinado en un momento determinado. Para partículas con masas pequeñas, se debe emplear la mecánica cuántica. A velocidades bajas, la ecuación relevante es la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi = i \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (1)$$

Donde  $\Psi$  es la función de onda del electrón,  $t$  es el tiempo,  $i$  es el número imaginario  $\sqrt{-1}$  y  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano, en unidades atómicas, el cual está dado por la suma de los operadores de la energía cinética y potencial:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} \quad (2)$$

$$\hat{T} = \frac{p^2}{2m} = -\frac{1}{2m} \nabla^2 \quad (3)$$

$$\hat{H} = -\sum_i^{\text{partículas}} \frac{\nabla_i^2}{2m_i} + \sum_{i<j}^{\text{partículas}} \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (4)$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \quad (5)$$

Donde  $\nabla$  es el operador Laplaciano actuando sobre la partícula  $i$ . Los símbolos  $m$  y  $q$  son la masa y la carga de la partícula  $i$ , y  $r_{ij}$  es la distancia entre las partículas  $i, j$ . El primer término nos da la energía cinética de las partículas, mientras que el segundo término es la energía debido a las interacciones Coulómbicas entre las partículas<sup>59,62</sup>. En la actualidad el software disponible casi no usa el Hamiltoniano anterior, generalmente el problema se simplifica separando los movimientos nuclear y electrónico. Esto es llamado la aproximación de Born-Oppenheimer<sup>63</sup> y cuyo Hamiltoniano electrónico tiene la forma:

$$\hat{H} = -\sum_i^{\text{electrones}} \frac{\nabla_i^2}{2} - \sum_i^{\text{nucleo}} \sum_j^{\text{electrones}} \frac{Z_i}{r_{ij}} + \sum_{i<j}^{\text{electrones}} \sum \frac{1}{r_{ij}} \quad (6)$$

El primer término es la energía cinética de los electrones solamente, el segundo término es la atracción de los electrones al núcleo y el tercer término es la repulsión entre electrones<sup>62</sup>. Al resolver la ecuación de Schrödinger obtendremos la función de onda como una función del tiempo, y la probabilidad de observar una partícula en la posición  $r$  en el tiempo  $t$  estará dado por el cuadrado de la función de onda:

$$P(r, t) = \Psi^2(r, t) \quad (7)$$

Una vez que la función de onda ha sido determinada, cualquier propiedad de la molécula puede ser determinada. Esto se hace tomando el valor esperado del operador correspondiente a esa propiedad, se denota por el uso de *Brackets*  $\langle \rangle$ . Así entonces, podemos calcular la energía mediante el valor esperador del operador Hamiltoniano, dado por:

$$\langle E \rangle = \int \Psi^* \hat{H} \Psi \quad (8)$$

## 5.11.4 Funciones base

Un conjunto de funciones base es un conjunto de funciones que se utilizan para describir la forma de los orbitales de un átomo<sup>62</sup>. Junto con el método computacional es necesario poder representar los orbitales de un sistema químico (átomos y moléculas) y para ello se hace uso de los conjuntos de funciones base. Son utilizados en la mayoría de las implementaciones de los métodos basados en la función de onda, los métodos *ab initio* y los métodos de la teoría de funcionales de la densidad (DFT)<sup>59</sup>. Un orbital molecular se puede considerar como una función en el sistema de coordenadas infinito abarcado por el conjunto de bases completo, al usar un conjunto de bases finitas, solo se pueden representar los componentes del orbital molecular a lo largo de los ejes de coordenadas correspondientes a las funciones de base seleccionadas.

Cuanto menor sea el conjunto de bases, peor será la representación, el tipo de funciones también influirá en la precisión, cuanto mejor pueda reproducir una función de base única la función desconocida, menos funciones base serán necesarias para lograr un nivel dado de precisión. Por lo tanto, el tipo (nivel) de cálculo realizado y el conjunto de bases elegido son los dos factores más importantes para determinar la precisión de los resultados.

Los tipos de funciones base más utilizados, llamados también orbitales atómicos, son los orbitales de tipo Slater (STO) y los tipos Gaussiano (GTO). Un orbital tipo Slater<sup>60</sup> tiene la forma:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = N Y_{l,m}(\theta, \varphi) r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (9)$$

Donde N es una constante de normalización así como  $Y_{l,m}$  son funciones esférico armónicas. No obstante, los STO no tienen nodos radiales, dichos nodos en la parte radial se introducen haciendo combinaciones lineales de STO. Mientras que la dependencia exponencial asegura una convergencia con un número creciente de funciones<sup>59,60</sup>. Usualmente los STO se utilizan para sistemas atómicos y diatómicos donde se requiere alta precisión. Los orbitales tipo Gaussian<sup>59,60</sup> pueden ser escritos en términos de coordenadas polares o cartesianas como se indica enseguida:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = N Y_{l,m}(\theta, \varphi) r^{2n-2-l} e^{-\zeta r^2}$$

$$\chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x,y,z) = Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\zeta r^2} \quad (10)$$

Donde la suma de  $l_x$ ,  $l_y$  y  $l_z$  determina el tipo de orbital.  $\zeta$  es el exponente del orbital gaussiano. Una importante diferencia es que las funciones de tipo GTO decaen más rápidamente al alejarse del núcleo que una función tipo STO, por lo tanto, las propiedades asintóticas de la función de onda no se representan con propiedad. Además, los GTO no cumplen la condición de *cusp* (cúspide) en los núcleos, que los STO si lo hacen<sup>60</sup>.

Para este proyecto se trabajará con el funcional híbrido de correlación llamado M06-2X, este es un funcional de alta no localidad con el doble de intercambio no local (2X) y está parametrizado solo para no metales<sup>64</sup>. Recomendado para aplicaciones que involucren termoquímica de grupo principal, cinética, interacciones no covalentes y energías de excitación electrónica para estados de valencia y Rydberg.

## 5.12 Teoría de los funcionales de la densidad

La premisa detrás de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) es que la energía de una molécula puede ser determinada a partir de la densidad electrónica en lugar de la función de onda. Los primeros modelos de la DFT fueron propuestos inicialmente por Thomas<sup>65</sup> y Fermi<sup>66</sup> en 1927, no obstante paso de largo debido a la deficiencia de sus resultados cuantitativos. Ellos muestran que la energía de un átomo puede ser aproximada mediante la densidad electrónica de manera<sup>67</sup>:

$$E[\rho(r)] \approx 2.871 \int \rho^{\frac{5}{3}}(r)dr + \int \rho(r)v(r)dr + \iint \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' \quad (11)$$

Luego, en 1964 Hohenberg y Kohn<sup>68</sup> demuestran en sus teoremas la importancia fundamental de la densidad electrónica y que se engloban en dos teoremas:

- i. La densidad del estado fundamental de un sistema de electrones que interactúan en un potencial externo define de manera única este potencial, excepto por una constante aditiva
- ii. Existe un funcional universal para la energía en términos de la densidad, que es válido para cualquier potencial externo. Para un potencial externo dado, el mínimo global de este funcional es la energía del estado fundamental del sistema y la densidad correspondiente es la densidad del estado fundamental.

Levy<sup>69,70</sup> y Lieb<sup>71</sup> por su parte proporcionaron una formulación alternativa, más general, conocida como la búsqueda restringida. Plantean una redefinición del funcional universal lo que permite que se elimine la restricción a los estados fundamentales no degenerados y amplía el rango de densidades de prueba permitidas para incluir aquellas que son N-representables, es decir, que pueden derivarse de una función de onda antisimétrica de N-cuerpos, en lugar de solo aquellas que son v-representables.

### 5.12.1 Teorema de Kohn-Sham

Hohenberg y Kohn reescribieron su funcional de energía para incluir el término electrostático clásico o término Hartree<sup>72</sup>:

$$E_v[n] = \int V(r) n(r) dr + \frac{1}{2} \iint \frac{n(r)n(r')}{|r-r'|} dr dr' + G[n] \quad (12)$$

Donde el primer y el segundo término son independientes de  $V(r)$ . Llevándonos entonces al problema de encontrar una expresión para  $G[n]$  la cual debe resultar útil para calcular la energía del estado basal. Fue así como Kohn y Sham propusieron un nuevo paso para introducir un sistema auxiliar de electrones no interactuantes, donde los dos sistemas tienen la misma densidad. Este proceso divide el funcional desconocido en 2 componentes separables. Esto permite definir el componente de la energía cinética, que si bien, no es el real, se espera tenga mínimas diferencias, el funcional  $G[n]$  queda como<sup>72</sup>:

$$G[n] = T_s[n] + E_{xc}[n] \quad (13)$$

Donde  $T_s[n]$  es la energía cinética del sistema auxiliar y  $E_{xc}[n]$  se define como la energía de intercambio y correlación del sistema interactuante. Es en este término donde los componentes restantes de energía del problema de muchos cuerpos son absorbidos, siendo la diferencia entre el sistema interactuante y el no interactuante de las energías<sup>72</sup>. El sistema auxiliar está configurado para tener la misma densidad que el sistema original por medio de un potencial efectivo  $V_{\text{eff}}(\mathbf{r})$ .

## 5.12.2 Derivadas de los funcionales

Es importante recordar lo siguiente:

- Una función es una regla que te llevará desde un número a otro número.
- Un funcional es una regla que te llevará desde una función a un número.

Podríamos decir que un funcional es una función de funciones. De igual modo, podemos definir una  $G[f(x)] = \int [f(x)]^2 dx$  como un funcional de la función  $f(x)$ , de tal modo que el diferencial o la variación de la función  $G$  se define como<sup>67</sup>:

$$\delta G[f(x)] = \int \frac{\delta G[f(x)]}{\delta f(x)} \delta f(x) dx \quad (14)$$

En donde el cociente es la derivada funcional de G con respecto a la función f(x). Teniendo este fundamento, recordemos que el segundo teorema de Hohenberg-Kohn generaliza el principio variacional para el funcional de energía. Siendo  $\rho(r)$  la densidad exacta del estado basal, y  $\rho'(r)$  la densidad prueba, entonces<sup>67</sup>:

$$E[\rho(\mathbf{r})] < E[\rho(\mathbf{r}')] \quad (15)$$

El segundo teorema de Hohenberg-Kohn provee un camino para encontrar la verdadera densidad electrónica del estado basal y su energía exacta no relativista. Por su puesto, la densidad real del estado basal debe minimizar el funcional de energía y cumplir con la restricción de clausura<sup>67,73</sup>:

$$\int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N \quad (16)$$

Donde N es el número total de electrones del sistema. Sea entonces  $\mu$  el multiplicador de Lagrange  $\mu$  asociado a la restricción. La densidad exacta para un potencial fijo  $v(r)$ , minimizara el funcional Lagrangiano<sup>73</sup>:

$$\delta\{E[\rho(\mathbf{r})] - \mu \int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + N\} = 0 \quad (17)$$

El cálculo entonces de la derivada de la energía electrónica con un potencial constante externo será<sup>67,73</sup>:

$$\mu = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta F[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (18)$$

El multiplicador de Lagrange  $\mu$  es homogéneo y puede expresarse en volts o J/electrón, según se calcule la densidad electrónica. El multiplicador de Lagrange se denomina entonces como el potencial químico y tiene gran significado para la DFT conceptual. De modo que hemos podido obtener un descriptor de la química conceptual con base en la derivada del funcional de la DFT, denominada en este caso, DFT conceptual. Sorprendentemente, de todas las derivadas de la energía aparecerá un descriptor relevante para la reactividad.

Se ha demostrado que la primera derivada del funcional de energía con respecto a la densidad es el potencial químico, que podemos identificar con la derivada parcial de la energía respecto al número de electrones<sup>73</sup>:

$$\mu = \left( \frac{\delta E}{\delta \rho(\mathbf{r})} \right)_{v(\mathbf{r})} = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(\mathbf{r})} \quad (19)$$

Por lo tanto, se pueden utilizar N y  $v(r)$  como variables básicas de gran significado, la variación del número de electrones N proporciona una buena descripción de los procesos

redox, mientras que la variación del potencial explica el reordenamiento de los núcleos durante la reacción<sup>67</sup>. Así podemos ir generando descriptores de acuerdo a las derivadas de la energía como se indica en el siguiente esquema<sup>67</sup>:

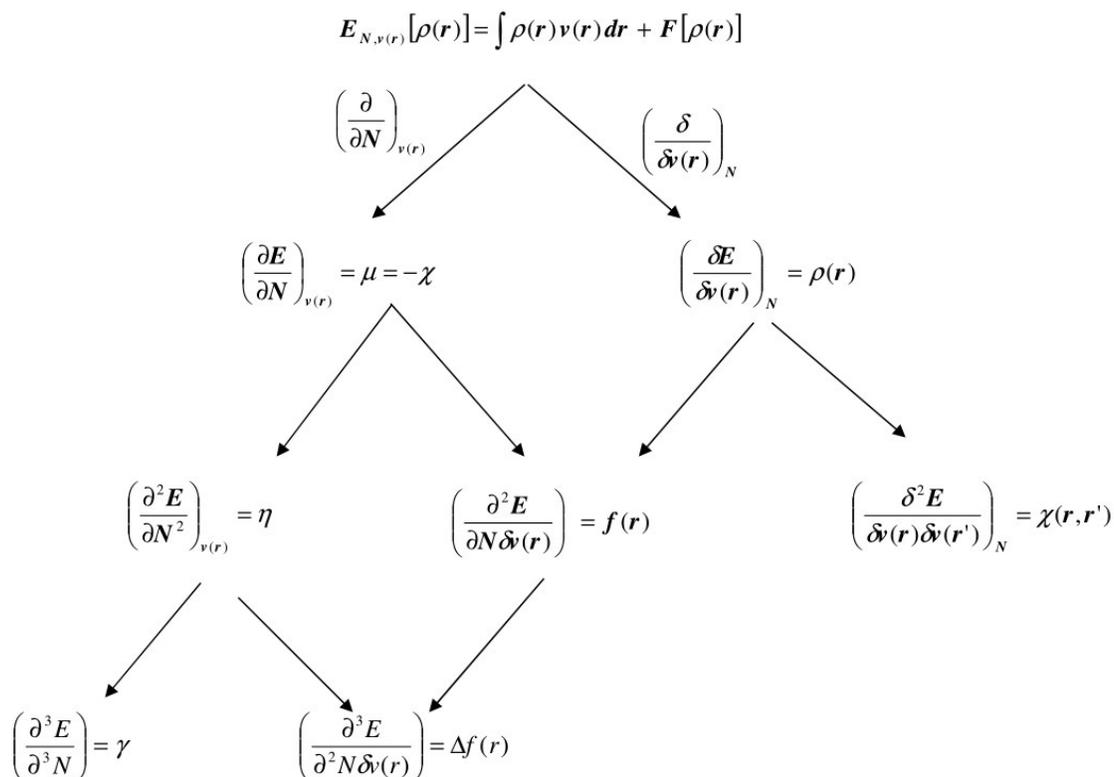


Figura 13. Derivadas de la energía hasta el tercer orden. Imagen extraída de Morell<sup>67</sup>.

Definamos entonces, las siguientes derivadas con respecto a la descripción conceptual de la química:

Tabla 2. Símbolo, definición matemática y nombres de las derivadas de energía. Imagen extraída de Morell<sup>67</sup>.

Derivada	Símbolo	Nombre
Primera derivada	$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N}\right)_{v(r)}$	Potencial químico
	$\rho(r) = \left(\frac{\delta E}{\delta v(r)}\right)_N$	Densidad electrónica
Segunda derivada	$\eta = \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2}\right)_{v(r)}$	Dureza química
	$f(r) = \left(\frac{\delta^2 E}{\partial N \delta v(r)}\right)$	Función Fukui
	$\chi(r, r') = \left(\frac{\delta^2 E}{\delta v(r') \delta v(r)}\right)$	Respuesta lineal
	$\gamma = \left(\frac{\partial^3 E}{\partial N^3}\right)_{v(r)}$	Híper dureza

<b>Tercera derivada</b>	$f^{(2)}(r) = \Delta f(r) = \left( \frac{\delta^2 E}{\partial N \delta v(r)} \right)$	Descriptor dual o función Fukui de segundo orden
-------------------------	---	--

Si se observa con detenimiento las derivadas de la energía, podemos dividir en dos categorías, la primera que contiene a  $\mu$ ,  $\eta$  y  $\gamma$  son independientes de las coordenadas espaciales y describen la reactividad global. Mientras que  $\rho(r)$ ,  $f(r)$  y  $\Delta f(r)$  son dependientes de la posición en el sistema y proveen información de selectividad local<sup>67</sup>. Mientras que la función de respuesta lineal es un término no local y que representa la variación de la densidad electrónica en un punto  $r$  cuando el potencial externo se modifica en el punto  $r'$ .

### 5.12.3 Descriptores globales de la reactividad

Con el fin de entender la reactividad del sistema se hará uso de diferentes descriptores de la reactividad, tanto algunos nombrados con anterioridad como otros de los que hablaremos.

El potencial químico  $\mu$ , que se puede expresar como el negativo de la electronegatividad  $\chi$ , mide la tendencia de escape de los electrones/ la atracción del sistema por los electrones y que a partir de la aproximación de diferencias finitas podemos calcular como<sup>74,75</sup>:

$$\mu = \frac{I+A}{2} = -\chi \quad (20)$$

$$\mu = -\chi = \frac{1}{2}(E_{HOMO} - E_{LUMO}) \quad (21)$$

La segunda ecuación utiliza la aproximación de Koopmans<sup>76</sup>, en términos de la energía del orbital de más alta energía ocupado ( $E_{HOMO}$ ) y el orbital de menor energía desocupado ( $E_{LUMO}$ ). Por otro lado  $I$  representa la energía de ionización y  $A$  la afinidad electrónica, que representan una medida de la energía requerida para remover un electrón de un sistema neutro en el estado basal y la energía cuando un sistema neutro en el estado basal captura un electrón respectivamente<sup>74</sup>. Estos descriptores son calculados mediante por la aproximación de Koopmans o de manera exacta mediante:

$$I = E(N - 1) - E(N) \quad (22)$$

$$A = E(N) - E(N + 1) \quad (23)$$

Que representan los sistemas catiónicos ( $N-1$ ) y aniónicos ( $N+1$ ) de nuestras moléculas. Por su parte la dureza química  $\eta$ , medida de la resistencia de las transferencia de carga intramolecular<sup>74,75</sup>, nos hablará sobre la estabilidad del sistema en cuestión y junto con la blandura química global  $S$ , medida de la capacidad de un sistema a reaccionar, tendremos una descripción importante de la reactividad química, dichos términos serán calculados mediante:

$$\eta = I - A \quad (24)$$

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (25)$$

Parr y sus colaboradores<sup>77</sup> definen el índice de electrofilicidad  $\omega$  como el cambio de energía de un electrófilo cuando está en contacto con un perfecto nucleófilo, de manera que:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{\chi^2}{2\eta} \quad (26)$$

$$\omega = \frac{(I + A)^2}{8(I + A)} \quad (27)$$

De manera conjunta tenemos el índice de potencia electrodonador  $\omega^-$  y el índice de potencia electroaceptor  $\omega^+$  como una medida de la respuesta del sistema a substraer y/o adicionar carga y que podemos calcular mediante las siguientes fórmulas<sup>74</sup>:

$$\omega^+ = \frac{(I + A)^2}{16(I - A)} \quad (28)$$

$$\omega^- = \frac{(3I + A)^2}{16(I - A)} \quad (29)$$

## 5.12.4 Descriptores locales de la reactividad

Los descriptores locales de la reactividad nos permiten entender el comportamiento de un sitio atómico específico o una región espacial en la molécula. Siendo la principal la densidad electrónica por sí misma y que a partir de ella podemos calcular las funciones Fukui (FF) que se definen de la siguiente manera<sup>76,78</sup>:

$$f(r) = \left( \frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right)_{v(r)} = \left( \frac{\delta \mu}{\delta v(r)} \right)_N \quad (30)$$

Como  $\rho(r)$ ,  $f(r)$  está normalizada y obedece la condición de cúspide. Dado que la pendiente de la curva  $\rho(r)$  frente a  $N$  es discontinua para valores enteros de  $N$ , hay diferentes tipos de FF, una para ataque nucleofílico, electrofílico y para ataques radicalarios. Por medio

de las diferencias finitas y la aproximación *core* congelado, las FF pueden ser expresadas de la manera siguiente<sup>76,78</sup>:

$$f^+(r) = \left(\frac{\partial \rho}{\partial N}\right)_{v(r)}^+ \cong \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \cong \rho_{LUMO}(r); \textit{ataque nucleofílico} \quad (31)$$

$$f^-(r) = \left(\frac{\partial \rho}{\partial N}\right)_{v(r)}^- \cong \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \cong \rho_{HOMO}(r); \textit{ataque electrofílico} \quad (32)$$

$$f^0(r) \frac{1}{2}(f^+(r) + f^-(r)) \cong \frac{1}{2}[\rho_{LUMO}(r) + \rho_{HOMO}(r)]; \textit{ataque radicalario} \quad (33)$$

La aparición de la densidad de los orbitales frontera en el índice de reactividad hace una conexión directa con la teoría de orbitales frontera de Fukui. Un sitio entonces con una gran valor de FF es energéticamente favorable para reactivos con transferencia electrónica<sup>73,79</sup> y que corresponde a un gran cambio en  $\mu$  y por ende una gran reactividad. Al igual que con las ecuaciones anteriores, podemos expresar las FF en términos condensados, es decir, con carga atómicas en vez de densidades orbitálicas, de manera que<sup>76</sup>:

$$f_k^+ = q_k(N + 1) - q_k(N): \textit{ataque nucleofílico} \quad (34)$$

$$f_k^- = q_k(N) - q_k(N - 1): \textit{ataque electrofílico} \quad (35)$$

$$f_k^0 = \frac{1}{2}[q_k(N + 1) - q_k(N - 1)]; \textit{ataque radicalario} \quad (36)$$

Donde  $q_k$  es la población electrónica o carga atómica del átomo  $k$  en una molécula. La naturaleza de la partición de la densidad en un esquema de análisis poblacional seleccionado dicta la magnitud de  $f_k$ . Si bien las FF pueden ser buenos descriptores de la reactividad intramolecular, resultan deficientes a la hora de describir la reactividad intermolecular. Para solucionar este problema, existen dos descriptores de reactividad local a usar, la blandura local<sup>76,79</sup>  $s^\alpha(r)$  y la filicidad<sup>76,80</sup>  $\omega(r)$ . Por medio de una identidad asociada a la construcción de normalización de las FF,  $s^\alpha(r)$  y su variante condensada a átomos  $s_k^\alpha$  son definidos mediante<sup>76</sup>:

$$s(r) = S \cdot f(r) \quad (37)$$

$$s_k = S \cdot f_k \quad (38)$$

La filicidad es definida mediante<sup>80</sup>:

$$\omega(r) = \omega \cdot f(r) \quad (39)$$

$$\omega_k = \omega \cdot f_k \quad (40)$$

Así entonces podemos usar la blandura local para analizar las interacciones blando-blando mientras que la filicidad puede ser usada para entender las interacciones electrófilo-nucleófilo.

## 5.13 Herramientas computacionales

Los métodos computacionales se basan en el cálculo de las superficies de energía potencial (PES) de las moléculas, de ella se puede derivar información estructural y química de la molécula<sup>63</sup>. Los tipos básicos de cálculos que se realizan con los diferentes métodos son:

- Cálculo de la energía en un punto: La energía para una disposición dada de los átomos en un modelo o para un conjunto de coordenadas. O sea, “un punto” en la PES.
- Optimización geométrica: Consiste en la modificación sistemática de las coordenadas atómicas de un modelo dando como resultado una geometría donde las fuerzas netas en la estructura son iguales a cero. O sea, una búsqueda sistemática en la PES hasta llegar a un mínimo.
- Cálculo de propiedades: Es la predicción de determinadas propiedades físicas y químicas, tales como la carga, momento dipolar o el calor de formación.

Los métodos computacionales pueden también realizar más funciones específicas tales como búsquedas conformacionales y simulaciones dinámicas moleculares.

## 5.14 Desarrollo *in silico* de fármacos

La química computacional es una rama de la química que utiliza computadoras para ayudar a resolver problemas químicos, estudia la estructura electrónica de sólidos y líquidos y diseña nuevos materiales y medicamentos<sup>81</sup>. Utiliza resultados de la química teórica, incorporados en programas para así calcular las propiedades de las moléculas. El término *in silico* abarca hoy los métodos dedicados a este fin, *in silico* se refiere al hecho de que se utilizan computadoras, las cuales tienen silicio en su hardware. Un ejemplo de método *in silico* conocido son los métodos QSAR, basados en la hipótesis de que la estructura molecular es la responsable de todas las actividades.

Desarrollar y evaluar estrategias predictivas para dilucidar el modo de impacto biológico de los productos químicos ambientales es un objetivo principal, la actividad biológica de cualquier compuesto químico se basa en su reconocimiento apropiado por un objetivo biológico específico, como lo puede ser una enzima o un receptor<sup>81</sup>. Podemos definir el “mecanismo de acción” terapéutica como la descripción molecular detallada de eventos clave en la inducción de una respuesta biológica, el mecanismo está relacionado entonces con su “modo de acción” que podemos definir como la descripción de eventos y procesos clave, comenzando con la interacción de un agente con la célula a través de cambios funcionales y anatómicos, dando como resultado un punto final de salud<sup>81,82</sup>.

## 5.15 Modelado por homología

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína es imprescindible si se desea comprender a fondo su mecanismo de funcionamiento o llevar a cabo el diseño racional de fármacos que se unan a ella. No obstante, la determinación experimental de

estructuras de proteínas es una tarea que a menudo resulta difícil de ejecutar, debido a la imposibilidad de obtener cantidades suficientes de proteína purificada, así como dificultades en el proceso de cristalización<sup>83</sup>. Los métodos de modelado molecular se han convertido en un complemento indispensable de las técnicas experimentales. En la actualidad son usados rutinariamente para investigar la estructura, dinámica y termodinámica de sistemas biológicos, inorgánicos y poliméricos. Entre las actividades biológicas investigadas encontramos el plegamiento proteico, la catálisis de enzimas, la estabilidad de proteínas y el reconocimiento molecular.

Dependiendo de la disponibilidad de plantillas homólogas en las bases de datos como *Protein Data Bank* (PDB), los métodos computacionales para la predicción de la estructura de proteínas se pueden clasificar generalmente en dos categorías: modelado basado en plantillas (TBM) o modelado sin plantillas (FM). La primera de ellas construye los modelos estructurales con base a las estructuras de plantillas identificadas al pasar la secuencia a través de PDB, mientras que FM construye modelos desde cero sin utilizar estructuras de plantilla globales.

Zhang y colaboradores<sup>84</sup>, han desarrollado una nueva metodología *Threading/ASSEMBLY/Refinement* (TASSER) para la predicción automatizada de estructuras terciarias, que generan modelos de longitud completa reordenando fragmentos continuos identificados por el algoritmo de subprocesamiento *PROSPECTOR\_3*<sup>85</sup>. El método probó desarrollar puntos de referencia a gran escala, con plantillas generadas tanto por subprocesos como por alineaciones estructurales. A menudo los modelos finales están mucho más cerca de los nativos que las plantillas. El procedimiento de ensamblaje/refinamiento consiste en la identificación de la plantilla de ajuste, el ensamblaje de fragmentos y la combinación del modelo final<sup>86</sup>.

## 5.16 Acoplamiento molecular o docking

Un ejemplo importante de un problema de optimización es determinar la mejor alineación de dos moléculas entre sí, típicamente tratando de encajar una molécula pequeña (ligando) en una estructura grande, como una proteína o un ácido nucleico, un proceso conocido como acoplamiento molecular (*docking*). A veces se tiene una estructura de rayos X de una enzima, obtenida del PDB, con un ligando unido para identificar el sitio activo<sup>60</sup>. Otras veces no se tiene esta información experimental y el sitio activo se busca mediante el procedimiento del “*docking* ciego”<sup>62</sup>.

Las herramientas de modelado molecular *in silico* en tres dimensiones (3D) basadas en la simulación de acoplamiento receptor/enzima-ligando en estructuras cristalinas de proteínas y/o modelos de homología de receptores se han utilizado de forma fiable en la investigación y el desarrollo de fármacos durante décadas. Las metodologías de acoplamiento molecular son útiles para revelar facetas de activación e inactivación, mejorando así la comprensión mecanicista y prediciendo la actividad de unión del ligando

molecular<sup>81</sup>. Las más comunes aproximaciones para estimar la calidad de unión durante el diseño de procesos durante el docking molecular se basan en tres estrategias<sup>82</sup>:

1. Campos de fuerza motivados físicamente
2. Funciones de puntuación empírica
3. Funciones de puntuación de bases conocidas

Los campos de fuerza tratan a las moléculas como conjuntos de esferas conectados por resortes, cada resorte tiene valores óptimos de longitud, ángulos de torsión y ángulos con respecto a otros resortes. La desviación de estos valores óptimos da como resultado la deformación y, en consecuencia, las energías de deformación bajas corresponden a conformación de ligandos favorables<sup>81,82</sup>. La energía de interacción ligando-receptor se estima en términos de interacciones no unidas, más comúnmente por los potenciales de Coulomb y VdW, a veces aumentado por un término explícito para las contribuciones de los puentes de hidrógeno.

### 5.16.1 Metodología *docking*

Las funciones de puntuación de energía son funciones matemáticas que se utilizan para estimar la energía de unión de un ligando al sitio activo de la proteína diana y para localizarlo en caso de no conocerlo. No obstante, resulta un punto aun no del todo desarrollado en el acoplamiento, debido a que en muchos casos es incapaz de reproducir con precisión los datos vinculantes experimentalmente.

Los términos de energía electrostática y estérica generalmente se incluyen junto con la evaluación explícita de la interacción de enlaces de hidrógeno<sup>60,81</sup>. Mientras que simplifican la termodinámica del evento de unión. La energía de enlace se deriva de un estiramiento de enlace, ángulo de enlace, ángulo de torsión y términos energéticos de ángulo de torsión incorrectos como previamente hemos mencionado.

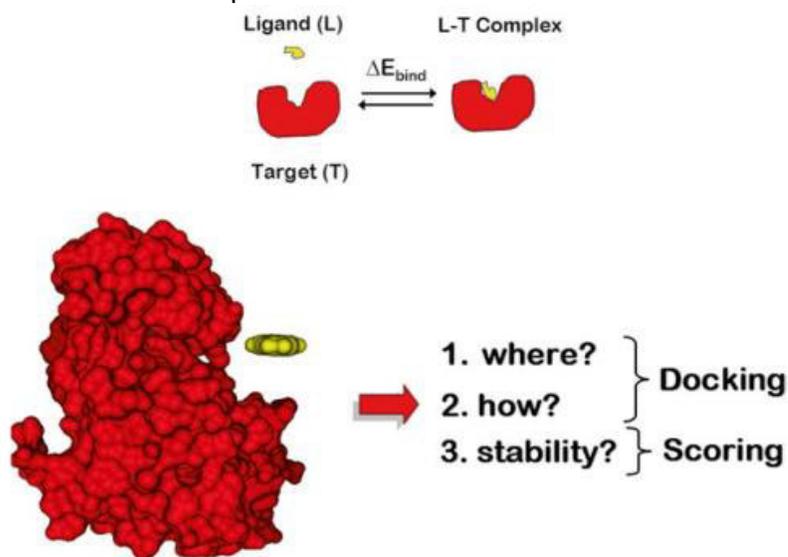


Figura 14. Puntos clave del Docking. Imagen extraída de Jensen<sup>60</sup>.

El acoplamiento de un ligando en un sitio de unión necesita calcular varios grados de libertad. Estos son los seis grados de libertad de traslación y rotación de un cuerpo con respecto a otro y luego los grados de libertad conformacional del ligando y de la proteína. Una búsqueda sistemática de todos los enlaces rotativos de una molécula similar a un fármaco no es eficiente desde un punto de vista computacional porque el número de posibles combinaciones de los rotámeros aumenta exponencialmente con el número de enlaces rotativos<sup>60</sup>. Los algoritmos de búsqueda abordan este problema y tienen como objetivo explorar el espacio químico. Por su parte la flexibilidad de las proteínas se puede incluir en el protocolo mediante la generación “sobre la marcha” de las conformaciones de la cadena lateral mientras se generan los puntos del sitio activo de la proteína<sup>81,82</sup>. Estos algoritmos se denominan métodos de acoplamiento flexible, donde se evalúan las conformaciones que están cerca de la estructura objetivo determinada experimentalmente.

## 5.16.2 Funciones de puntuación

Las funciones de puntuación de energía son funciones matemáticas que se utilizan para estimar la energía de unión de un ligando al sitio activo de la proteína diana y para localizarlo en caso de no conocerlo. No obstante, resulta un punto aun no del todo desarrollado en el acoplamiento, debido a que en muchos casos es incapaz de reproducir con precisión los datos vinculantes experimentalmente.

Los términos de energía electrostática y estérica generalmente se incluyen junto con la evaluación explícita de la interacción de enlaces de hidrógeno<sup>60,81</sup>. Mientras que simplifican la termodinámica del evento de unión. La energía de enlace se deriva de un estiramiento de enlace, ángulo de enlace, ángulo de torsión y términos energéticos de ángulo de torsión incorrectos como previamente hemos mencionado.

1. Funciones de puntuación basadas en campo de fuerza de mecánica molecular:

$$E_{enlace} = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + 332 \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} \right)$$

2. Función de puntuación empírica:

$$E_{enlace} = E_0 + E_{hb} \sum_{hb} f(\Delta R, \Delta \alpha) + E_{ion} \sum_{ion} f(\Delta R, \Delta \alpha) + E_{lipo} \sum_{lipo} |A_{lipo}| + E_{rot} NROT$$

3. Función de puntuación de bases conocidas:

$$E_{enlace} = \gamma \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} E_{ij}(\mathbf{r}) + (1 - \gamma) \left[ \sum_{i=1}^{lig} E_i(SASA, SASA_0) + \sum_{j=1}^{lig} E_j(SASA, SASA_0) \right]$$

Figura 15. Clasificación convencional de las más populares funciones de puntuación.<sup>60</sup>

Las funciones de puntuación pueden ser agrupadas en tres familias (figura 15): campos de fuerza de mecánica molecular, empíricas y funciones de puntuación conocidas.

En la mecánica molecular, se incluye las contribuciones intramolecular e intermolecular. Las moléculas son representadas usando campos de fuerza específicos en los átomos y tipos de enlace centrados con cargas parciales. La energía de enlace deriva de la compresión de enlaces, el ángulo de enlace y la torsión del ángulo. Por su parte la energía electrostática es estimada usando la ecuación de Coulomb, mientras que para las contribuciones de van der Waals se utiliza la energía de Lennard-Jones.

Las funciones de puntuación empíricas aproximan la energía de enlace como la suma de términos sin correlación. Los coeficientes son obtenidos por un análisis de regresión de un conjunto de ligandos conocidos experimentalmente junto con su energía de enlace para el objetivo. Las funciones de puntuación conocidas son compuestas por múltiples características de moléculas relacionadas a los modos de unión ligando-receptor. Las características son a menudo distancias átomo-átomo entre proteína y ligando en el complejo, así como también interacciones moleculares por puente de hidrógeno.

# **6** **Metodología computacional**

## 6.1 Hardware utilizado

Los procesos de acoplamiento molecular que fueron realizados usando el software de AUTODOCK y AUTODOCK vina<sup>87</sup> así como el análisis de interacciones por medio de Discovery Studio Visualizer<sup>88</sup> se realizaron en un equipo personal de cómputo y un clúster Linux, el primero con un procesador Intel Core i5-9400F de 2.90 GHz, 16 GB de memoria RAM, 1 TB de espacio de almacenamiento y una tarjeta de video GTX 1660 Super de 6 GB. Por otro lado, la optimización de las geometrías y el análisis poblacional fue realizada de manera remota en el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular de la Universidad de Guanajuato, esto por medio del CLUSTER LINUX llamado PIPILA, el cual cuenta con 1152 CPUs de procesadores AMD series 6000, 4.6 TB de memoria RAM, 16 TB de almacenamiento.

## 6.2 Detalles computacionales

### 6.2.1 Modelado por homología

El diseño de las proteínas homólogas se realiza por medio del servidor I-TASSER<sup>84</sup> que utiliza un enfoque jerárquico para la predicción de estructuras de proteínas y la anotación de funciones basadas en la estructura. Identifica las plantillas de estructuras de la base de datos de PDB<sup>89</sup> mediante el enfoque de múltiples subprocesos, con modelos atómicos de longitud completa construidos mediante simulaciones iterativas de ensamblaje de fragmentos basados en las plantillas. Después se vuelven a armar los modelos 3D a través de la base de datos de funciones de proteínas de BioLiP<sup>\*1</sup>. Para la proteína IL-18 no se tiene un modelo 3D de su estructura proveniente de ratas por lo cual es necesario realizar un modelo homólogo para ser utilizado en los estudios de acoplamiento molecular. La secuencia fue obtenida de la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI)<sup>90</sup> y posteriormente los modelos fueron evaluados por medio del servidor ProSA-Web<sup>91</sup> que genera un puntaje de calidad general para las estructuras dadas, si el modelo está fuera del rango característico de las proteínas nativas, este probablemente contenga errores, de igual manera provee un modelo de calidad local para determinar residuos problemáticos.

---

\*1 Información disponible en la página web de I-TASSER. <https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>

## 6.2.2 Optimización y cálculos CDFT

El diseño de los ligandos para el cálculo de los descriptores de la DFT conceptual (CDFT) fueron realizados mediante el paquete de software Gaussian View 5 y Gaussian 09<sup>92</sup> donde se realizó una optimización completa de la geometría usando el funcional M06-2X<sup>64</sup> y usando el conjunto de funciones base 6-311+G(d,p), bajo este procedimiento se generó las moléculas con geometría optimizada de melatonina y sus metabolitos activos (figura 16). Estas se usaron para calcular los descriptores de la reactividad de la CDFT y que posteriormente también fueron usados para el acoplamiento molecular. Para calcular las funciones Fukui condensadas se realizó un análisis poblacional de Hirshfeld tanto para la melatonina y sus metabolitos activos, el nivel de teoría utilizado fue también el funcional M06-2X/6-311+G(d,p). Tanto los descriptores como las funciones Fukui fueron calculadas usando las fórmulas mencionadas en el apartado de Teoría de los funcionales de la densidad. Se calcularon los descriptores globales de dureza y blandura, así como el potencial de ionización, la afinidad electrónica y la electronegatividad, finalmente se obtuvieron los valores para la electrofilicidad, esto tanto para la melatonina como sus metabolitos activos. Además de las FF como descriptores locales, se calculará la blandura local.

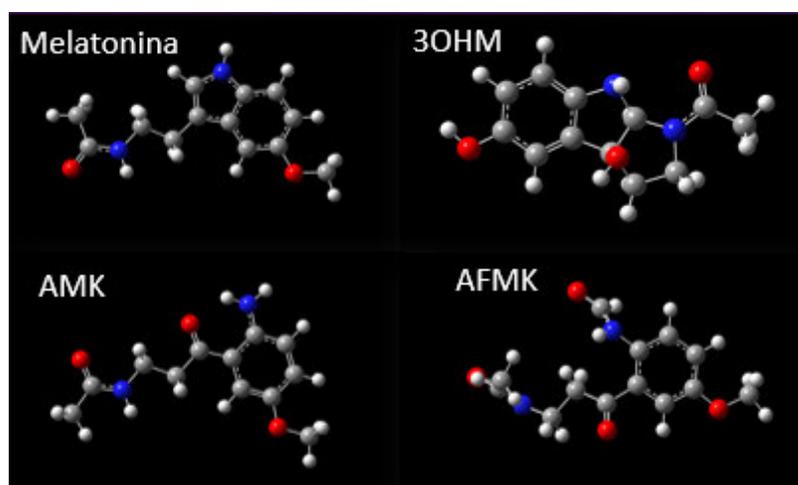


Figura 16. Moléculas de melatonina y sus metabolitos activos diseñadas en GaussView. Se presenta en gris los átomos de carbono, en blanco los átomos de hidrógeno, en azul el nitrógeno y finalmente en rojo el oxígeno. Se utilizó una base M06-2X con un nivel de teoría 6-311+G(d,p).

## 6.2.3 Características del acoplamiento molecular (*docking*)

Para estudiar las posibles interacciones entre la melatonina, así como sus metabolitos, con las citocinas participantes del proceso inflamatorio durante el daño renal, se realizará un estudio de *docking* haciendo uso del software AutoDock 4.2 y AutoDock Vina<sup>87</sup>. Se sometieron al proceso los ligandos mencionados al inicio de esta sección y como macromolécula se tomará a las siguientes proteínas: IL-18, IL-13 y MCP-1. Primero se realizará un *docking* ciego con el fin de determinar el sitio de unión entre ligando y macromolécula, los resultados se compararán con aquellos obtenidos del servidor ProteinPlus<sup>93</sup> para así elegir el mejor sitio de interacción. Posteriormente se efectuará un *docking* dirigido y flexible para mejorar las puntuaciones y afinidades del complejo. El *docking* se llevará a cabo por medio de ambos softwares, utilizando un parámetro de búsqueda de tipo algoritmo genético y un número de evaluaciones exhaustivas, con valor de  $2.5 \times 10^6$ .

Para entender el efecto de los ligandos de melatonina en la interleucina IL-18, se hará un *docking* proteína-proteína a través del servidor ClusPro<sup>94</sup>, utilizando tanto la citocina como su receptor, conocido como IL-18R $\alpha$ . El servidor generará las estructuras, denominadas por el programa como clúster, con mayor estabilidad de interacciones tanto electrostática, como hidrofóbica y de VdW.

# Análisis y resultados

## 7.1 Modelo homólogo: IL-18

### 7.1.1 Validación

Debido a la falta de la estructura 3D de la citocina IL-18 (de rata) en una base de datos como lo es PDB, es necesario diseñar y trabajar con un modelo homólogo para determinar una estructura tridimensional modelo de dicha proteína. Herramientas como I-TASSER nos permiten lograr tal propósito, no obstante, es necesario validar el método para tener certeza de que el resultado será el adecuado, para ello está el servidor ProSa-Web que evaluará la calidad de nuestro modelo de proteína homóloga e indicará si contiene aminoácidos problemáticos (con errores estadísticos) en su estructura. Primero se realizará el protocolo con una proteína prueba cuya estructura terciaria se encuentre en la base de datos de PDB, se toma entonces la citocina IL-18 (humano) y se somete de manera paralela su secuencia en I-TASSER para que se genere la plantilla correspondiente. Esta prueba será comparativa y permitirá conocer de primera mano la similitud entre la proteína obtenida de manera experimental y aquella generada computacionalmente.

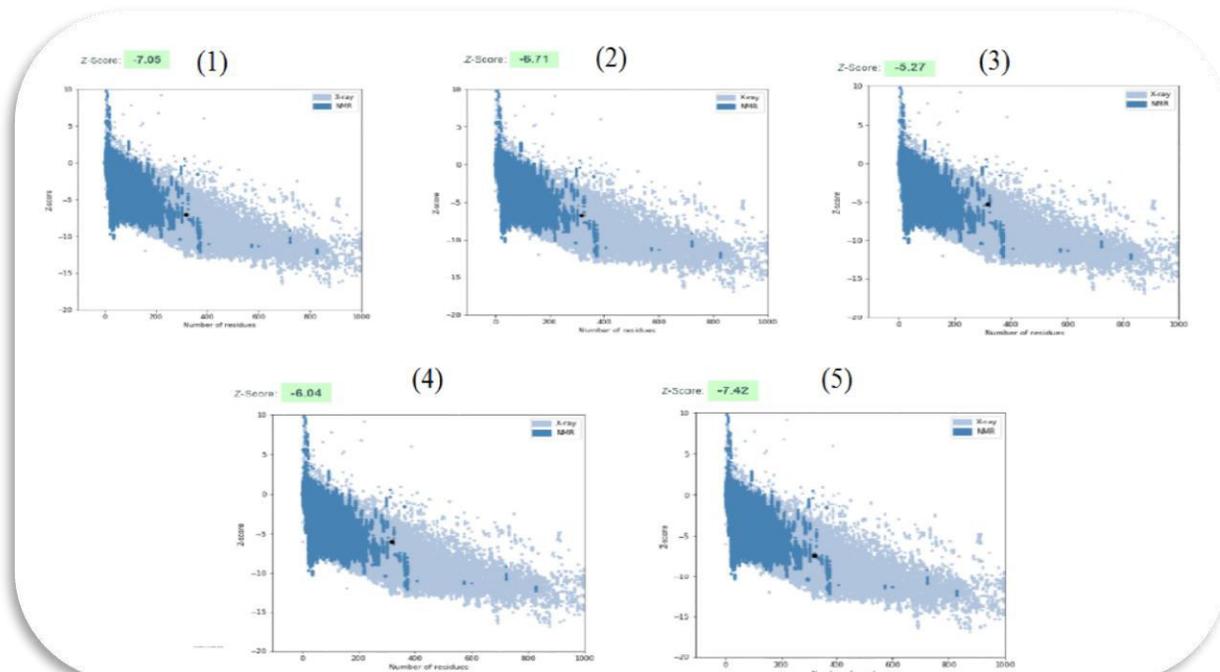


Figura 17. Resultados de calidad general para el modelo homólogo de la citocina IL-18 (humano) obtenidos mediante ProSA-Web.

I-TASSER genera los 5 mejores modelos construidos, es necesario entonces elegir uno de ellos para trabajar, para esto ProSA-Web evalúa la calidad general y calidad local de dichos

modelos. La figura 17 presenta los modelos de calidad general para la citocina IL-18 (humano) cada modelo se representa por un punto de color negro. De trasfondo se observan puntos que representan las proteínas de tamaño similar a nuestro modelo, por un lado, se tienen aquellas proteínas determinadas experimentalmente por resonancia magnético nuclear (NMR) en azul oscuro, mientras que aquellas determinadas por Rayos-X se ilustran en color gris. Lo ideal sería que nuestra proteína homóloga se sitúe dentro de este conjunto de puntos, en una parte central, se observa que efectivamente todos los modelos aparecen en una posición central, como referencia extra se tiene al modelo 3 cuya ubicación se puede ver ligeramente desplazada hacia arriba. Para así poder discriminar el mejor resultado, se tiene un dato numérico, el Z-score cuyo valor negativo es proporcional a la calidad del modelo, el cual mide la desviación de la energía total de la estructura con respecto a una distribución de energía derivada de conformaciones aleatorias, ergo, el modelo número 5 posee el mejor valor de Z-Score, un valor de  $-7.42$ , encontrándose dentro del rango de conformaciones nativas y su posición es central respecto a las proteínas nativas de tamaño similar, de manera complementaria se observa que el modelo 3 posee un Z-Score de  $-5.27$ , el valor más alto entre las plantillas homologas.

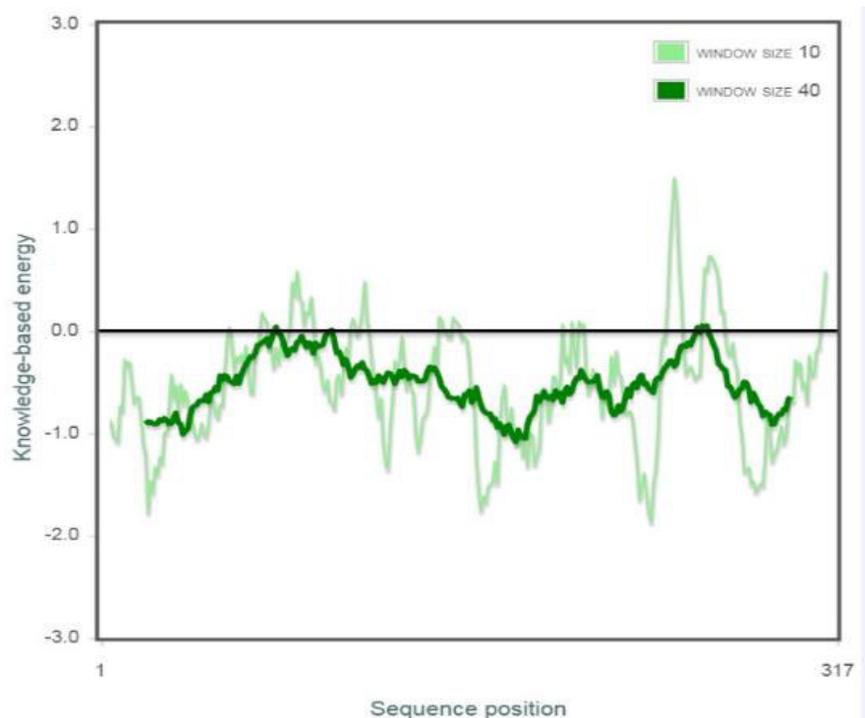


Figura 18. Modelo de calidad local para la plantilla número 5.

Por otro lado, en la figura 18, tenemos el modelo de calidad local para la plantilla número 5, esta gráfica muestra las energías en función de la posición de la secuencia de aminoácidos. En general, valores positivos corresponden a partes problemáticas o erróneas de la estructura. Debido a las fluctuaciones energéticas de cada residuo es necesario suavizar la curva para poder comparar, por ende, se calcula la energía promedio sobre cada fragmento de 40 residuos (verde oscuro) y sobre un fragmento de 10 residuos (verde claro). Para nuestro modelo 5, se observa que la ventana

de 40 residuos muestra resultados negativos, valores estables para cada uno, mientras que para una ventana de 10 residuos existe una pequeña parte que muestra residuos problemáticos, en general el modelo es aceptable y posee suficiente estabilidad para ser una proteína de estructura nativa.

Finalmente, el mejor modelo es el número 5, cuya estructura 3D generada por I-TASSER se presenta en la figura 19-B, donde se compara con la estructura obtenida de manera experimental y que se encuentra en la base de datos de PDB, figura 19-A. Se puede observar como el modelo posee

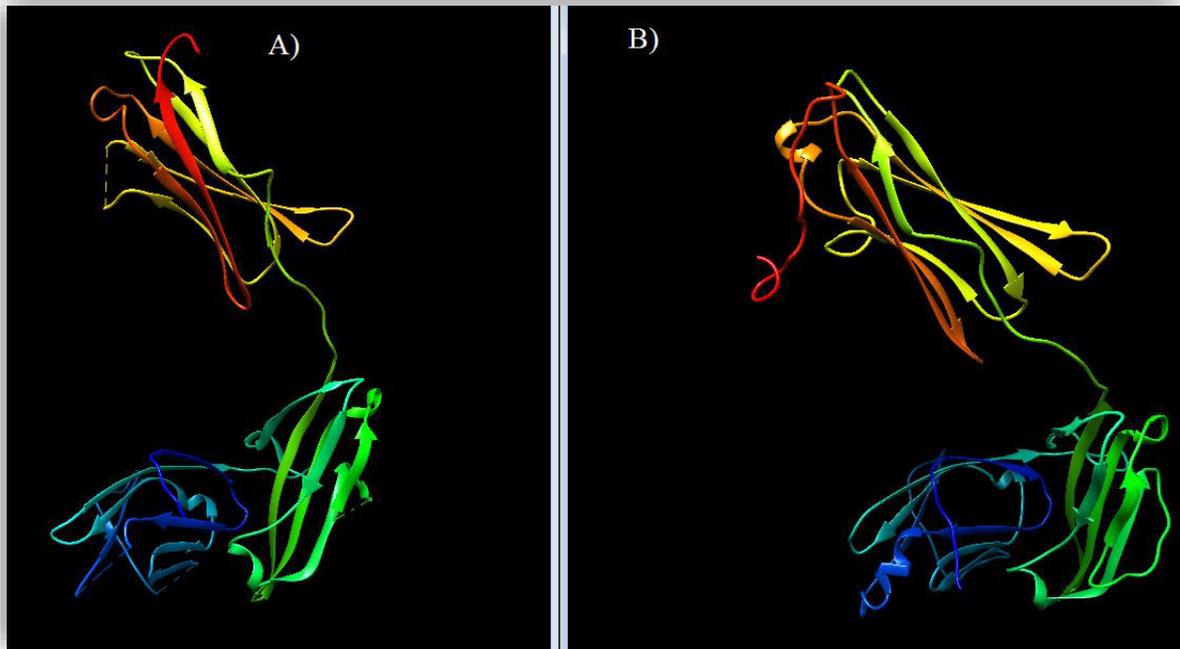


Figura 19. Comparación de modelos: A) descargado directamente de PDB B) Mejor modelo calculado por I-TASSER

una gran similitud, teniendo una estructura en general idéntica, con una distribución semejante de motivos y encontrándose solo algunos detalles diferentes. Por lo tanto, se puede concluir de esta calibración inicial, que la generación de modelos homólogos por medio del servidor I-TASSER será adecuado para el desarrollo de nuestro estudio.

## 7.1.2 Selección del modelo

Con base en la metodología presentada se procedió a generar el modelo homólogo de la citocina IL-18 (figura 20), para ello se obtuvo primero la secuencia de NCBI y posteriormente se introdujo en I-TASSER, el servidor nos generó los 5 mejores modelos que posteriormente fueron sometidos a una evaluación, cada uno, a través de ProSA-Web (figura 21).

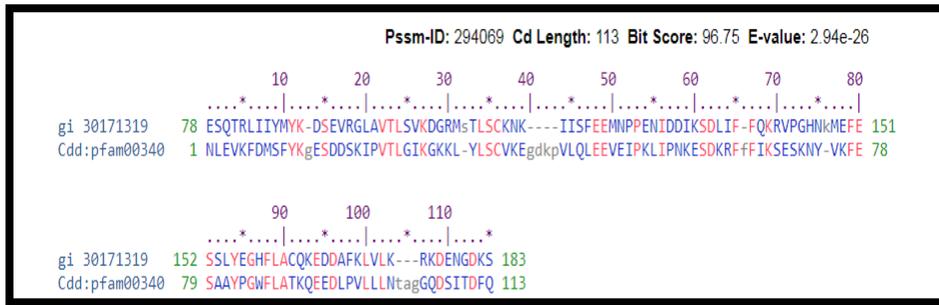


Figura 20. Secuencia de aminoácidos de la citocina IL-18 de *rattus norvegicus*

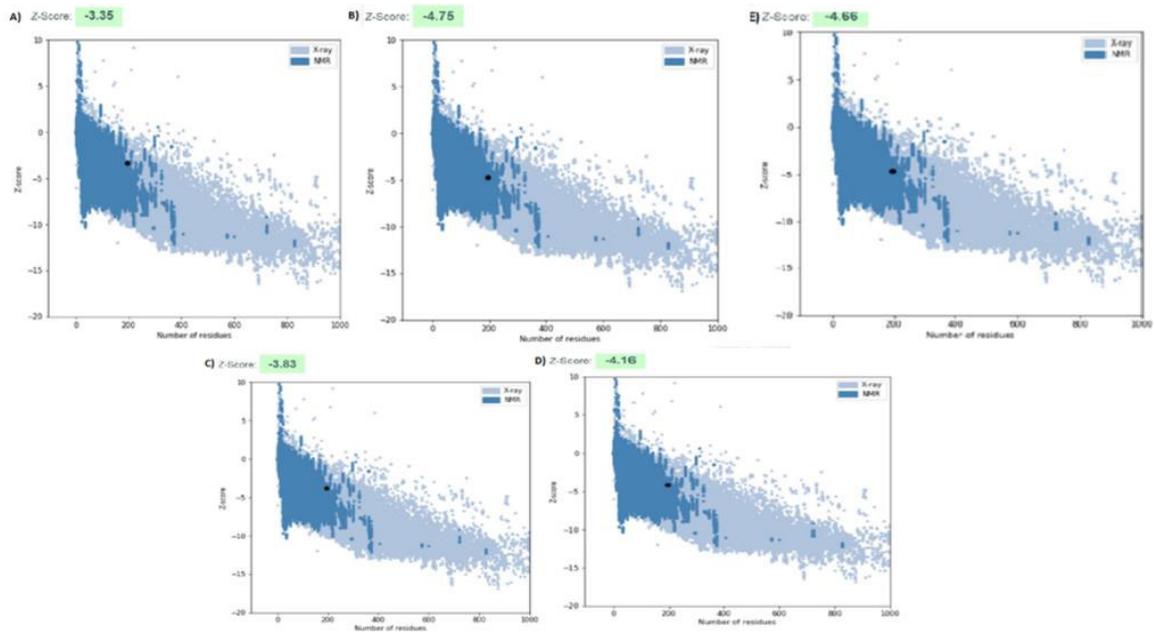


Figura 21. Modelos de calidad general de la citocina IL-18 (rata), obtenidos mediante ProSA-Web.

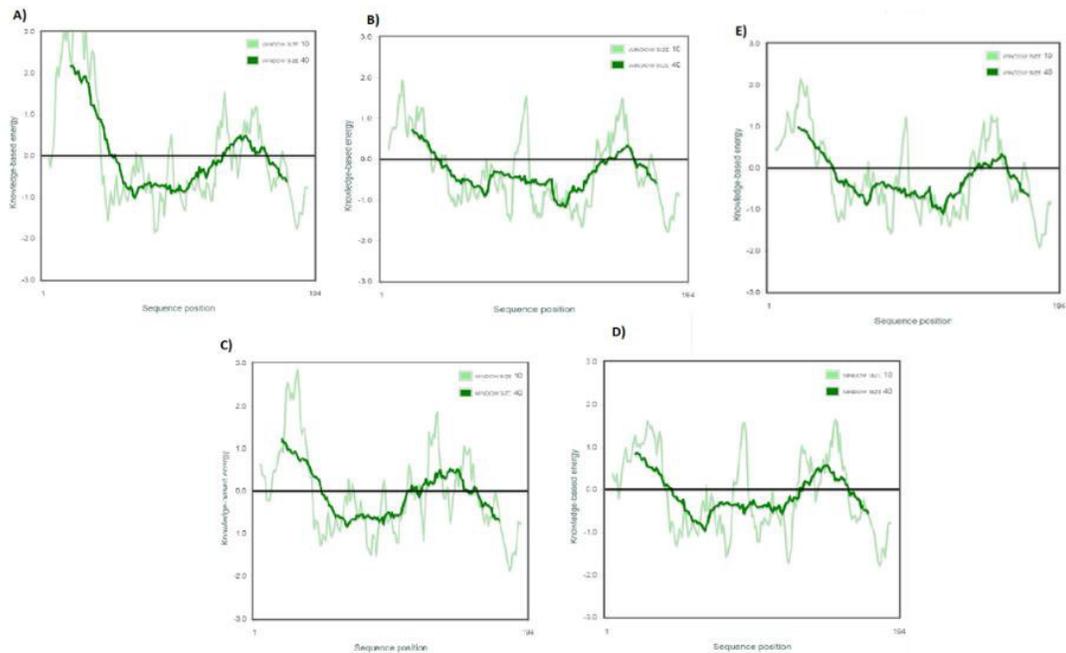


Figura 22. Modelos de calidad local de la citocina IL-18 (rata), obtenidos mediante ProSA-Web.

Se presentan los resultados de la evaluación de calidad general para los modelos homólogos de la citocina IL-18 de rata. De nuevo se tiene la comparativa del modelo (punto negro) con respecto a otras proteínas de tamaño similar. El modelo A, así como el modelo C presentan una tendencia en su ubicación hacia la parte superior, por otro lado, el modelo B y el modelo E sugieren una mayor posibilidad de ser los elegidos. De nuevo se realiza la elección a través del Z-Score, el modelo B tiene el valor más negativo correspondiente a  $-4.75$ , un valor adecuado para proteínas nativas similares. De manera complementaria el modelo de calidad local (figura 22) muestra como los modelos A y C tienen aminoácidos altamente inestables en comparación con el modelo B que, aunque posee aminoácidos fuera del rango de estabilidad, en general su estructura refleja un buen comportamiento. Es por ello que se elegirá al modelo B para usar en las pruebas de acoplamiento molecular.

Finalmente se presentan las estructuras tridimensionales de las 5 mejores plantillas en la figura 23 y se remarca al modelo B, siendo el mejor modelo al presentar un valor estable de Z-score y teniendo una estructura asequiblemente estable.

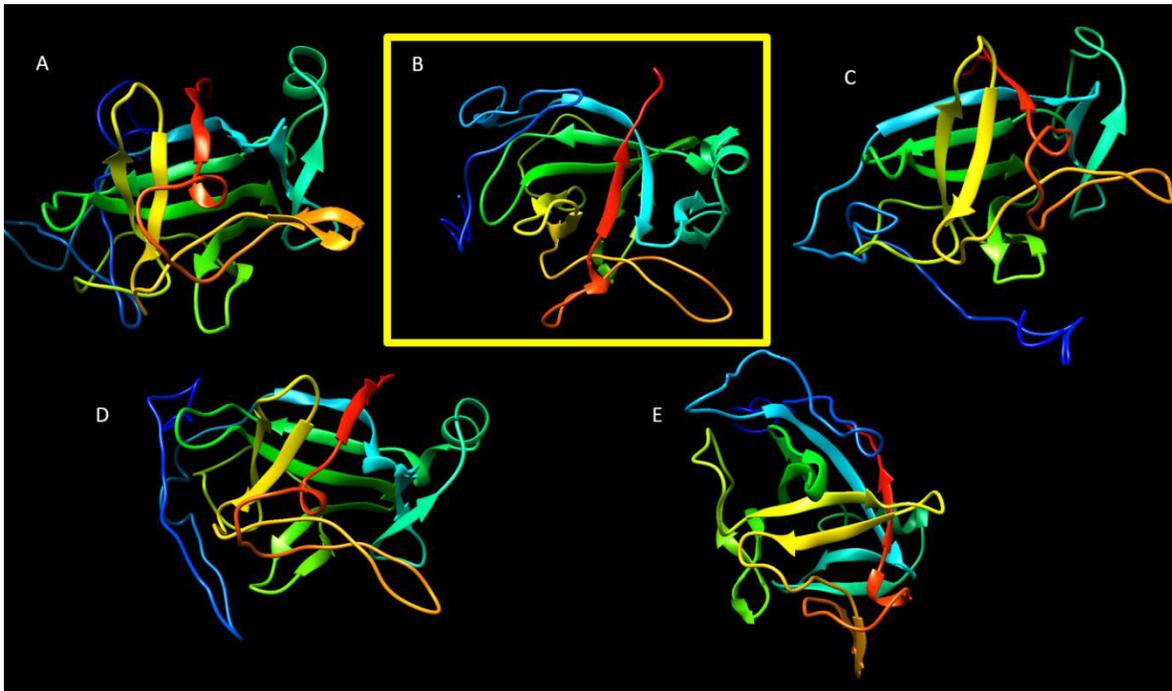


Figura 23. Modelos tridimensionales de las plantillas homologas correspondientes a la citocina IL-18 (rata), obtenidos mediante I-TASSER.

## 7.2 Acoplamiento molecular

### 7.2.1 Estudios docking: IL18 con MT y metabolitos activos

Al tener ya un modelo homólogo de la citocina IL-18 se procedió a realizar el estudio de acoplamiento molecular por medio del software AutoDock 4.2 y AutoDock Vina. Para identificar el mejor sitio de unión primero fue realizado un docking ciego, con una caja abarcando el total de la

proteína, posteriormente se obtuvieron los mejores modos de unión. De manera paralela se comparó con la información obtenida mediante el servidor *Protein Plus*. De manera complementaria las interacciones fueron detectadas usando el programa *Discovery Studio Visualizer*.

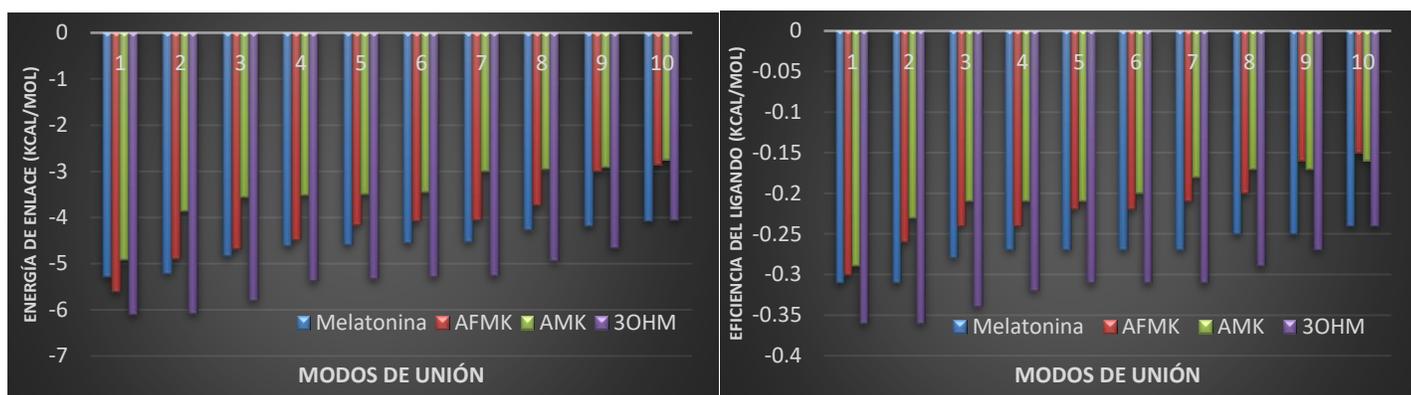


Figura 24. Se presentan los 10 mejores modos de unión con energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) obtenidos mediante el acoplamiento de la citocina IL-18 y la melatonina junto con sus metabolitos activos.

El programa devuelve las 10 mejores poses de unión entre ambas especies y que se presentan en la figura 24 a través de la energía de enlace (fig.24 izquierda) y la eficiencia del ligando (fig.24 derecha). De estos resultados se puede observar que todas las poses obtenidas poseen energías negativas, lo que significa que los complejos formados por la citocina IL-18 y los ligandos son energéticamente estables, el ligando que presenta una mejor energía de enlace es el 3OHM con -6.09 kcal/mol, seguido de AFMK con -6.01 kcal/mol, la melatonina con -5.84 kcal/mol y finalmente el AMK presentando -4.79 kcal/mol, esto para la primera pose. De manera general se observa la tendencia de mayor estabilidad energética por parte del 3OHM, mientras que la melatonina conserva una mejor energía que el AFMK. Por otro lado, la eficiencia del ligando da una métrica de los valores de energía de unión promedio por átomo, la energía de unión normalizada por el tamaño del compuesto, esto ayuda a conocer los ligandos con mejor potencia de afinidad de unión independientemente de su tamaño. Se aprecia un comportamiento similar al ya descrito, donde el ligando 3OHM muestra una mejor eficiencia con un valor de -0.36 kcal/mol y que se mantiene a lo largo de los 10 modos de unión, seguido esta la melatonina que presenta -0.34 kcal/mol, luego el AFMK con -0.92 kcal/mol y finalmente el AMK con -0.28 kcal/mol. Todas las eficiencias devuelven un valor de energía estable, para cada una de las especies.

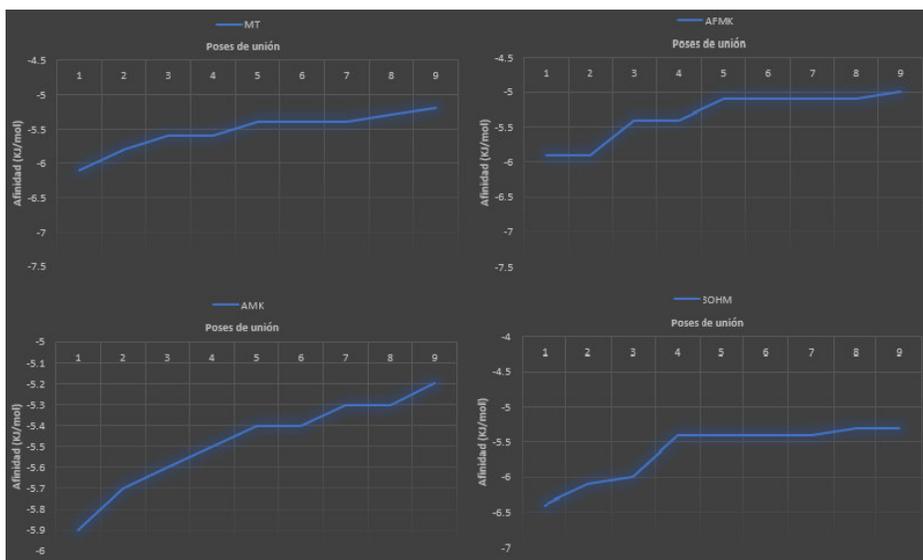


Figura 25. Energías de afinidad para el acoplamiento entre la citocina IL-18 y los ligandos melatonina y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego.

De manera complementaria se realizó el proceso de acoplamiento con AutoDock vina cuyos resultados se muestran en la figura 25, que presenta las energías de afinidad para cada uno de los ligandos con la citocina IL-18. Para todas las 4 especies se observan valores de afinidad negativos, valores que confirman la estabilidad energética del complejo formado, por otro lado, se tiene un comportamiento similar al obtenido por el software AutoDock 4.2, lo cual es una buena evidencia de la precisión del proceso. El ligando 3OHM mantiene la mejor afinidad con respecto a los demás con un valor de -6.4 kJ/mol, al tomar en cuenta sólo el primer modo de unión cuya energía es la más estable, tendremos después del 3OHM a la MT con -6.1 kJ/mol, AFMK con -5.9 kJ/mol y AMK con -5.9 kJ/mol, un comportamiento que se repite. De manera global, todos los resultados son favorables, al menos los primeros tres modos de cualquiera de las especies tienen una afinidad muy buena, no obstante, aún no se podría distinguir cual será el ligando que tenga mayor efecto sobre la macromolécula.

## 7.2.2 Optimización con disolvente

Si bien es cierto que, durante el proceso de acoplamiento molecular, el programa se encarga de rotar el ligando y realizar flexibilizaciones para encontrar los mejores modos de unión, la estructura de partida durante el docking tiene mucha influencia en el resultado final. Para mejorar la aproximación del sistema, se optimizó la geometría de nuestros ligandos para un medio que simule disolvente acuoso. En la figura 26 se muestran los resultados de acoplamiento para la optimización en fase gas y en disolvente, este último calculado con el modelo SMD. Los ligandos MT y AMK tuvieron un mejor desempeño en cuanto a las energías al ser previamente optimizadas en disolvente con valores de -6.45 kcal/mol y -6.27 kcal/mol respectivamente, inclusive la MT llegó a tener energías más estables que el 3OHM cuya primera pose para ejemplificar, tiene una energía de enlace de -5.96 kcal/mol y finalmente el AFMK mostró, para su primera pose una energía de enlace de -5.26 kcal/mol. De manera contraria el AFMK tuvo valores energéticos menos estables al ser optimizados en disolvente, llegando a caer por debajo de AMK. Con respecto a la eficiencia de ligando se mantuvo el mismo comportamiento descrito para la primera pose obtenida, liderando la MT con un valor de -0.38 kcal/mol, seguido de AMK con -0.37 kcal/mol, después 3OHM con -0.35 kcal/mol y finalmente el AFMK con -0.28 kcal/mol. No obstante, a lo largo de las 9 poses restantes el 3OHM obtiene valores más estables de energía que el AMK. Como se observa en la figura 26.

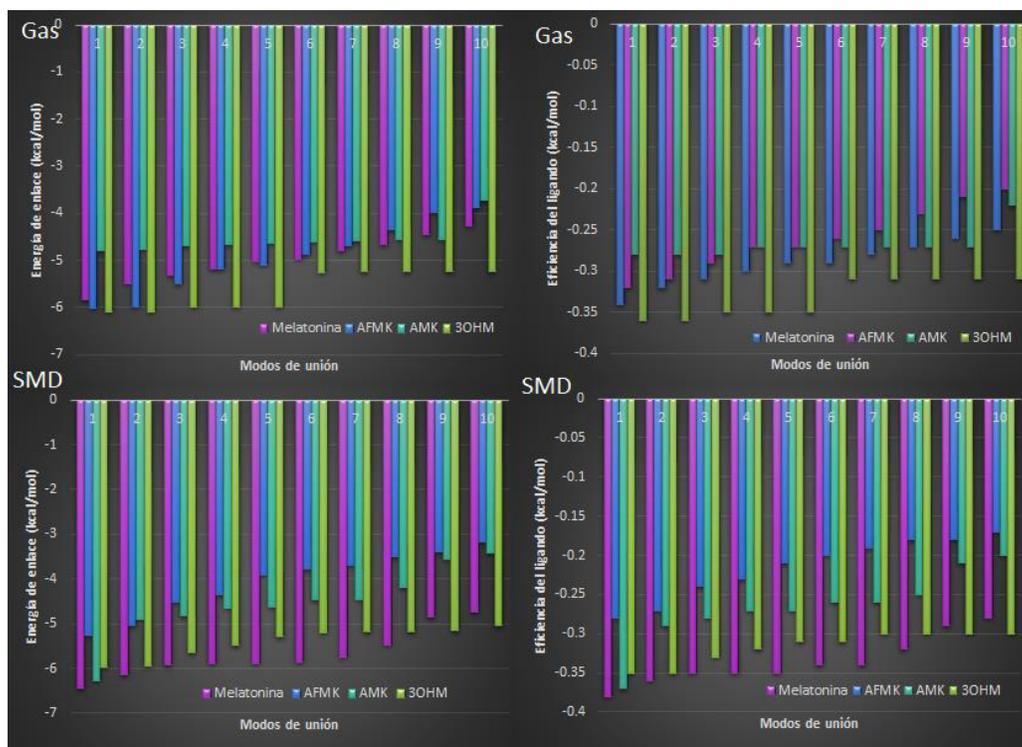


Figura 26. Resultados de energía de enlace y eficiencia del ligando, donde se ha optimizado el ligando en medio gas (arriba) y en medio acuoso (abajo), del acoplamiento entre IL-18 y melatonina y sus metabolitos

## 7.2.3 Docking dirigido y flexible

Con base en los resultados obtenidos durante cada uno de los procesos de docking ciego, y complementando con el servidor *ProteinPlus*, se identificó el sitio de unión con mayor capacidad farmacológica y cuyos ligandos tuvieran mejor afinidad, posteriormente se realizó un *docking* dirigido, donde se limitó el espacio de búsqueda a una región determinada y al mismo tiempo se flexibilizaron residuos que presentaron interacción con los ligandos en determinada cavidad. El proceso fue realizado mediante un parámetro de búsqueda de algoritmo genético y un número de evaluaciones exhaustivas de  $2.5 \times 10^6$ .

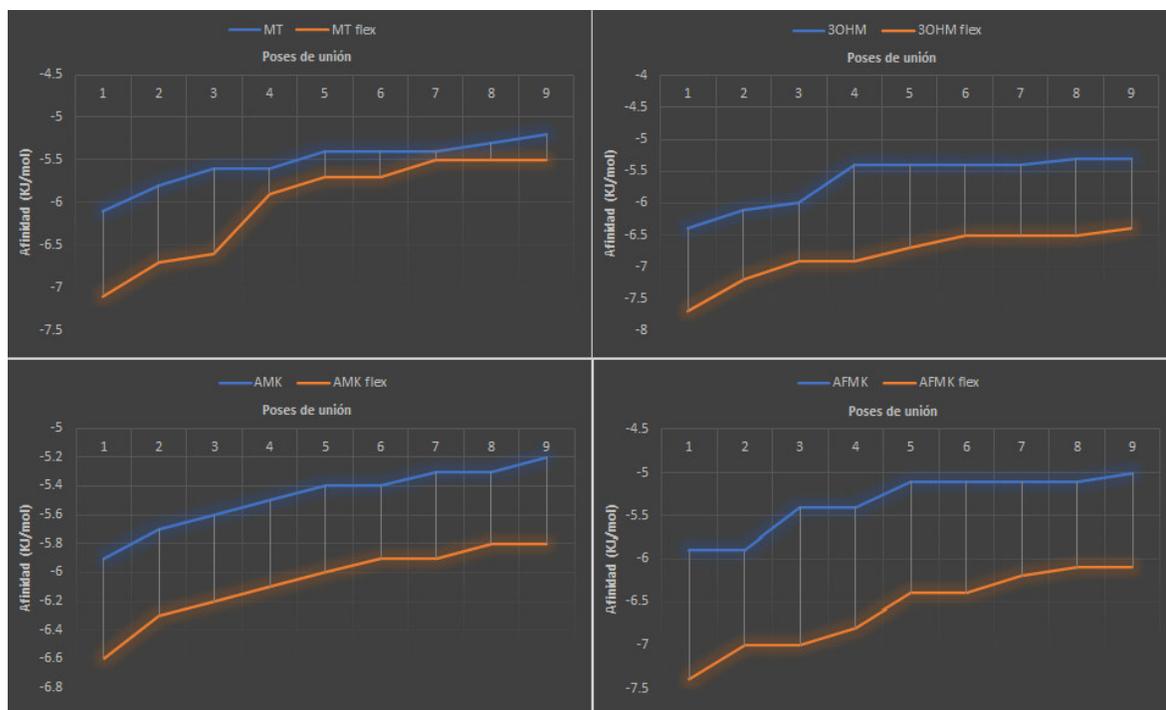


Figura 27. Energías de afinidad para *docking* ciego (azul) y *docking* dirigido y flexible (naranja) entre la citocina IL-18 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina

La comparación de energías de afinidad entre el *docking* ciego y el *docking* dirigido y flexible se puede advertir en la figura 27. Las líneas azules representan el *docking* ciego mientras que las líneas naranjas muestran el resultado una vez realizado el *docking* de manera dirigida y con determinados residuos flexibilizados, estos residuos se eligieron con base en aquellos que mostraban interacciones durante el *docking* ciego. El panorama general muestra como el proceso mejoró las energías de afinidad para todos los ligandos, alcanzando valores de energías más estables para el complejo formado en cada uno de los 9 modos de unión obtenidos por el software. De manera individual, el 3OHM sigue siendo el ligando con energía más estable con un valor ahora de -7.7 kJ/mol, seguido por AFMK con -7.4 kJ/mol, después se tiene a la MT con -7.1 kJ/mol para finalmente llegar a AMK con -6.6 kJ/mol por otro lado, tanto 3OHM como AFMK mostraron tener mejores energías de afinidad respecto a la MT, mientras que AMK tiene una mejor afinidad en cuanto a la comparación de los 9 modelos con respecto a la melatonina, esto es un reflejo de la capacidad mejorada que tienen los metabolitos activos para actuar en el cuerpo humano una vez que la MT se metaboliza. Otro detalle interesante es que el segundo proceso de *docking* permitió una mejor

diferenciación, en cuanto a valores de afinidad, entre los modos de unión, en comparación al docking ciego donde varias poses de unión compartían misma afinidad.

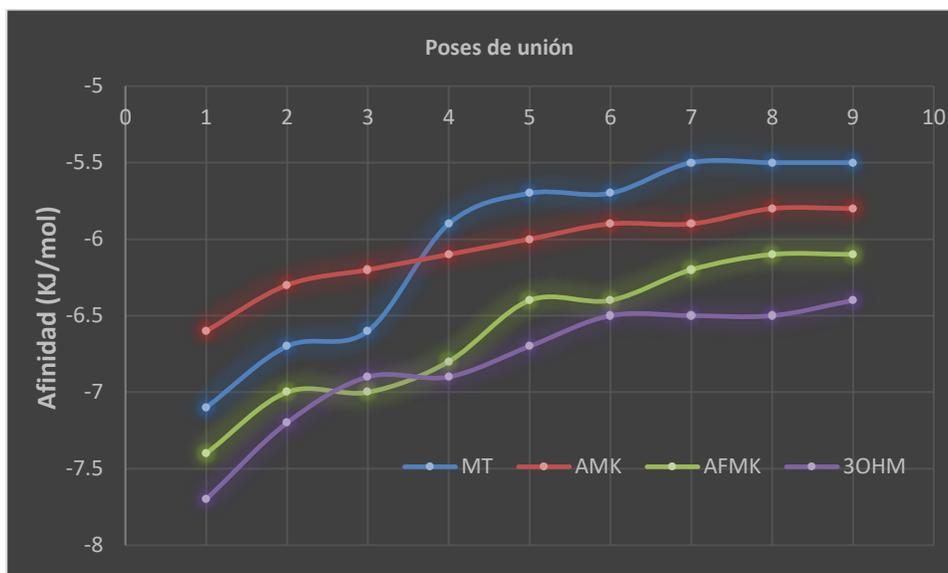


Figura 28. Grafica comparativa de afinidad entre la citocina IL-18 y la MT, así como sus metabolitos.

Para generar un panorama sobre la afinidad de los ligandos con la citocina IL-18 la figura 28 muestra una comparación entre los distintos ligandos utilizados cabe aclarar de nuevo, que la afinidad no debe ser tomada como un valor definitivo para determinar el mejor ligando, no obstante, su comportamiento a lo largo de las 9 poses puede dar una idea sobre las distintas opciones posibles por medio del cual un ligando interacciona con una cavidad. La figura 28 nos habla de cómo un ligando va teniendo distinta pose u orientación para con un sitio, esto tomando en cuenta que para cualquiera de los ligandos hay un sitio predilecto, y del cual se hablará más adelante. El 3OHM mantiene este comportamiento a lograr valores de afinidad más negativos, después se encuentra el AFMK, posteriormente el AMK que, aunque sus tres primeras poses no superan a la MT, el resto mantiene un buen comportamiento. En general saltos grandes de energía en la afinidad indican un cambio de la ubicación donde el ligando se une, mientras que energías muy cercanas señalan cambios en la orientación dentro del mismo sitio o cavidad.

## 7.2.4 Interacciones: IL-18 con MT

La metodología de acoplamiento utilizada permite conocer la forma en que el ligando MT interacciona, así como la ubicación probable dentro de la citocina IL-18. Como se indicó previamente se realizó un *docking* ciego para conocer el sitio de unión de nuestro ligando, la figura 29.A muestra el resultado obtenido del *docking* ciego realizado por AutoDock Vina, se ubica la cavidad donde se incrusta el ligando MT, justo se puede observar la pose de unión con mayor afinidad, no obstante, dicha cavidad albergó a 7 de las 9 poses, indicando la gran afinidad de dicho sitio con respecto al ligando. Por otro lado, para complementar la búsqueda del sitio activo de la proteína, se determinó la cavidad de mayor capacidad farmacológica (DD) a través del servidor ProteinPlus, y cuyo resultado se muestra en la figura 29.B, el volumen de color amarillo muestra el sitio que tiene la mayor probabilidad de, al interactuar con un ligando, provocar un cambio en la proteína que genera una reacción bioquímica en el cuerpo<sup>95</sup>, dicha cavidad muestra un volumen de  $474.88 \text{ \AA}^3$ , una superficie de  $701.9 \text{ \AA}^2$  y un  $DD=0.83$ , las mejores características respecto a otras posibles cavidades. Conforme a ambos resultados se selecciona dicha cavidad como nuestro sitio de unión, en este caso ambos lugares coinciden, la figura 29.B muestra de manera representativa el sitio donde se ubicaría la MT dentro de la cavidad elegida, se une dentro de dicho volumen y logra interactuar con diferentes residuos que conforman el sitio de unión.

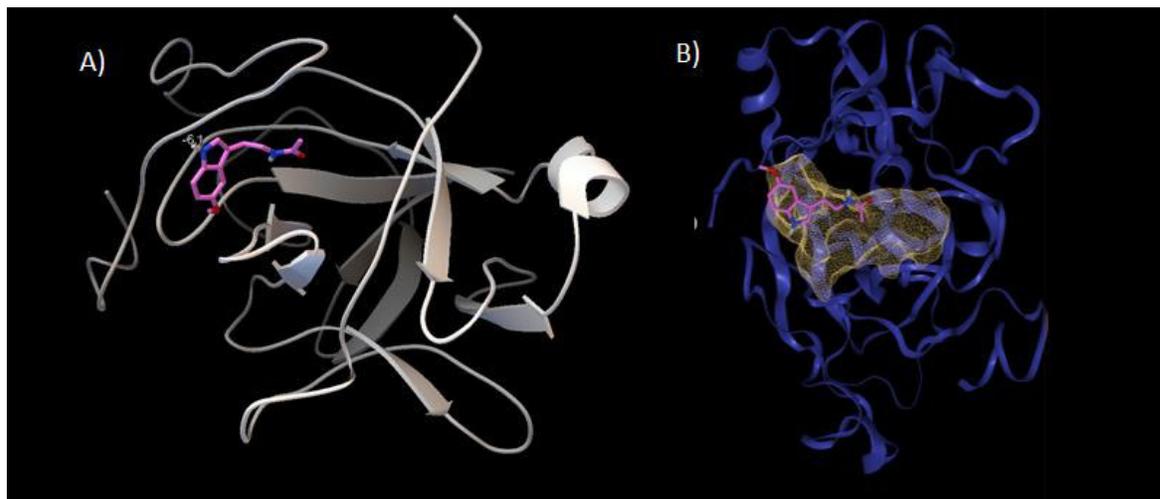


Figura 29. Resultado del *docking* ciego entre la citocina IL-18 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.



Figura 30. Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la citocina IL-18 y el ligando MT.

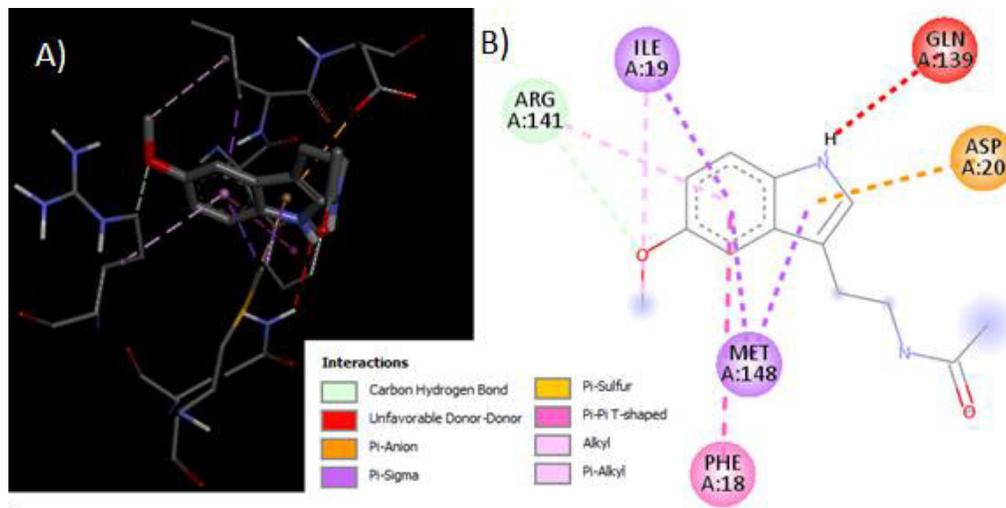


Figura 31. Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando MT en modelo 3D A) y modelo 2D B).

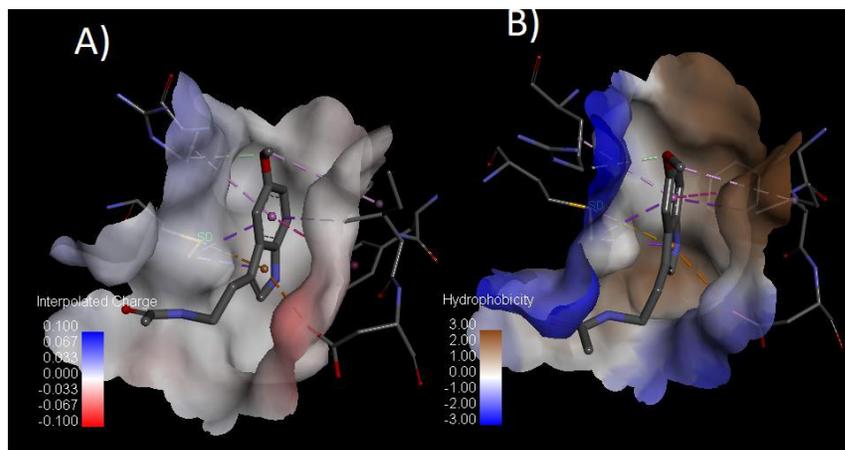


Figura 32. Interacciones entre la citocina IL-18 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

Como previamente se ha indicado, tras determinar el sitio de unión de la citocina IL-18, el resultado fue mejorado por medio de un *docking* dirigido y en el cual se han flexibilizado distintos residuos del sitio de unión (figura 30), los cuales fueron elegidos con base en las interacciones detectadas durante el primer *docking*. En la figura 31 se presentan las interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando MT en modelos tanto 3D (figura 31-A) y en 2D (figura 31-B). El ligando MT ha demostrado tener energías de afinidad estables y que se encuentran en un rango medio respecto a los restantes ligandos, por medio del software Discovery Studio se detecta que interacciona con distintos residuos del sitio de unión de la citocina IL-18, encontrándose interacciones de tipo hidrofóbicas con MET148 e ILE19, así como interacciones de tipo electrostáticas con ASP20 (figura 32). Es notable la presencia de interacciones no covalentes con el sistema  $\pi$  de la MT, el cual logra un efecto estabilizador resultante entre los enlaces sigma de grupos metilo tanto de la ILE19 como de la MET148 y con los orbitales p cercanos del sistema  $\pi$  aromático, esto probablemente dado por un efecto inductor debido a la presencia de grupos tiol y amino que generan un desplazamiento en la densidad de carga de los aminoácidos y por ende un posible electrófilo, las distancias van desde 3.75 Å hasta 3.96 Å. También es posible visualizar la aparición de una interacción no favorable que se presenta entre un hidrógeno de la MT y otro hidrógeno del grupo amino de la GLN139, ambos polarizados y presentando densidades positivas que llegan a encontrarse, esto es importante ya que no solo es necesario considerar las interacciones benéficas para la formación del complejo, sino que también aquellas interacciones que lleguen a presentar un problema de unión posterior. La presencia de un puente de hidrógeno de 3.43 Å poco mayor que el formado entre moléculas de agua, y un ángulo de 139.81° ligeramente mayor al encontrado en moléculas de agua y cetonas, se genera entre la ARG141 cuyo hidrógeno polar forma una asociación con los pares libre del oxígeno de tipo éter que une al sistema aromático con un grupo alquilo de la MT y que este último tiene también una interacción no covalente del tipo alquilo con la ILE19.

## 7.2.5 Interacciones: IL-18 con AMK

Para el caso del ligando AMK, se puede observar el resultado del *docking* ciego en la figura 33 que muestra el resultado de AutoDock Vina (fig. 33.A) y ProteinPlus (fig. 33.B). El lugar en el que descansan los ligandos coincide con los resultados del acoplamiento con MT, siendo la misma cavidad y por ende con las mismas propiedades, con una DD= 0.83 y que para la figura 33.B se resalta en color naranja los residuos por medio del cual interacciona el ligando con la proteína receptora. Por parte del acoplamiento, las 9 poses de unión generadas se ubican en esta misma cavidad, cambiando solamente la orientación de la molécula ligando. Este dato confirma la afinidad que tiene el ligando AMK por dicho sitio de unión y complementando los resultados obtenidos del acoplamiento con MT. Con base en estos resultados se eligió el sitio de unión correspondiente al ligando en cuestión, por otro lado, ProteinPlus permite identificar el sitio de unión al cual llega el ligando y que se resalta con una malla de color amarillo, los residuos en color naranja son aquellos con los cuales AMK tienen interacciones como resultado del acoplamiento, entre ellos se encuentra LYS14, LEU96, LYS140 y ARG141, estos residuos serán tomados en cuenta para el *docking* dirigido.

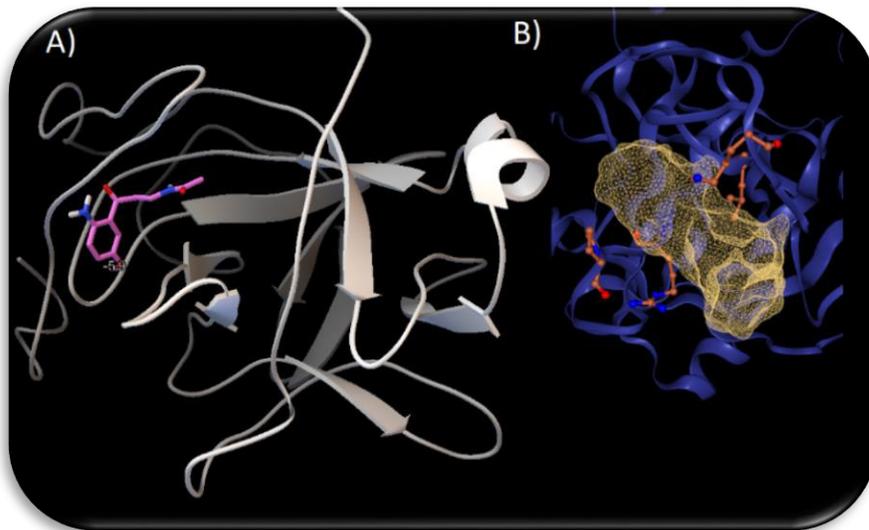


Figura 33. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.



Figura 34. Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando AMK.

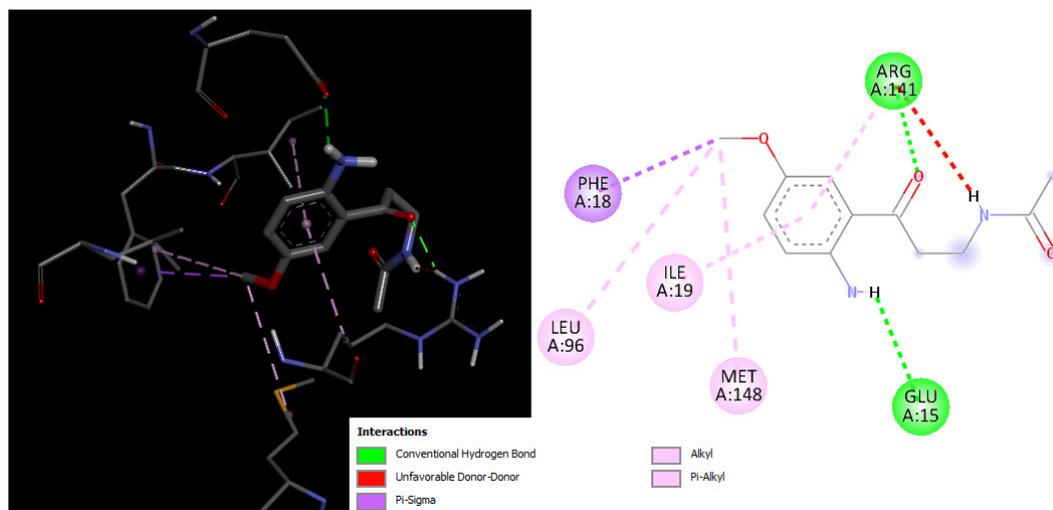


Figura 35. Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando AMK en modelo 3D (izquierda) y B) 2D (derecha).

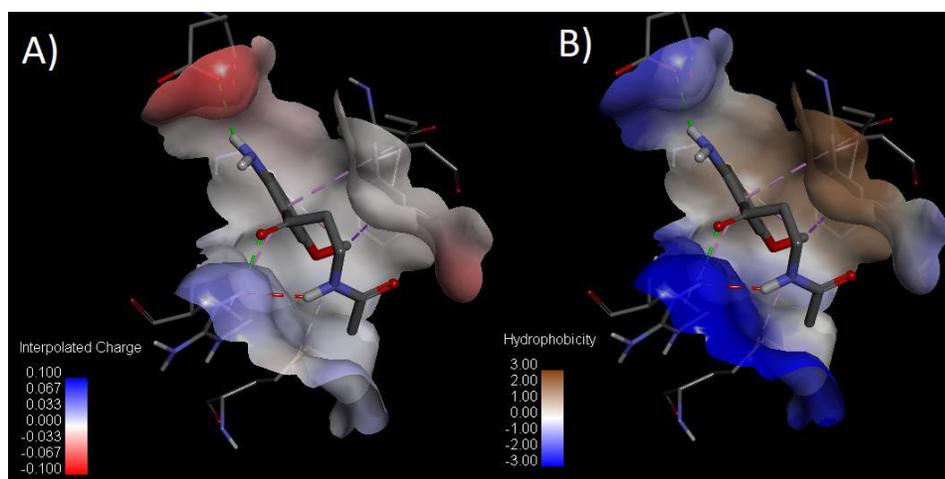


Figura 36. Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando AMK. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B).

El modelo de docking ciego fue mejorado por medio de un docking dirigido y flexible, y cuyo resultado puede observarse en la figura 34 donde se visualiza tanto el ligando AMK como los residuos flexibles de la citocina IL-18 con los que ahora interacciona resultado del docking flexible. Por otro lado, en la figura 35 se presentan las interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando AMK tanto en 2D como 3D, presentando principalmente dos interacciones, que son las hidrofóbicas y las de puente de hidrógeno, y cuya superficie se observa en la figura 36, que muestra una división marcada como resultado de la interacción con AMK. La superficie de color café muestra las zonas hidrofóbicas, donde predominantemente encontramos las interacciones en las que interviene el sistema pi, mientras que la superficie azul muestra las zonas lipofílicas donde se aprecia la formación de puentes de hidrógeno. El ligando AMK mostró tener energías de afinidad que, aunque menores que el resto de los ligandos, son energías estables.

Entre las interacciones no covalentes está aquella formada entre el sistema pi de la PHE18 con los enlaces sigma del metilo unido al grupo éter del AMK a una distancia de 3.96 Å. Además, se

observa la formación de interacciones alquilo con el mismo grupo terminal metilo, consecuencia de un efecto inductor originado por el átomo de oxígeno cercano, con los residuos LEU96 y MET148 que presentan distancias de 5.09 Å y 5.31 Å respectivamente. De manera similar se tiene las interacciones esta vez del sistema pi del AMK con las cadenas carbonilas de ILE19 a una distancia de 4.94 Å, así como con ARG141 a 4.44 Å de distancia. Los puentes de hidrógeno se forman con el hidrogeno del grupo amino del AMK como especie donante e interacciona con el oxígeno perteneciente al grupo carboxilo del GLU15 a una distancia de 2.27 Å y formando un ángulo de 133.59 °, por otro lado, se tiene otro puente de hidrógeno formado entre el grupo carbonilo del AMK e hidrógeno del grupo metilo de la ARG141 a una distancia de 2.15 Å y formando un ángulo de 133.82 °. Con este último aminoácido, sin embargo, se presenta una interacción no favorable debido a la cercanía de los grupos donadores que presentan densidades positivas, del hidrógeno perteneciente al grupo amino del AMK y los hidrógenos de la ARG141.

## 7.2.6 Interacciones: IL-18 con AFMK

Se estudió el posible sitio de unión del ligando AFMK con la citocina proinflamatoria IL-18, un docking ciego fue realizado obteniéndose así las 10 mejores poses de unión, la figura 37.A muestra la pose de unión con mejores energías tanto de enlace como de eficiencia de ligando. La cavidad donde se unió el AFMK y que se muestra en la figura mencionada, alberga 7 de las 9 mejores poses devueltas por el software AutoDock, lo cual es un buen indicativo de la preferencia del ligando por dicho sitio. El resultado fue comparado con el obtenido por el servidor ProteinPlus y que se muestra en la figura 37.B, el sitio de unión generado coincide con el obtenido en AutoDock y siendo este el mismo sitio que resulta con la MT y el AMK. La cavidad en general se muestra resaltada con una malla color amarillo, posee las mismas características ya mencionadas previamente con un DD=0.83 y se resaltan en color naranja los ligandos con los cuales interacciona el AFMK y que se observan en el docking ciego, encontrándose los residuos LYS14, PHE18, ILE19, LEU96, LYS140, ARG141 y MET148. Con base en estos resultados se eligió dicho sitio de unión para realizar el *docking* dirigido y flexibilizar los ligandos previamente mencionados.

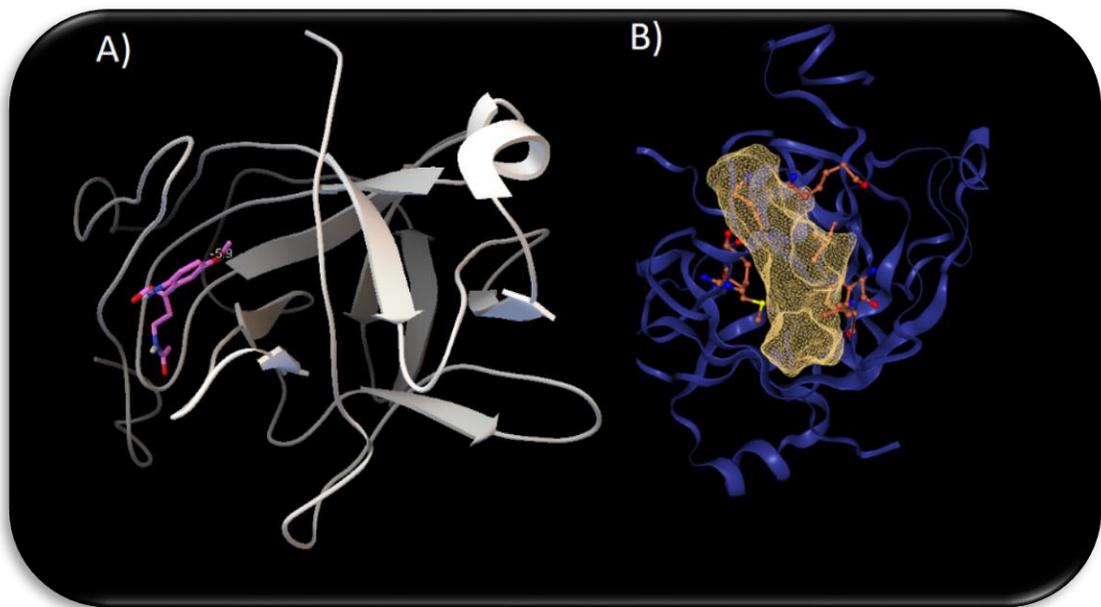


Figura 37. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.



Figura 38. Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK.

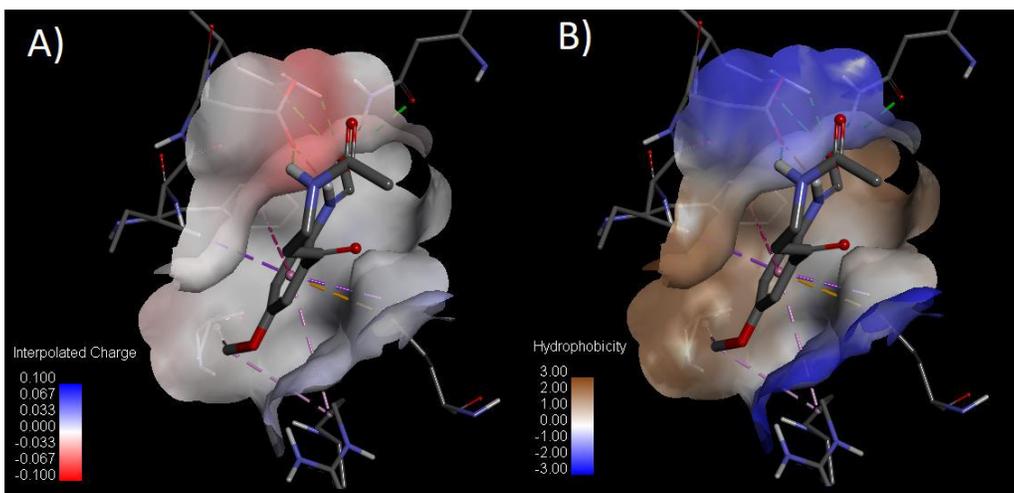


Figura 39. Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B).

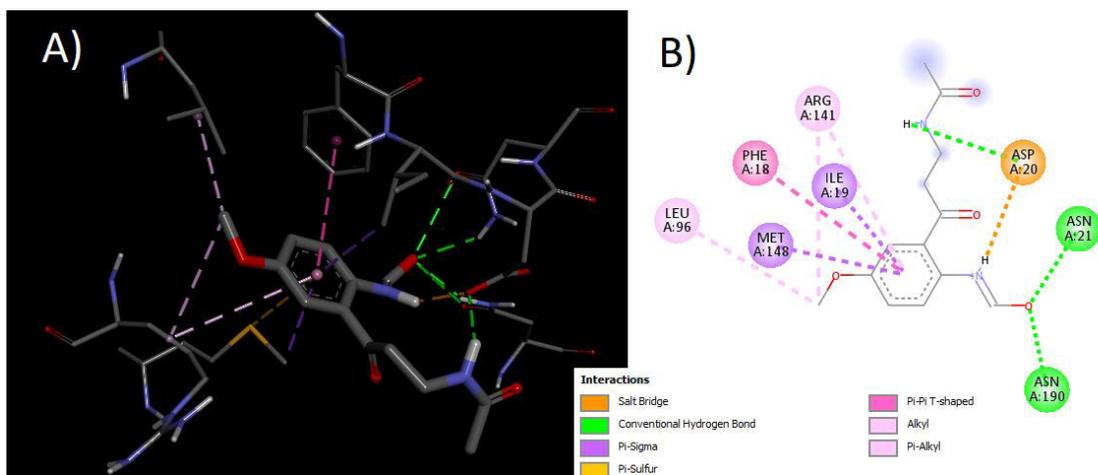


Figura 40. Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK en modelo 3D (A) y 2D (B).

Con base en los resultados obtenidos del *docking* ciego y complementando con los resultados de ProteinPlus, se realizó el *docking* dirigido entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK, cuyo resultado se visualiza en la figura 38 la cual muestra la primera pose con mejor energía de afinidad en donde es posible contemplar los residuos flexibilizados. Además la figura 39 presenta las superficies de interacción que se forman entre la citocina IL-18 y el ligando AFMK, tanto la superficie electrostática (fig. 39.A) dominada principalmente por los puentes de hidrógeno y la formación de un puente salino, mientras que la superficie mostrada en la figura 39.B resalta las zonas de interacciones consecuencia de las interacciones hidrofóbicas, entre las que encontramos interacciones de tipo pi-sigma, pi-alquilo e interacciones de tipo alquilo-alquilo. También se puede advertir las interacciones detectadas entre la citocina y el ligando AFMK en modelos tanto 2D como 3D (fig. 40 B y A respectivamente). El AFMK mostró tener buenas energías de enlace, así como eficiencia del ligando y afinidad, solo por debajo del 3OHM, del mismo modo muestra una gran cantidad de interacciones con la citocina, en consecuencia, resalta como un muy posible candidato a ser el ligando con mayor posibilidad de lograr el efecto bioquímico buscado al ser uno de los principales metabolitos, junto al AMK, en los que se convierte la MT.

Inicialmente se encuentran las interacciones no covalentes de tipo hidrofóbicas, que se forman entre la densidad electrónica del sistema aromático del ligando AFMK con los grupos alquilo

de los residuos de ARG141, ILE19, PHE18 y MET148 con una distancia de 5.00 Å, 3.67 Å, 5.34 Å y 3.85 Å respectivamente. Además, se tiene la presencia de interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo con el metilo que sufre un efecto inductor debido al oxígeno del grupo ceto en el AFMK y que interacciona con los ligandos LEU96 y ARG141 a una distancia de 4.19 Å y 4.30 Å respectivamente. Por otro lado, entre la formación de interacciones electrostáticas se tiene un puente salino entre el hidrógeno perteneciente al amino terminal del AMK y el grupo carboxilo terminal del residuo ASP20 a una distancia de 2.05 Å. Además, se visualiza la formación de una interacción de tipo pi-azufre entre la densidad del grupo aromático del AMK y el azufre perteneciente a la MET148 con una distancia de 4.23 Å. Finalmente se detectan 3 posibles puentes de hidrógeno, dos de ellos se forman con el oxígeno del carbonilo terminal del AMK que actúa como átomo aceptor mientras que como átomo donador se tiene al hidrógeno del grupo amino del ASN21 con una distancia de 2.38 Å y un ángulo de 133.52 ° y el hidrógeno del grupo amino del ASN190 a una distancia de 2.13 Å y un ángulo de 143.5 °. El tercer puente de hidrógeno que se detecta, se forma entre el H del grupo acetamida del AMK como donador y como aceptor el oxígeno del grupo carboxilo del ASP20 a una distancia de 2.31 Å y formando un ángulo 130.13 °.

## 7.2.7 Interacciones: IL-18 con 3OHM

Finalmente, se realizó el estudio de acoplamiento molecular para el ligando 3OHM con la citocina IL-18, un *docking* ciego permitió obtener las 10 mejores poses de unión entre dichas especies, en la figura 41.A se observa la cavidad donde se localiza la primera pose, que arroja la mejor energía de enlace y eficiencia del ligando, así como afinidad. La cavidad donde se une el ligando 3OHM alberga 7 de las 9 poses de unión, esto es un buen indicativo sobre la afinidad que hay del ligando con dicha cavidad. Por su parte ProteinPlus coincide en la ubicación del mejor sitio de unión al poseer la mayor capacidad farmacológica con un valor de DD=0.83, este sitio, el cual se encuentra remarcado con una malla amarilla en la figura 42.A es el mismo sitio que comparten el resto de los ligandos previamente expuestos y por ende con las mismas características. Así entonces los 4 ligandos comparten el mismo sitio de unión. El ligando 3OHM interacciona, según la información obtenida del *docking* ciego, con residuos de la citocina alrededor de su sitio de unión entre los que se observa a la LYS14, LEU96 Y ARG141, teniendo naturalezas tanto hidrofóbicas como electrostáticas.

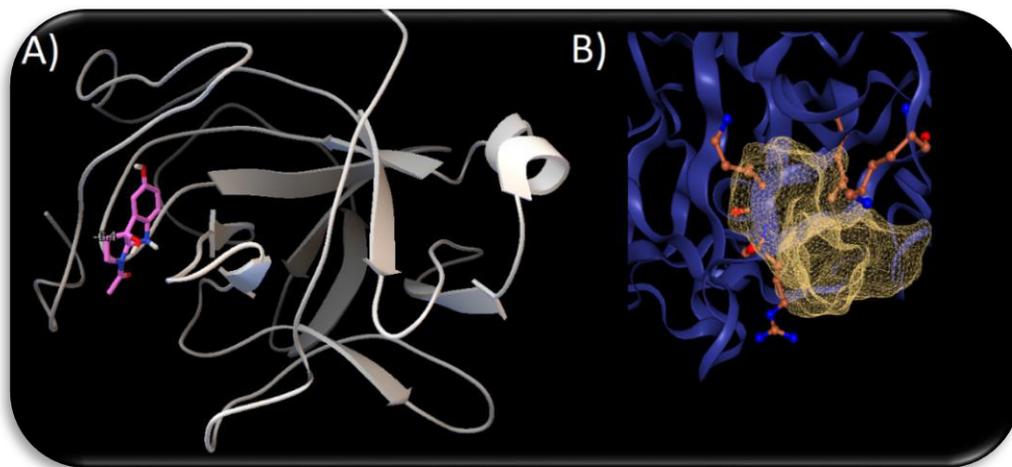


Figura 41. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.

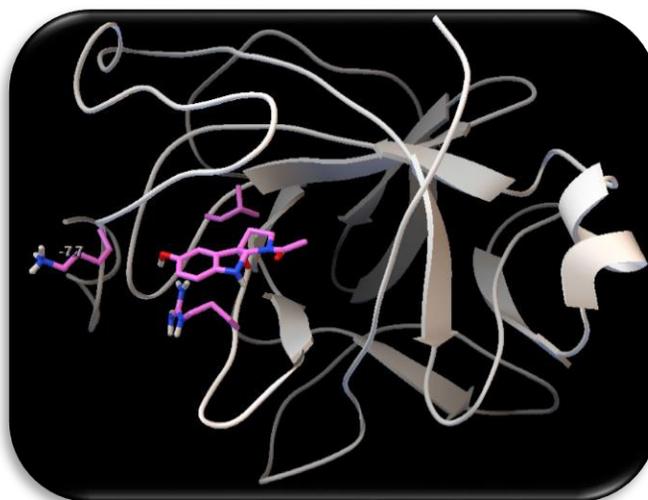


Figura 42. Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM.

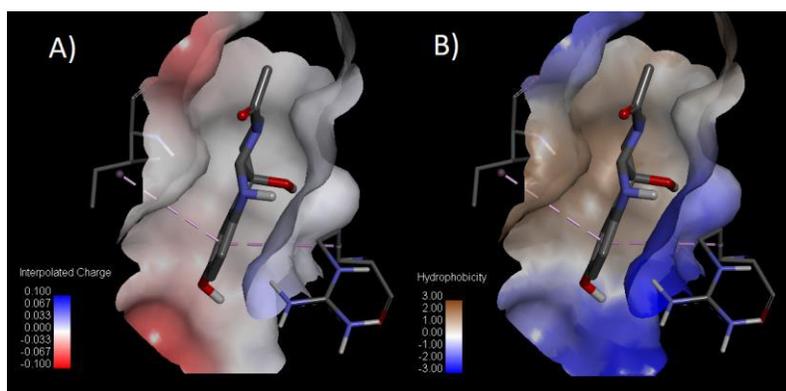


Figura 43. Interacción entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM. Superficie electrostática A) y superficie hidrofóbica B).

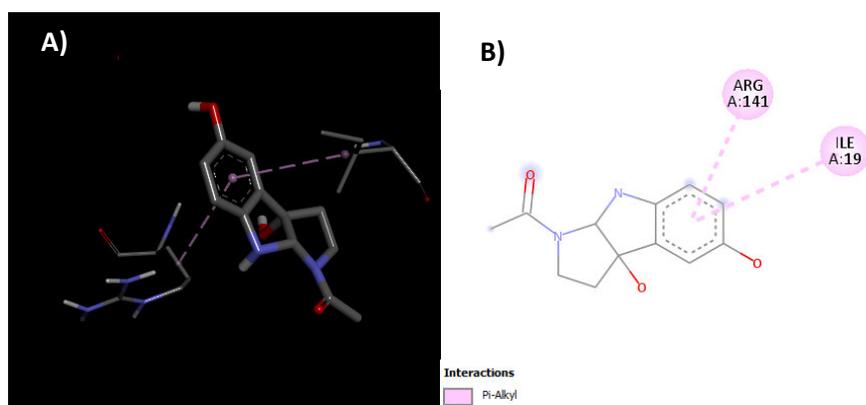


Figura 44. Interacciones detectadas entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM en modelo 3D (A) y 2D (B).

De manera análoga con el resto de los ligandos, se realizó un refinamiento de los resultados del acoplamiento molecular, mediante un docking dirigido y flexibilizando residuos que previamente se han encontrado interaccionan con el ligando, la figura 42 muestra la primera pose de unión entre la citocina IL-18 y el ligando 3OHM, este modo de unión mejoró sus valores de afinidad con respecto al docking ciego, el 3OHM en general muestra los mejores resultados de afinidad al ser comparado con el resto de los ligandos. La figura 43 por su parte presenta las superficies de interacción resultantes de la unión entre ambas especies, tanto la superficie electrostática (fig. 43.A) como la superficie hidrofóbica (fig. 43.B) dentro de la cual se tienen las pocas interacciones detectadas. En la figura 44 se muestran los residuos con los cuales forma interacciones de tipo hidrofóbicas el ligando 3OHM con la citocina IL-18, se encuentra que, a pesar de sus buenas energías de afinidad, solo dos interacciones se forman, las cuales resultan de la densidad electrónica del grupo aromático del ligando con grupos alquilo pertenecientes a un grupo etilo y un grupo sec butilo de la ARG141 y la ILE19 a distancias de 4.63 Å y 4.89 Å respectivamente, mientras que no se advierten interacciones de tipo electrostáticas o no favorables, tampoco puentes de hidrógeno, esto es un resultado importante, ya que a pesar de dominar los resultados de energía en el docking, no parece formar muchas interacciones no covalentes que le den estabilidad al sistema

Tabla 3 Resumen de los residuos de la citocina IL-18 que interactúan con los diferentes ligandos durante el docking

Ligando	Afinidad de unión (kJ/mol)	Aminoácidos interactuantes y distancia (Å)		
		Puentes de hidrógeno	Interacción Hidrofóbicas	Interacción electrostática
<b>MT</b>	-7.1	ARG141(3.43)	ILE19(3.75), MET148(3.96), MET148(3.39)	ASP20(3.84)
<b>AMK</b>	-6.6	GLU15(2.27), ARG141(2.15)	PHE18(3.96), LEU96(5.09), MET148(5.31), ILE19(4.94)	-----
<b>AFMK</b>	-7.4	ASN190(2.13), ASN21(2.38), ASP20(2.31)	LEU96(4.19), ARG141(5.00), MET148(3.85), ILE19(3.67), PHE18(5.34)	ASP20(2.05)
<b>3OHM</b>	-7.7	---	ARG141(4.63) ILE19(4.89)	----

El estudio de acoplamiento molecular permitió establecer el sitio de unión de la citocina IL-18 por medio del cual se une a la MT y sus metabolitos activos, la cavidad en cuestión fue idéntica para todos y cada uno de los ligandos, mientras que la diferencia consistió en la orientación y la formación de interacciones entre ambas especies, la tabla 3 contiene un resumen de los residuos que interactúan con los diferentes ligandos, así como la distancia a la que se forman. El ligando 3OHM presentó las mejores energías de afinidad, mientras que AFMK presentó la mayor cantidad de interacciones. Se han encontrado en su mayoría interacciones de tipo hidrofóbicas, la mayoría de ellas consecuencia de la interacción pi debido al ciclo aromático de los ligandos, por otro lado, algunas pocas interacciones electrostáticas fueron observadas además de la presencia de puentes de hidrógeno entre las especies. En conclusión, los ligandos generan complejos energéticamente estables en un mismo sitio de unión con la citocina IL-18, siendo AFMK el que probablemente tenga la capacidad de intervenir en el proceso de interacción con IL-18.

## 7.2.8 Estudios docking: IL13 con MT y metabolitos activos

Las citocinas como ya se ha hablado anteriormente tienen la capacidad de autorregularse, así como regular a otras citocinas, por lo cual es común encontrarse con pares de citocinas donde una inhiba la otra como control. Una de ellas es la citocina antiinflamatoria IL-13, que tiene la capacidad de controlar la respuesta proinflamatoria de citocinas como IL-1, IL-12 así como IL-18 en condiciones fisiológicas al actuar como inmunoreguladoras y por ende limitar el efecto de las citocinas proinflamatorias<sup>96,97</sup>. No obstante, si el origen de la inflamación persiste, la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar los daños debido a una respuesta inflamatoria constante. Por lo tanto, se estudia la interacción de la citocina antiinflamatoria IL-13 con los ligandos de melatonina y sus metabolitos activos con el fin de descartar la interacción privilegiada ante la citocina IL-18.

El objetivo principal de esta sección es estudiar la afinidad que tiene la citocina IL-13 con la MT y sus metabolitos, el modelo tridimensional de la IL-13 se obtuvo de la base de datos de PDB con código 3VBC mientras que los ligandos ya previamente se han construido y optimizado en la sección anterior. El estudio se realizará mediante acoplamiento molecular por medio del software AutoDock 4.2 y AutoDock Vina utilizando un parámetro de búsqueda de algoritmo genético y un número de evaluaciones exhaustiva de  $2.5 \times 10^6$ . Para identificar el sitio de unión se realizó un proceso similar al de la citocina IL-18, primero fue realizado un docking ciego, con una caja abarcando el total de la proteína y posteriormente se obtuvieron los mejores modos de unión. De manera paralela se comparó con la información obtenida mediante el servidor *Proteins Plus* para así complementar la información y finalmente las interacciones fueron detectadas usando el programa *Discovery Studio Visualizer*.

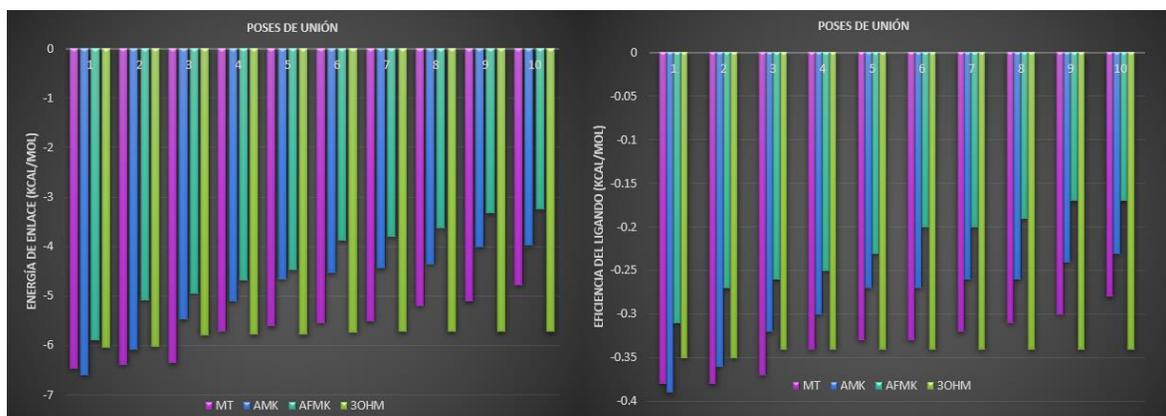


Figura 45. Energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) entre la citocina IL-13 y la MT y sus metabolitos, datos obtenidos por acoplamiento molecular mediante un *docking* ciego.

En la figura 45. se muestran los resultados de tanto la energía de enlace como de la eficiencia del ligando obtenido mediante el acoplamiento molecular ciego. Por un lado, la energía de enlace muestra resultados con valores negativos para los 10 modos de unión, lo que significa que todas las estructuras formadas son estables. El ligando que muestra una energía de enlace más estable es el

AMK con  $-6.59$  kcal/mol, seguido de la MT con  $-6.46$  kcal/mol, después está el ligando 3OHM con un valor de  $-6.03$  kcal/mol y finalmente el AFMK con una energía de enlace de  $-5.89$  kcal/mol, esta comparación es con respecto a la primera pose. De manera general el ligando 3OHM muestra el mejor comportamiento para todas las poses de unión junto con la MT que pierde un poco más de energía con los modos de unión finales. La eficiencia del ligando que permite conocer la energía de unión excluyendo el tamaño de los ligandos muestra un comportamiento similar. El ligando AMK junto con la melatonina tienen las energías más estables con valores de  $-0.39$  kcal/mol y  $-0.38$  kcal/mol respectivamente. Así posteriormente se tiene al 3OHM con un valor de  $-0.35$  kcal/mol y finalmente el AFMK con  $-0.31$  kcal/mol. Las tendencias también se mantienen donde el 3OHM muestra poca variabilidad en sus diferentes poses y manteniéndose en los mismos valores.

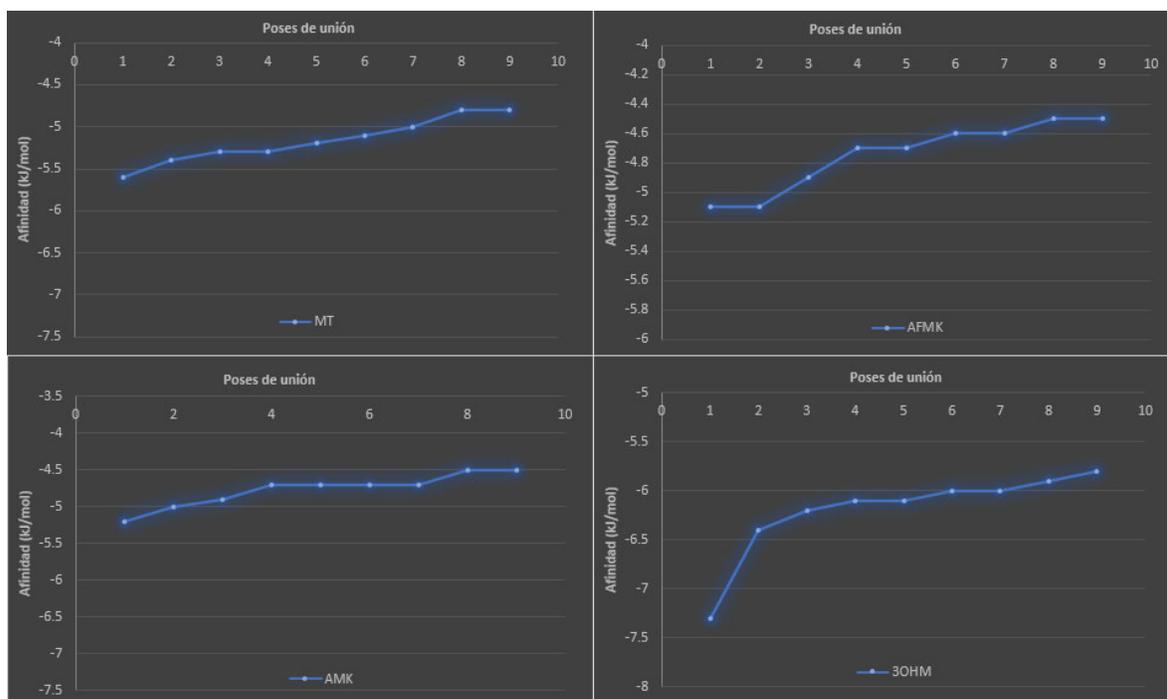


Figura 46. Energías de afinidad para el acoplamiento entre la citocina IL-13 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego

El estudio del sitio de unión se complementa utilizando AutoDock Vina bajo las mismas características como tamaño de la caja, parámetro de búsqueda y número de evaluaciones. La figura 46 muestra el resultado obtenido para los 4 diferentes ligandos utilizados con la citocina IL-13. Todas las afinidades arrojan valores de energía estable (negativos) en la formación del complejo en cuestión. Enfocando en la primera pose de unión, el ligando 3OHM presenta la afinidad con valor más negativo de  $-7.3$  kJ/mol, enseguida está la MT con  $-5.6$  kJ/mol y posteriormente tanto el AMK como el AFMK con valores de  $-5.2$  kJ/mol y  $-5.1$  kJ/mol respectivamente, siendo despreciable la diferencia entre ambos. La afinidad por los ligandos cambia entonces con respecto a los resultados de AutoDock, no obstante, se tiene que todas las poses de unión mantienen este comportamiento de energías estables, por lo cual muestra resultados generales iguales en cuanto a la estabilidad cualitativa.

## 7.2.9 Docking dirigido y flexible de la citocina IL-13

De manera análoga se procedió a realizar un Docking dirigido limitando el espacio donde pueden interactuar los ligandos MT y sus metabolitos activos, así como realizar una flexibilización de los residuos de la citocina IL-13 que se encontraron durante el docking ciego, los cuales interactúan al formar el complejo. Seguido se utilizó el servidor *ProteinPlus* para caracterizar las propiedades espaciales y de capacidad farmacológica del sitio de unión. Se utilizó un parámetro de búsqueda de tipo algoritmo genético y un número de evaluaciones exhaustivas de  $2.5 \times 10^6$ .

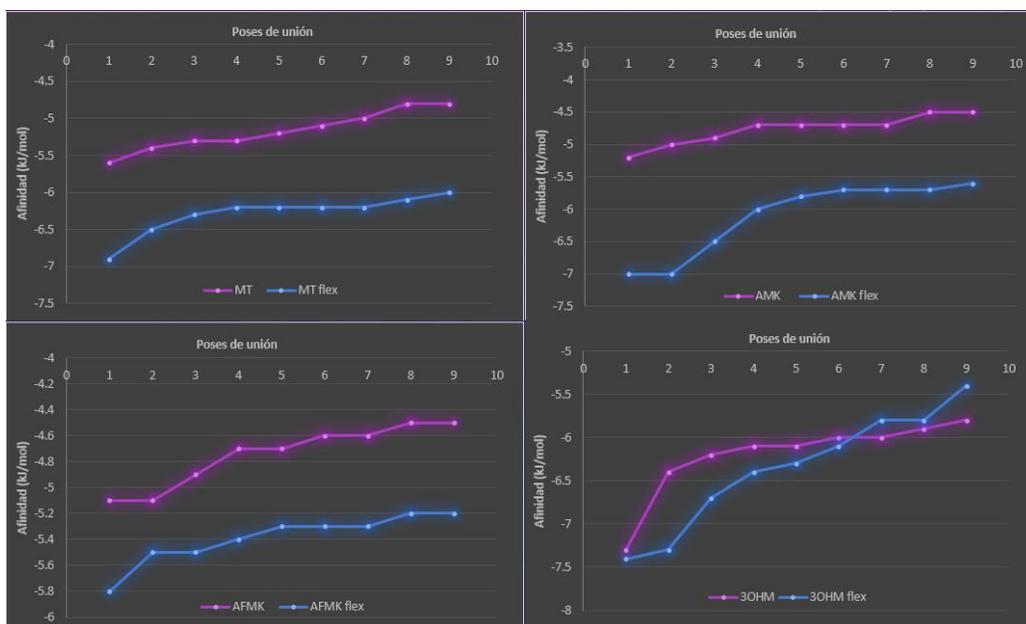


Figura 47. Energías de afinidad para docking ciego (morado) y docking dirigido y flexible (azul) entre la citocina IL-13 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina

Para comparar la diferencia de energías de afinidad entre el docking ciego y el dirigido se presenta la figura 47 que muestra los resultados obtenidos mediante AutoDock Vina, en color morado se aprecia el resultado del docking ciego mientras que en color azul el dirigido, es claro que se muestra una mejoría de los resultados para cualquiera de los 4 ligandos, por su parte 3OHM mostró un comportamiento irregular que se repitió en diferentes corridas del cálculo, no obstante la mayoría de las poses poseía siempre una energía más estable en el docking dirigido. Se muestran las 9 mejores poses de unión, al centrarse en la primera de estas poses se tiene que el ligando 3OHM mostró el mejor valor de afinidad con  $-7.4$  kJ/mol, seguido de AMK y MT con  $-7.0$  kJ/mol y  $-6.9$  kJ/mol respectivamente, para finalmente encontrarse el ligando AFMK con una afinidad de  $-5.8$  kJ/mol. En general todos siguen mostrando energías estables, a pesar de que 3OHM mostró la mejor afinidad en la primera pose, sus restantes decaen rápidamente, siendo entonces MT quién muestra una mejor energía en conjunto, seguido AMK y finalmente AFMK. Se observa como los ligandos AFMK y AMK cambian de lugar en comparación con la citocina IL-18, donde el AFMK muestra valores más bajos de afinidad con respecto al AMK, situación contraría a IL-18 donde el AFMK mejoró bastante su energía tras el acoplamiento dirigido, por otro lado, se mantiene al 3OHM con mejores afinidades y se ubica a la MT en un valor intermedio en el acoplamiento con cualquiera de las dos citocinas.

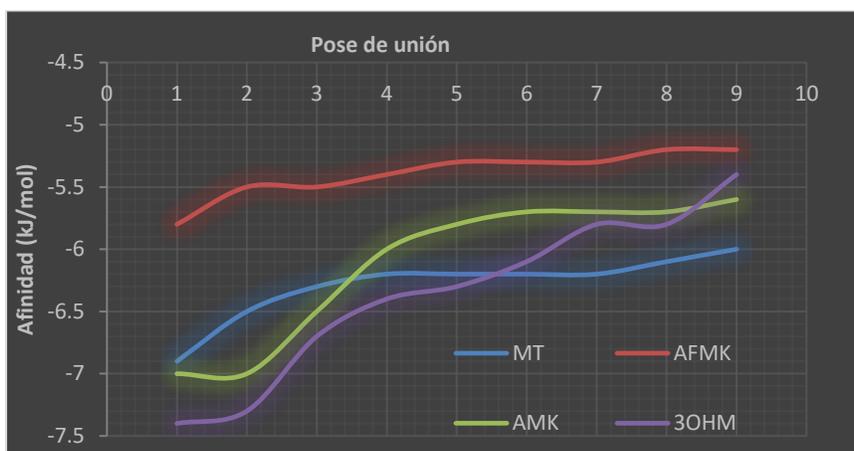


Figura 48. Grafica comparativa de afinidad entre la citocina IL-13 y la MT, así como sus metabolitos.

Finalmente, se muestra una comparación directa entre las afinidades resultantes del docking flexible y dirigido entre la citocina IL-13 y los 4 ligandos (fig. 48). Se visualiza como el 3OHM mantiene las mejores energías de afinidad, cabe recordar a partir de séptima pose sufre una caída prominente con respecto a su resultado de docking ciego, seguido MT presenta las mejores tendencias de energías teniendo apenas unas pocas variaciones entre cada uno de los modos de unión, por su parte AMK mostró ser el segundo metabolito con mejor afinidad ubicándose después de MT y manteniendo valores casi constantes a partir de la cuarta pose, por último se encuentra la interacción del AFMK que a diferencia de la citocina IL-18, aquí se muestra con la peor afinidad con respecto a los demás metabolitos. Tanto IL-13 como IL-18 muestran gran afinidad con el ligando 3OHM que recordemos es un metabolito de la MT que se genera de manera considerable en condiciones de estrés oxidativo, mientras que en condiciones fisiológicas normales se presentan de manera equilibrada los ligandos AFMK y AMK, este último entonces muestra mejores resultados para ser un probable candidato de unión con IL-13, no obstante, presenta menores energías que la MT. Es necesario entonces, observar el comportamiento de las interacciones que se forman entre los ligandos para dar una conclusión al respecto del ligando privilegiado en la unión.

## 7.2.10 Interacciones: IL-13 con MT

Conforme al plan de trabajo se utilizó el software AutoDock y AutoDock Vina para determinar el sitio de unión más probable, dicha información se comparó con los resultados obtenidos por medio del servidor *Proteins Plus*. Los resultados se observan en la figura 49. Se muestra la pose de unión con mejor afinidad entre la citocina IL-13 y el ligando MT (fig. 49.A), dicha cavidad de unión alberga a 4 de las 9 poses correspondientes, una segunda cavidad mantiene a otros 4 modos de unión, mientras que el último está en otra ubicación de la citocina, por lo cual es necesario decidir sobre el posible sitio de unión. La cavidad mostrada en la figura 49 contiene a la pose de mejor afinidad con un valor de  $-5.6$  kJ/mol y a su vez los otros tres modos de unión mantienen una energía superior a  $-5.0$  kJ/mol, por otro lado, el conjunto de los restantes 4 modos de unión que comparten la otra cavidad poseen energías de afinidad menores a los  $-5.0$  kJ/mol, además los resultados de ProteinPlus, cuya imagen se muestra en la figura 49.B señalan con una malla amarilla la cavidad que posee una mayor capacidad farmacológica, con un valor de  $0.82$ , presenta además una superficie de reacción de  $1389.77 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $832.51 \text{ \AA}^3$ . Esta cavidad es aquella que se comparte con la mejor pose de unión así como con otros 3 modos distintos, mientras que los restantes 4 modos que comparten este sitio de unión resultan tener una  $DD=0.72$  un valor que si bien no es malo, resulta menor que el primer sitio mencionado, de igual manera tanto su área como volumen son mucho menores también, lo cual limita el espacio disponible para que un ligando se una, es por ello que se considera como el sitio de unión más probable el que coincide con la primera pose de unión. En la figura 49.B también es posible observar los residuos que conforman la cavidad, así como aquellos que se encontró interaccionan con el ligando, estos residuos se resaltan en color blanco.

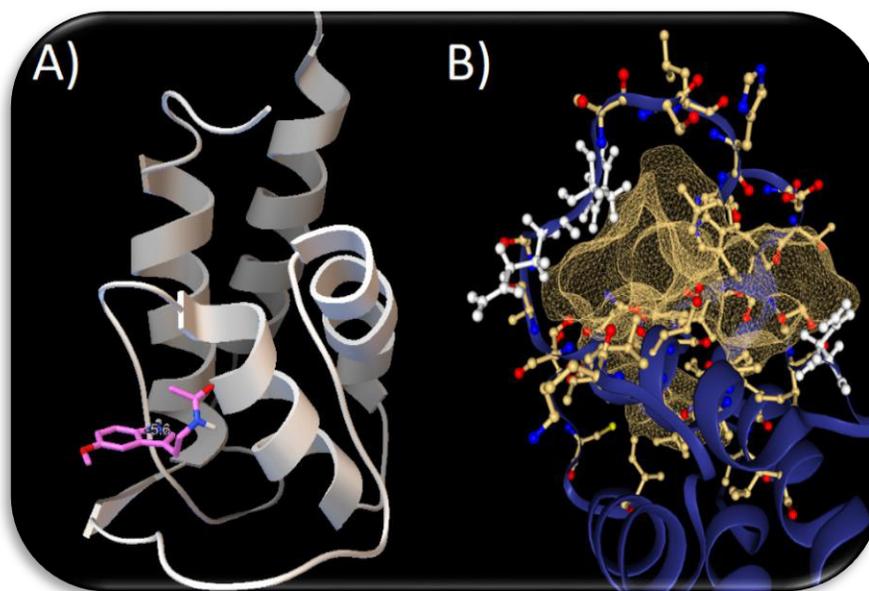


Figura 49. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus. Se advierte como ambas cavidades coinciden.



Figura 50. Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la citocina IL-13 y el ligando MT.

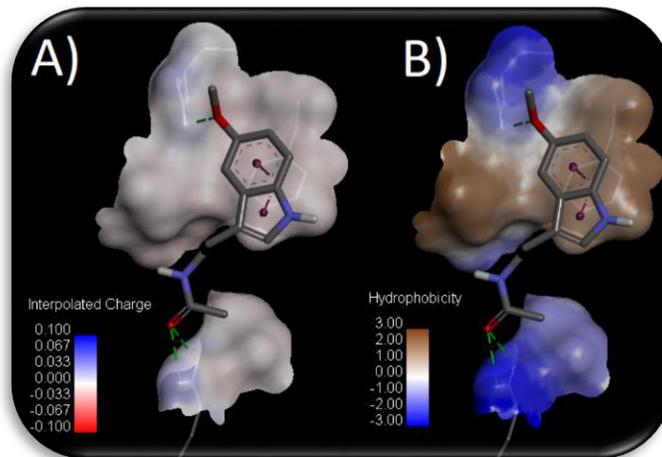


Figura 51. Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

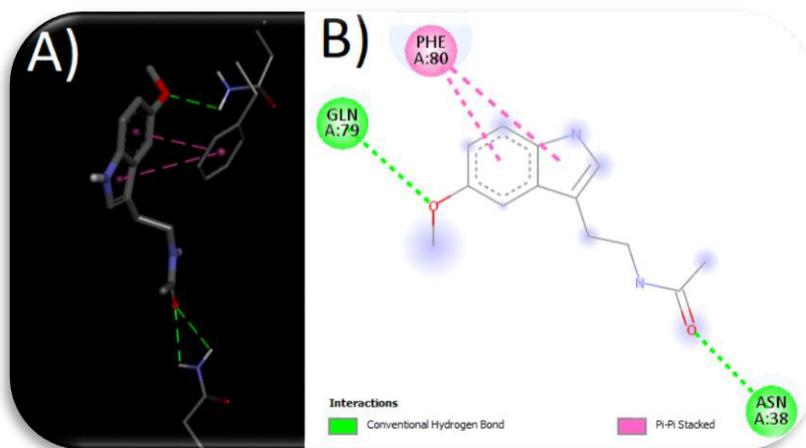


Figura 52. Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando MT en A) modelo 3D y B) modelo 2D.

Un segundo proceso de acoplamiento fue realizado con la citocina IL-13 y la MT, esta vez se utilizó un *docking* dirigido con base en la información obtenida previamente del *docking* ciego, de igual manera se flexibilizaron distintos residuos de la proteína para darles una mayor libertad de interacción, el resultado de dicho acoplamiento se muestra en la figura 50 que muestra la pose de unión con mejor afinidad. La figura 51 indica las superficies de interacción formadas entre la citocina y el ligando MT, es notable como en la figura 51.A no muestra cambios de propiedades electrostáticas, manteniendo la mayor parte de esta superficie sin carga salvo unos pequeñas zonas de densidad positiva donde localizamos la formación de puentes de hidrógeno, por otro lado en la figura 51.B encontramos el mapa de la superficie hidrofóbica que recordamos la zona café corresponde a zonas hidrofílicas mientras que la zona azul a zonas lipofílicas, en esta caso es notorio esta separación dado por la zona azul y que contiene a los puentes de hidrógeno, mientras que la zona café contiene interacciones de tipo apilamiento  $\pi$ .

De igual manera en la figura 52, se muestran las interacciones detectadas entre el ligando MT y la macromolécula IL-13 tanto en 3D (fig. 52.A) y en formato 2D (fig. 52.B) donde encontramos aquellas interacciones no covalentes construidas a partir de interacciones hidrofóbicas como lo es el apilamiento  $\pi$  formado de la interacción entre las densidades electrónica de los sistemas aromáticos de la MT con el residuo PHE80 a una distancia de 3.99 Å. Además se tienen las interacciones formadas debido a efectos electrostáticos que integran los puentes de hidrógeno del oxígeno perteneciente al grupo metoxilo como grupo aceptor de la MT y el hidrogeno como donador de puente de hidrógeno correspondiente al grupo amino de la GLN79 con una distancia de 2.65 Å y formando un ángulo 92.04 °, un ángulo algo pequeño por lo que es posible que se genere con un poco de tensión, así también se tiene la formación de otro puente de hidrógeno con el oxígeno carbonilo de la MT con cualquiera de los dos hidrógenos disponibles del grupo amino de ASN38 a una distancia de 2.69-2.88 Å y un ángulo de 92.78 ° aproximadamente.

## 7.2.11 Interacciones: IL-13 con AMK

Continuando con el ligando AMK, en la figura 53.A se visualiza el resultado del acoplamiento con la citocina IL-13, se muestra la pose con la mejor afinidad la cual muestra un valor de -5.2 kJ/mol. La cavidad donde descansa el ligando se comparte entre 7 de las 9 poses dando entonces una buena tendencia para unirse el AMK en dicho sitio, así mismo la cavidad es la misma que se eligió para la MT, de tal manera que posee las mismas propiedades ya mencionadas previamente donde se resalta la DD= 0.82. Por su parte en la figura 53.B se muestra la cavidad correspondiente dada por el servidor *Proteins Plus* dentro del cual se muestran los residuos que conforman dicha cavidad, así como se resaltan en blanco aquellos que interactúan con el ligando AMK, entre ellos están MET33, TRP35, GLU49, ASN53 entre otros, residuos que serán tomados en cuenta para el *docking* dirigido.

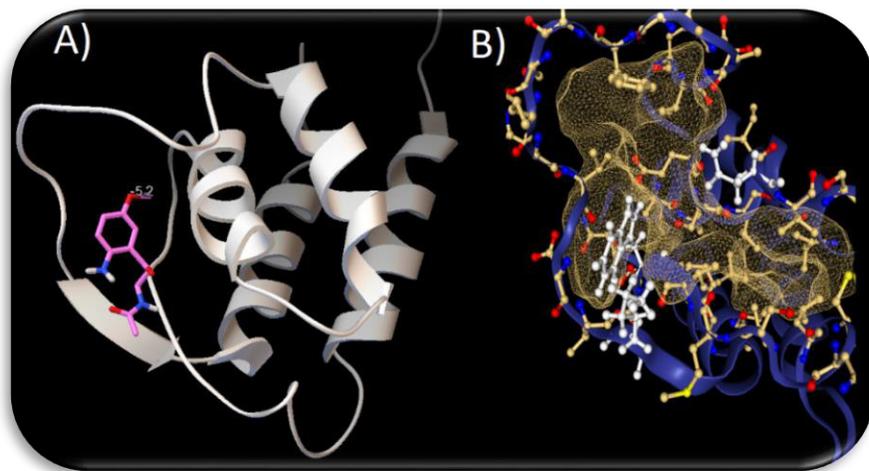


Figura 53. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.



Figura 54. Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-13 y el ligando AMK.

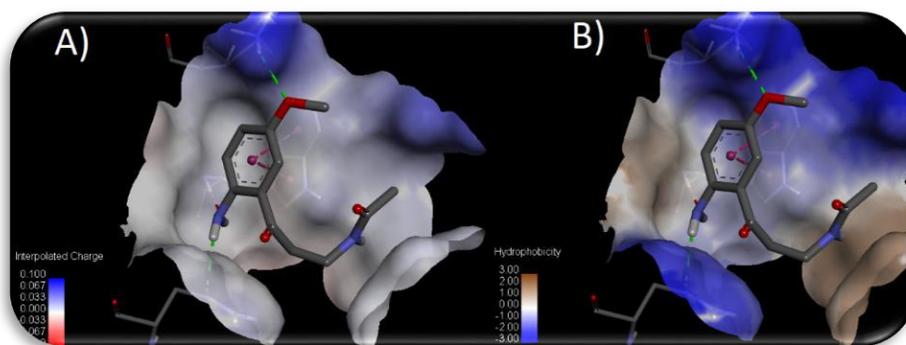


Figura 55. Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando AMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

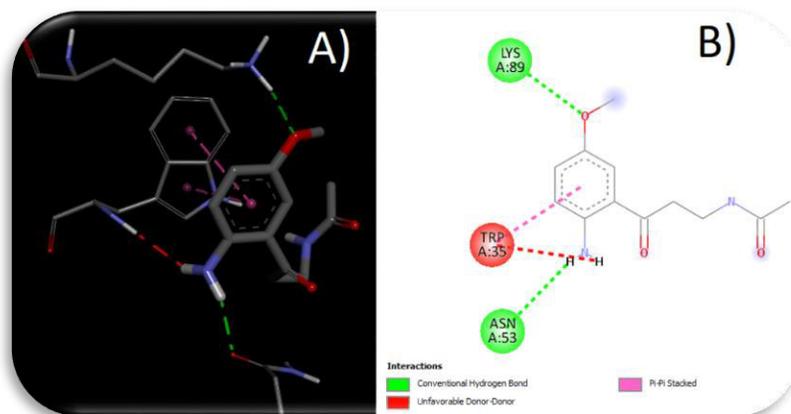


Figura 56. Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando AMK en modelo 3D (izquierda) y B) 2D (derecha).

Con base en los resultados tanto del docking ciego como de Protein Plus, fue realizado un docking dirigido donde fueron flexibilizados diferentes residuos de la macromolécula para que interactuaran con mayor libertad con el ligando AMK, el resultado se observa en la figura 54 que presenta el modo de unión de mayor afinidad (-7.0 kJ/mol). Con este modelo de interacción mejorado se procedió a conocer las interacciones presentes entre ambas especies, la figura 55 muestra las superficies de interacción tanto electrostática (fig. 55.A) donde se visualizan zonas de cargas positivas una de ellas conteniendo un puente de hidrógeno así como la superficie hidrofóbica (fig. 55.B) que muestra mayores zonas lipofílicas en las cuales están presentes interacciones de tipo apilamiento  $\pi$ .

En cuanto a las interacciones formadas entre el ligando AMK y los residuos de la macromolécula se presentan en la figura 56 que contiene tanto un modelo 2D como el modelo 3D de dichas interacciones. Como parte de las interacciones no covalentes encontramos aquellas resultado de la densidad electrónica del sistema aromático del AMK con el sustituyente indol del residuo TRP35, dos posibles interacciones entonces pueden llegar a formarse a distancias de 3.91 Å y 4.29 Å. No obstante este mismo residuo puede llegar a cambiar su orientación debido a la posible generación de una interacción no favorable debido a la repulsión de las densidades electrónicas positivas de los hidrógenos del grupo amino de ambas especies. También se observa la generación de posibles puentes de hidrógeno donde el ligando AMK actúa tanto como donador, como aceptor, por un lado el hidrógeno de su grupo amino forma un puente con la densidad del par libre de electrones del oxígeno carbonilo del ASN53 a una distancia de 2.14 Å y con un ángulo de 156.4°. Además forma un segundo puente de hidrógeno esta vez con el oxígeno del grupo metóxi del AMK como grupo aceptor y los hidrógenos del grupo amino de la LYS89 a una distancia de 2.29 Å, así como un ángulo de 138.46°.

## 7.2.12 Interacciones: IL-13 con AFMK

Para el caso del ligando AFMK, el cual mostró una muy buena afinidad, así como generación de interacciones con IL-18, se estudió por medio de acoplamiento molecular ahora con la citocina antiinflamatoria IL-13. En la figura 57.A se advierte el resultado del docking ciego entre ambas especies, se muestra la pose de mayor afinidad no obstante esta misma cavidad contiene a 6 de las 9 poses obtenidas por el software lo cual es indicativo de la buena afinidad por dicho sitio. Por su parte *Proteins Plus* mostró coincidir con el sitio de unión donde se muestran los residuos que componen la cavidad en la figura 57.B, así como aparecen resaltados en color blanco aquellos residuos que se encontró formaron interacciones con el ligando AFMK, entre ellos se tiene a la GLU49, la HIS84, así como HIS73, SER55, VAL54 entre otros. La cavidad entonces donde se alberga el ligando AFMK coincide con los anteriores ligandos ergo, tendrá entonces las mismas características de área y volumen, así como DD=0.82.

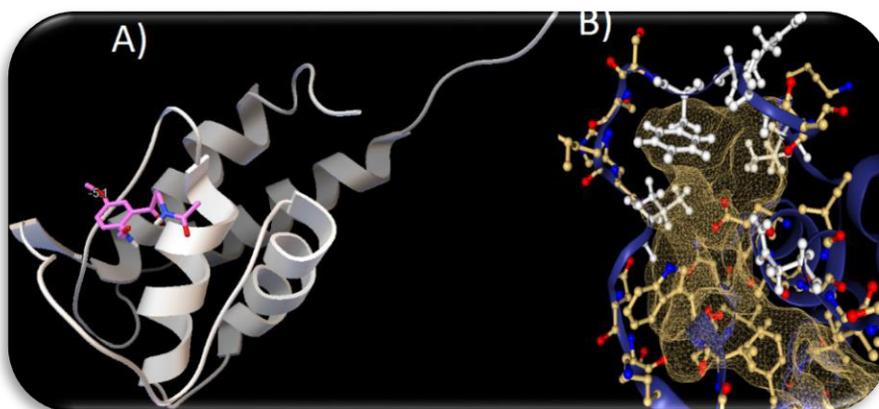


Figura 57. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.

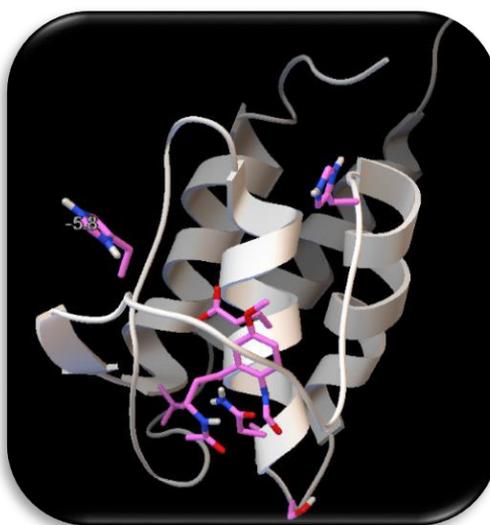


Figura 58. Primera pose resultante del *docking* flexible entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK.

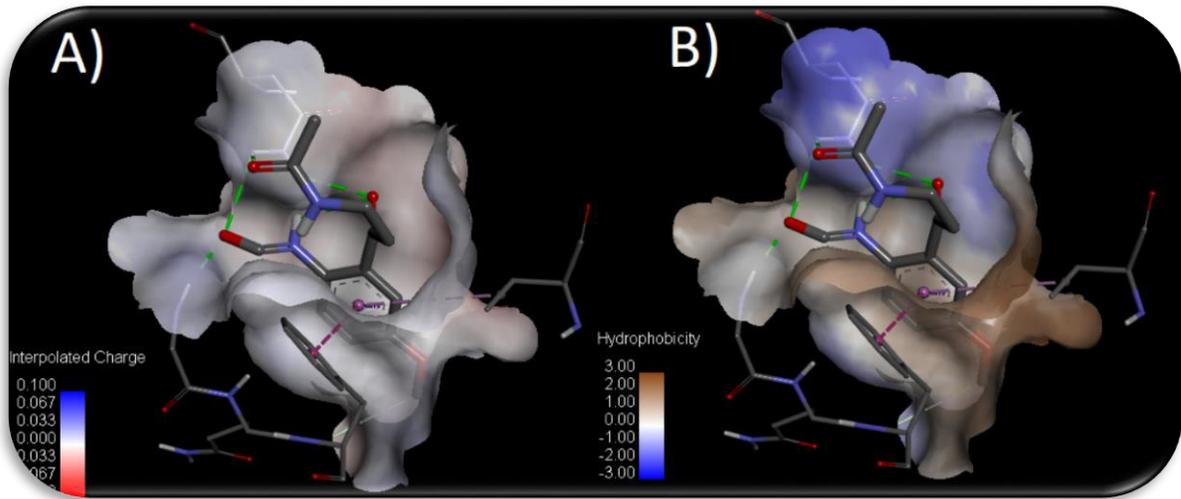


Figura 59. Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

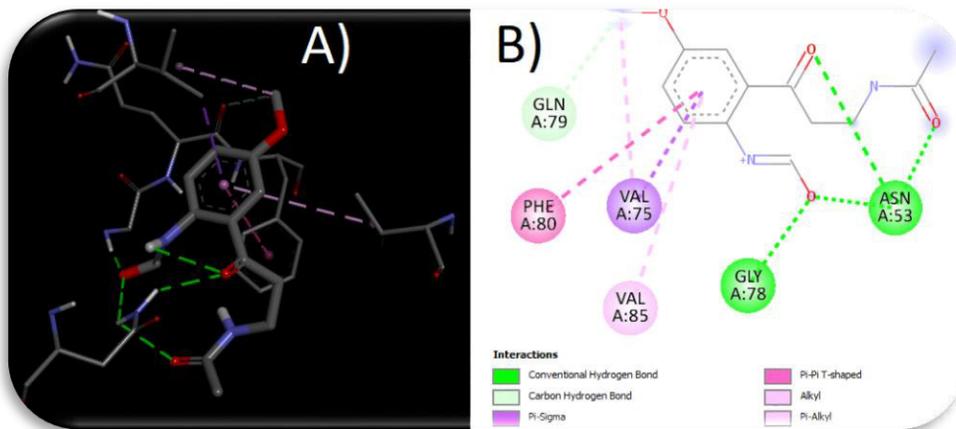


Figura 60. Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK en modelo 3D A) y 2D B).

Por su parte, el docking dirigido mostró mejorar las afinidades respectivas de los modos de unión entre la citocina IL-13 y el ligando AFMK, el resultado se muestra en la figura 58 donde está presente el primer modo de unión el cual tiene la mejor energía de afinidad con un valor de -5.8 kJ/mol. Así también la figura 59 presenta las superficies de interacción entre ambas especies, en este caso el ligando AFMK resulta estar rodeado entre los diferentes ligandos de la macromolécula, por tanto, la superficie electrostática cubre el ligando teniendo escasas zonas con carga, salvo aquellas donde hay una densidad positiva debido a los puentes de hidrógeno y una zona con carga negativa debido al grupo metoxilo, aunque ambas zonas son muy poco densas. Por otro lado, la zona hidrofóbica en color café muestra una mayor densidad al ser formada por las interacciones de tipo alquilo e interacciones pi.

Al igual que sucedió con la citocina IL-18, AFMK presenta una gran cantidad de interacciones al mejorar los resultados de afinidad con el docking dirigido, entre las interacciones formadas están

aquellas no covalentes correspondientes a efectos hidrofóbicos del sistema pi del AFMK con los enlaces sigma de VAL75 a una distancia de 3.62 Å, así como con los grupos alquilo de la VAL85 a 5.35 Å de distancia, por otro lado la densidad pi del AFMK forma una interacción de traslape con la densidad de la PHE80 a 4.60 Å de distancia y por último interacciones hidrofóbicas entre los grupos alquilo del metilo terminal del grupo metoxilo del AFMK y VAL75 con una distancia de 4.63 Å. Por su parte los puentes de hidrógeno están presentes en gran cantidad al tener inclusive un puente de tipo intramolecular de 2.94 Å entre el oxígeno del grupo carbonilo y los hidrógenos del grupo amida del AFMK, este inusual puente puede tener su origen en la compresión que sufre el ligando al ser rodeado por la citocina IL-13. Además, se tienen otros puentes de hidrogeno de tipo intermolecular como aquel formado por el oxígeno del grupo metoxilo del AFMK con los residuos GLY78 y ASN53 a una distancia de 1.99 Å y 2.94 Å, así como ángulos de 113.6 ° y 93.58 ° respectivamente, otro puente de hidrógeno presente es aquel formado entre el residuo ASN53 con oxígenos tanto del grupo carbonilo como del grupo amida del AFMK a distancias de 2.46 Å y 2.80 Å, así como ángulos de 132.44° y 95.38° respectivamente.

### 7.2.13 Interacciones: IL-13 con 3OHM

Por último, se realizó un análisis de acoplamiento molecular entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM por medio de un docking ciego para conocer el posible sitio de unión entre ambas especies, obteniéndose así las 9 mejores poses de unión. La figura 61.A muestra la pose de unión con mayor afinidad y que de igual manera comparte ubicación con otras 4 poses más, las cuales presentan energías de afinidad similares, menores a -6.0 kJ/mol. Por otro lado, *Proteins Plus* muestra en la figura 61.B el sitio de mayor capacidad farmacológica que coincide con el sitio de unión dado por AutoDock Vina y que se señala con una malla de color amarillo, de igual manera los residuos que conforman dicha cavidad se visualizan en color naranja, mientras que en color blanco aquellos que se encontraron interactuando con el ligando, entre ellos están ASN38, ASP87, THR88, GLU49 entre otros y que serán utilizados para el docking dirigido.



Figura 61. Resultado del docking ciego entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.

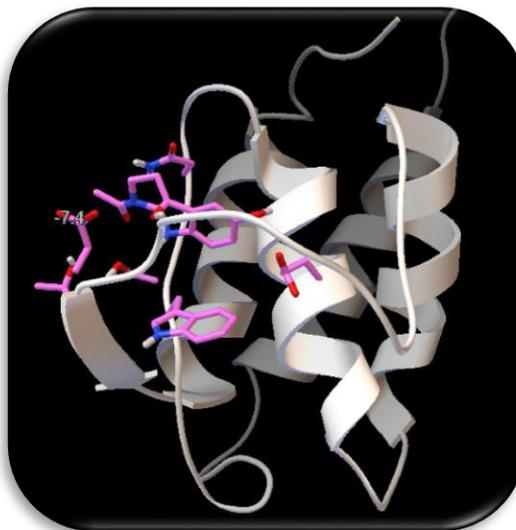


Figura 62. Primera pose resultante del docking flexible entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM.

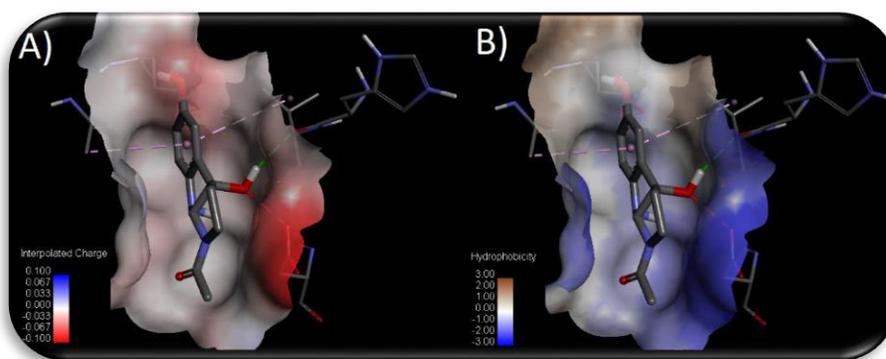


Figura 63. Superficies de interacción entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

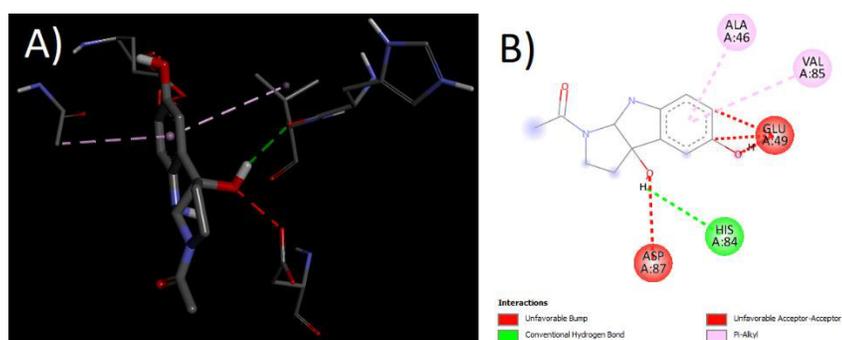


Figura 64. Interacciones detectadas entre la citocina IL-13 y el ligando 3OHM en modelo 3D A) y 2D B).

El *docking* dirigido y con residuos flexibilizados mejora ligeramente los valores de afinidad entre la citocina IL-13 y el metabolito 3OHM al menos para las 5 primeras poses de unión, en la figura 62 se muestra la primera pose de unión con la mejora afinidad y cuyo valor es de -7.4 kJ/mol. Así mismo en la figura 63.A se muestra la superficie de interacción electrostática entre ambas especies, es notoria la presencia de zonas con alta densidad de carga negativa debido a la cercanía de grupos con pares libres de electrones. Mientras que la superficie de interacción hidrofóbica se muestra en la figura 63.B y que predominantemente posee zonas lipofílicas que concuerdan con las densidades negativas de la superficie electrostática debido a las especies negativamente cargadas con cercanía.

Dentro de las interacciones no covalentes que se forman entre el ligando 3OHM y la macromolécula IL-13, se tienen aquellas resultantes de la presencia del grupo aromático del ligando 3OHM con las cadenas alquilo de VAL46 y VAL85 a distancias de 4.44 Å y 5.14 Å respectivamente. Además, se tiene la formación de un puente de hidrógeno entre el hidrógeno perteneciente al grupo funcional alcohol del ligando y el oxígeno carbonilo de HIS84 que forma un ángulo de 121.78 ° a una distancia de 2.42 Å. Por otro lado, a pesar de que 3OHM muestra los mejores valores de afinidad, se advierten una cantidad variada de interacciones no favorables debido a su estructura conformado por 3 oxígenos diferentes, generando entonces una repulsión electrostática con ASP87 y GLU49, este último residuo muestra también problemas debido a la cercanía con la densidad pi del ligando, por lo cual es necesario reconsiderarlo como posible metabolito principal durante la unión con la citocina IL-13.

Tabla 4 Resumen de los residuos de la citocina IL-13 que interactúan con los diferentes ligandos durante el docking

Ligando	Afinidad de unión (kJ/mol)	Aminoácidos interactuantes y distancia (Å)		
		Puentes de hidrógeno	Interacción Hidrofóbicas	Interacción electrostática
<b>MT</b>	-6.9	GLN79(2.65) ASN38(≈2.7)	PHE80 (3.99)	-----
<b>AMK</b>	-7.0	ASN53(2.14), LYS89(2.29)	TRP35(3.91), TRP35' (4.29)	-----
<b>AFMK</b>	-5.8	GLY78(1.99), ASN53(2.94), ASN53' (2.46)	VAL75(3.62), VAL85(5.35), PHE80(4.60), VAL75' (4.63)	-----
<b>3OHM</b>	-7.4	HIS84(2.42)	VAL46(4.44), VAL85(5.14)	-----

## 7.2.14 Comparación IL-18 con IL-13

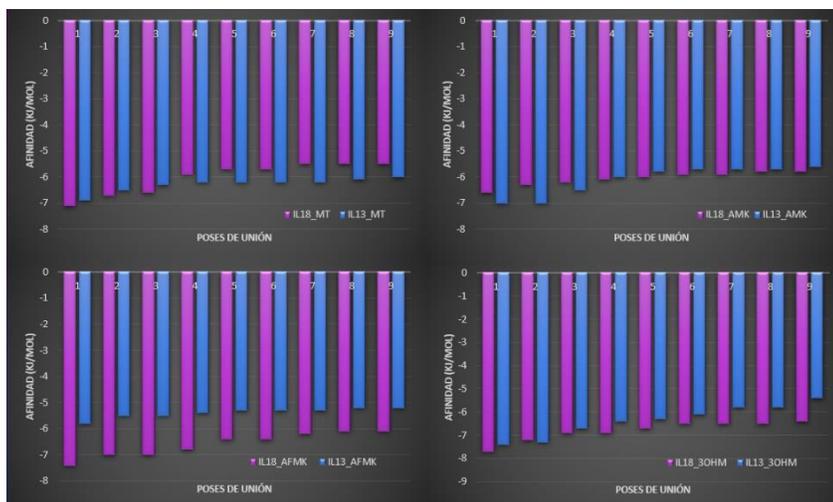


Figura 65. Comparación de afinidad entre la citocina IL-18 (morado) y la citocina IL-13 (Azul) con los ligandos MT y sus metabolitos activos. Datos de afinidad obtenidos mediante AutoDock Vina.

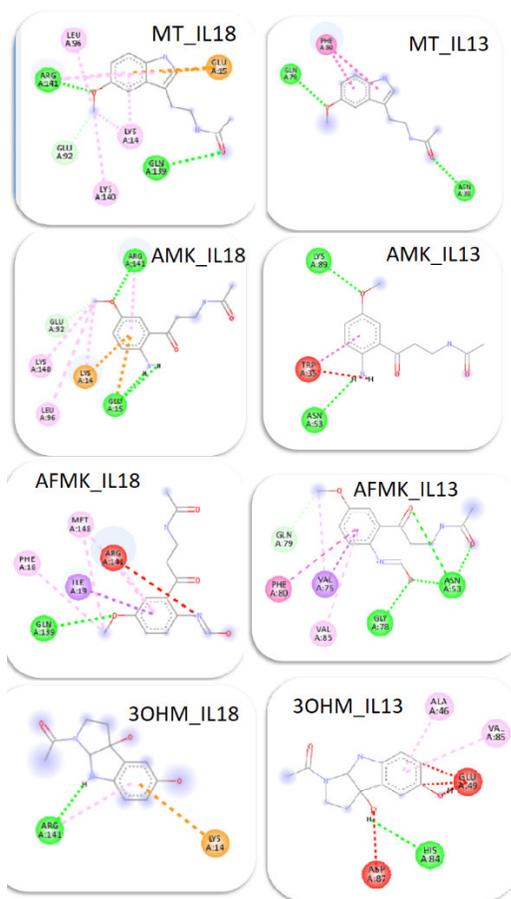


Figura 66. Comparación entre las interacciones detectadas resultantes entre la citocina IL-18 así como IL-13 con la MT y sus metabolitos activos.

Como se mencionó en el principio del capítulo se pretende comparar las afinidades de unión entre la MT y sus metabolitos activos con una citocina tanto proinflamatoria (IL-18) como antiinflamatoria (IL-13) con el fin de conocer la afinidad que tendrían los ligandos en el organismo. La figura 65 reúne las gráficas de afinidades comparativas entre ambas citocinas con los 4 ligandos distintos, por un lado, se tiene que la MT muestra un comportamiento equilibrado ya que algunas poses tienen afinidad mayor con IL-18 y otras por IL-13, no obstante, aquellas con mejor afinidad se inclinan por IL-18, por su parte AMK refleja un comportamiento inverso, siendo entonces que hay un equilibrio en la afinidad por ambas especies, pero, las mejores afinidades se inclinan ahora por IL-13. En cuanto al ligando AFMK, muestra una total preferencia por la citocina IL-18 al mantener una mejor afinidad para cada una de las poses de unión, mientras que 3OHM muestra una preferencia casi por completo por IL-18, siendo la segunda pose la única diferente, sin embargo, no muestra tan marcada diferencia como el ligando AFMK. Además, en la figura 66 se reúnen las imágenes de las interacciones detectadas entre las citocinas IL-18 e IL-13 con cada uno de los ligandos utilizados. En general la citocina IL-18 presenta mayor cantidad de interacciones no covalentes con todos los ligandos, así como una mayor variabilidad, al incluir interacciones de tipo electrostáticas como lo son el puente salino o de manera catiónica, mientras que IL-13 tuvo pocos residuos interactuantes e incluso mostró tener muchas interacciones no favorables con la estructura de la citocina.

La citocina IL-13 presentó una afinidad estable con la MT y sus metabolitos activos, dato que se observó en los estudios de acoplamiento, no obstante las interacciones que forma entre los ligandos y los residuos del sitio de unión son pocos y en algunos casos llegan a ver encuentros no favorables, si bien el sitio de unión fue homogéneo para todas las especies, algunas como el 3OHM tiene problemas debido a las zonas con densidad de carga negativa debido a los pares libres del oxígeno en su estructura. A diferencia de IL-18, la citocina IL-13 tiene mejor afinidad, así como interacciones con el ligando AMK mientras que ambas tienen buenos resultados de afinidad con 3OHM, pero pocas interacciones, en general es posible concluir que la MT, así como sus metabolitos tendrán una predilección por unirse a la citocina proinflamatoria IL-18 debido a la afinidad de sus metabolitos activos, así como a la calidad de sus interacciones no covalentes.

## 7.2.15 Estudios *docking*: MCP-1 con MT y sus metabolitos activos

Al igual que las citocinas existen otras proteínas que son secretadas y que participan en el proceso inflamatorio, una de las especies químicas usualmente reportada en múltiples estudios es la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). Dicha proteína pertenece al grupo de las quimiocinas, familia de polipéptidos de bajo peso molecular y cuya función general es regular procesos celulares<sup>98</sup>. Como su nombre lo indica tiene la capacidad de desencadenar la migración de monocitos así como regular la respuesta inmune en los sitios de inflamación<sup>48</sup>. Su respuesta se desencadena debido a la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-1 así como IL-18, en los sitios donde ocurre una lesión. Así entonces, la MCP-1 regula los procesos de atracción de monocitos así como células T activadas, de igual manera es la encargada de la inducción de los procesos de adhesión de

los monocitos a la superficie endotelial<sup>99,100</sup>. Por lo anterior se estudiará la interacción de la quimiocina MCP-1 con la MT, así como sus metabolitos activos para determinar posibles interacciones con otras especies presentes durante el proceso de la inflamación en el daño renal agudo.

Así como se procedió con IL-18 e IL-13 se estudiará la afinidad de la proteína MCP-1 con la MT y los metabolitos por medio del acoplamiento molecular utilizando el software AutoDock 4.2 y AutoDock Vina, así como el uso del servidor *Proteins Plus* para conocer y caracterizar el sitio de unión conforme a los resultados del acoplamiento molecular. Por un lado, la proteína MCP-1 se obtendrá de la base de datos PDB cuyo código es 4DN3, mientras que, para los ligandos serán utilizados los ya optimizados y que previamente se han usado con los acoplamientos ya descritos.

Primero se realizó un docking ciego para conocer los posibles sitios de unión entre ambas especies, tomando en cuenta los resultados se podrá indicar cual es el sitio con mayor afinidad y posteriormente realizar un docking dirigido. Se utilizó un tamaño de caja suficiente para contener a toda la proteína, se usó un parámetro de búsqueda de tipo algoritmo genético y se realizó un número de evaluaciones exhaustiva de  $2.5 \times 10^6$ .

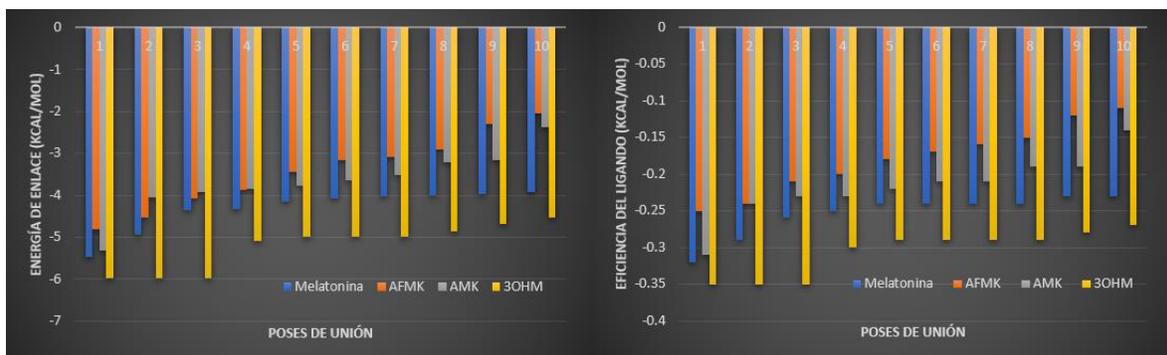


Figura 67. Energía de enlace (izquierda) y eficiencia del ligando (derecha) entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos, datos obtenidos por acoplamiento molecular mediante un *docking* ciego.

El resultado del acoplamiento molecular confirma que la afinidad por los ligandos de la MCP-1 al igual que las citocinas presenta energías de interacción estables. En la figura 67 (izq.) se advierten los resultados para la energía de enlace resultante de las suma tanto de interacciones favorables como aquellas no favorables durante la unión de la macromolécula con el ligando, para las 10 poses de unión obtenidas se observan valores negativos, valores que reflejan la estabilidad del sistema, respecto a la primera pose se observa que existe una mayor energía de enlace en la unión con el ligando 3OHM con un valor de -5.98 kcal/mol, después se encuentra la MT con -5.46 kcal/mol, posteriormente el ligando AMK con -5.32 kcal/mol y al final se tiene al AFMK con -4.82 kcal/mol. De manera general, 3OHM posee las mejores energías de enlace con respecto a todos los modos de unión obtenidos, teniendo ligeras variaciones entre los grupos de poses, seguido se tiene la MT con un comportamiento similar al tener pocos cambios a lo largo de las poses correspondientes, ambos casos es necesario tomarlos en cuenta respecto a la decisión del sitio de unión puesto que las variaciones de energías entre poses resultan lo suficientemente pequeñas para considerar posible

cualquiera de las poses. AMK y AFMK tienen comportamientos similares entre ellos, tienen energías que decaen más rápido a lo largo de las diferentes poses e incluso hay modos de unión en los cuales intercambian lugar respecto a energía más estable.

En cuanto a la eficiencia del ligando que se observa en la figura 67 (dcha.) no se muestran cambios importantes respecto a los ya descritos en la energía de unión, tanto 3OHM como MT tienen las mejores eficiencias con valores de  $-0.35$  kcal/mol y  $-0.32$  kcal/mol respectivamente, seguido está AMK con  $-0.31$  kcal/mol y después AFMK con  $-0.25$  kcal/mol, esto respecto a la primera pose, mientras que el comportamiento general no revela cambios respecto a los ya mencionados, salvo por una total superioridad de AMK frente AFMK.

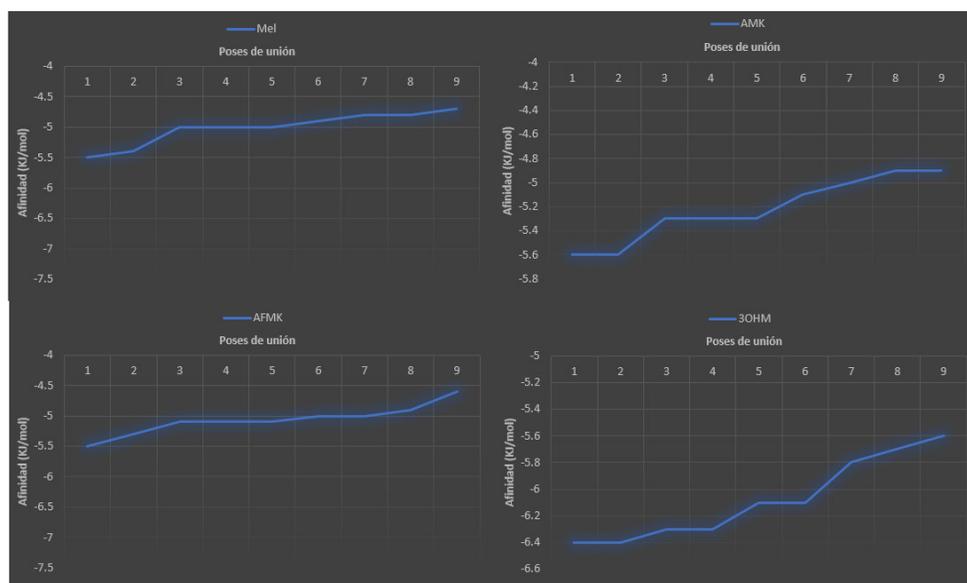


Figura 68. Energías de afinidad para el acoplamiento entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidas mediante un proceso de docking ciego.

De manera análoga se realizó el acoplamiento molecular entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT, AMK, AFMK y 3OHM para conocer los resultados de afinidad entre ambas especies. Se realizó un docking ciego con un tamaño de caja suficiente para contener a la macromolécula, el parámetro de búsqueda fue de un algoritmo genético y se utilizó un número de evaluaciones exhaustiva de  $2.5 \times 10^6$ . Los resultados se muestran en la figura 68 que contiene los resultados de afinidad para los 4 ligandos, los resultados coinciden con los de AutoDock al indicar que todos los complejos formados poseen una energía estable. Respecto a la primera pose de unión 3OHM mantiene el valor de energía menor (más estable) con un valor de  $-6.4$  kJ/mol, seguido se tiene al ligando AMK con  $-5.6$  kJ/mol, y de manera consecuente tanto MT como AFMK con afinidades de  $-5.5$  kJ/mol en ambas especies. En cuanto al comportamiento tomando en cuenta todas las poses de unión, 3OHM mantiene la mejor afinidad en general, hasta la séptima pose donde adquiere valores cercanos al resto de ligandos, por su parte los tres ligandos restantes poseen afinidades muy similares rondando valores que van desde  $-5.5$  kJ/mol hasta  $-5.0$  kJ/mol aproximadamente. Este primer resultado nos indica que pudiera no haber preferencia alguna sobre los ligandos AMK, AFMK y MT mientras que 3OHM, como en el caso de las citocinas, mantiene energías de interacción mejores con la macromolécula.

## 7.2.16 Docking dirigido y flexible de la quimiocina MCP-1

Conforme a los resultados obtenidos durante el docking ciego se realizó un estudio de acoplamiento mediante un docking dirigido y flexibilizando determinados residuos de la macromolécula MCP-1 que se observaron interactúan con el ligando. Posteriormente los resultados fueron usados para caracterizar el sitio de unión mediante el servidor Proteins Plus. El tamaño de caja fue el suficiente para contener a los ligandos flexibilizados, los cuales están en función de los resultados de cada ligando, el parámetro de búsqueda fue de tipo algoritmo genético y se usó un número de evaluaciones exhaustiva de  $2.5 \times 10^6$ .

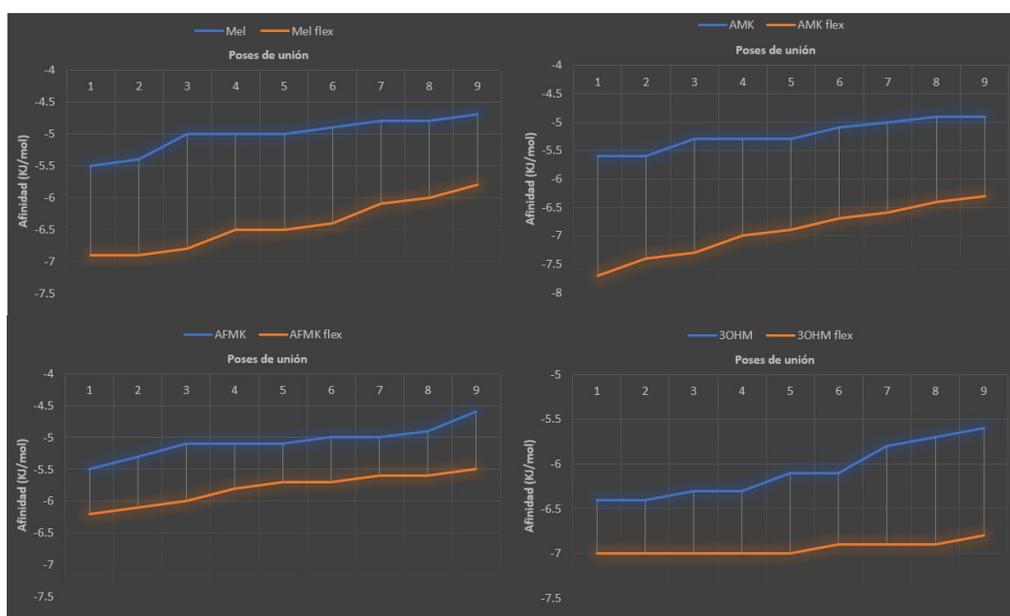


Figura 69. Energías de afinidad para docking ciego (azul) y docking dirigido y flexible (naranja) entre la quimiocina MCP-1 y los ligandos MT y sus metabolitos activos obtenidos mediante AutoDock Vina.

Una vez realizado el docking dirigido se graficó los resultados y se compararon con las afinidades obtenidas del docking ciego, el resultado se muestra en la figura 69 que reúne ambas afinidades de los respectivos 4 ligandos con la quimiocina MCP-1. El docking dirigido y en el cual se han flexibilizado algunos residuos de la macromolécula presenta mejores energías de afinidad para todos los ligandos así como para cada una de las poses mostradas, así también se muestra un comportamiento diferente siendo ahora el ligando AMK quién tiene la mejor afinidad con un valor de  $-7.7$  kJ/mol, seguido está tanto el 3OHM como la MT con energías de  $-7.0$  kJ/mol y  $-6.9$  kJ/mol respectivamente y finalmente se tiene al metabolito AFMK con  $-6.2$  kJ/mol, esto con respecto a la primera pose obtenida. En cuanto a comportamiento general, 3OHM muestra tener una energía de afinidad poco variable, situándose la mayoría de sus poses en  $-6.9 \pm 1$  kJ/mol, seguido se encuentra el AMK cuya energía prevalece para la mayoría de sus poses mayor o igual a  $-7.0$  kJ/mol siendo estos

ligandos los más atractivos energéticamente para la formación del complejo, no obstante, es necesario analizar las posibles interacciones formadas

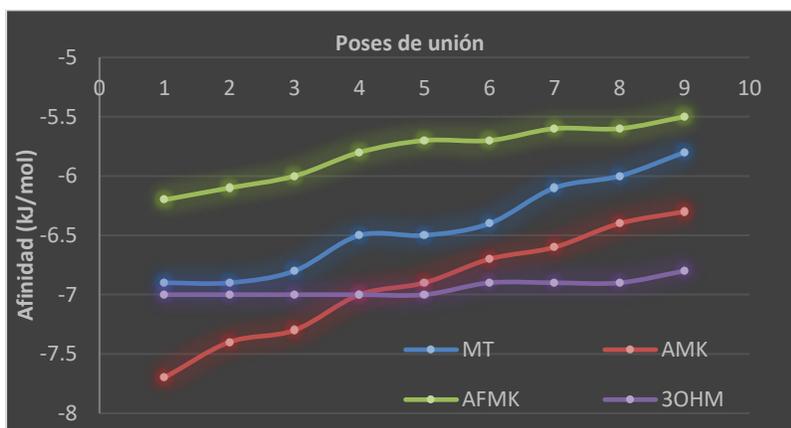


Figura 70. Gráfica comparativa de afinidad entre la quimiocina MCP-1 y la MT, así como sus metabolitos.

De manera complementaria se muestra en la figura 70 una gráfica comparativa entre las afinidades de los 4 ligandos, cada uno posee mejor afinidad en el proceso del docking dirigido. Por su parte AMK mantiene para las primeras 3 poses la mejor afinidad con respecto a los restantes 3 ligandos y justo en la cuarta pose empata energía con 3OHM posteriormente decae al segundo lugar. 3OHM muestra un comportamiento inusual al tener pocas variaciones en lo que respecta a su energía, se observa que las poses de unión se encuentran todas en la misma cavidad y que solo se modifica la orientación en cada una de las poses resueltas. Por su parte, tanto MT como AFMK muestran un comportamiento similar, al tener pequeñas disminuciones conforme aumentamos el número de la pose y ambos se localizan con menor energía que AMK y 3OHM.

## 7.2.17 Interacciones: MCP-1 con MT

Respecto al sitio de unión entre la quimiocina MCP-1 y ligando MT, se analizó las posibles cavidades en las cuales puede unirse el ligando a la macromolécula, la figura 71.A muestra el resultado de la primera pose de la unión obtenida, dicha cavidad se comparte con otras 3 poses más. De las 4 poses que comparten la cavidad, 3 de ellas tienen energías igual o superior a -5.4 kJ/mol, por otro lado, existe otra cavidad que alberga 2 poses diferentes, ambas con energías de -5.0 KJ/mol. Tomando en cuenta que AutoDock vina tiene un error aproximado de  $\pm 0.2$  kJ/mol ambas cavidades tienen potencial para ser el sitio de unión, sin embargo, es evidente que una de ellas tiene más poses, así como una mejor energía de afinidad para ellas. Por otro lado, al analizar ambas cavidades por medio del servidor Proteins Plus, se observa como la primera cavidad mencionada (aquella con 4 modos de unión) tiene un potencial farmacológico de 0.81, un área de  $1\,368.35 \text{ \AA}^2$  así como un volumen de  $977.06 \text{ \AA}^3$ . Así mismo la segunda cavidad (aquella con 2 modos de unión) tiene un potencial farmacológico de 0.83, un área de  $1\,301.23 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $842.21 \text{ \AA}^3$ . La segunda cavidad a pesar de tener un potencial farmacológico mayor, muestra un menor espacio para la unión con posibles ligandos, este es un factor importante a considerar debido tanto a efectos de

impedimento estérico, así como interacciones electrostáticas no favorables. Debido a lo anterior se usará la primera cavidad (4 poses) para realizar el estudio de acoplamiento dirigido y cuyo volumen se muestra en la figura 71.B por medio de una malla de color amarillo, así también se muestran residuos que se encontraron interactúan con MT entre los cuales encontramos ARG45, LEU46, ASP105 y TRP107.

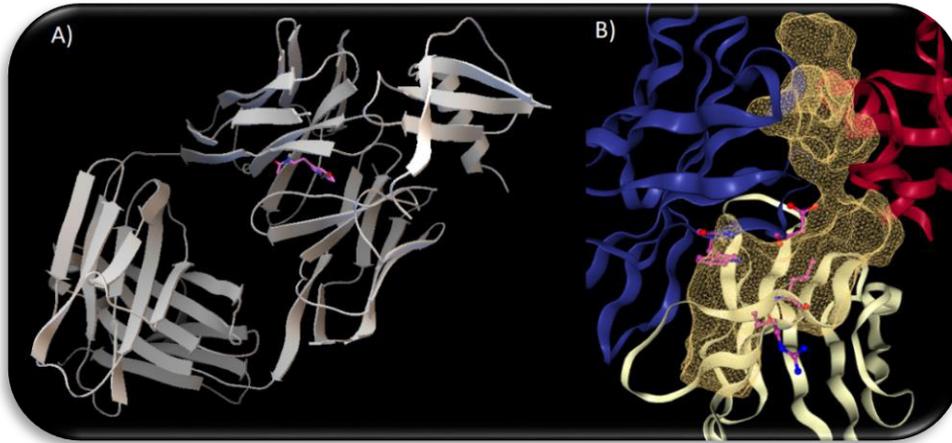


Figura 71. Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus. Se advierte como ambas cavidades coinciden.



Figura 72. Docking obtenido del acoplamiento flexible y dirigido entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT.

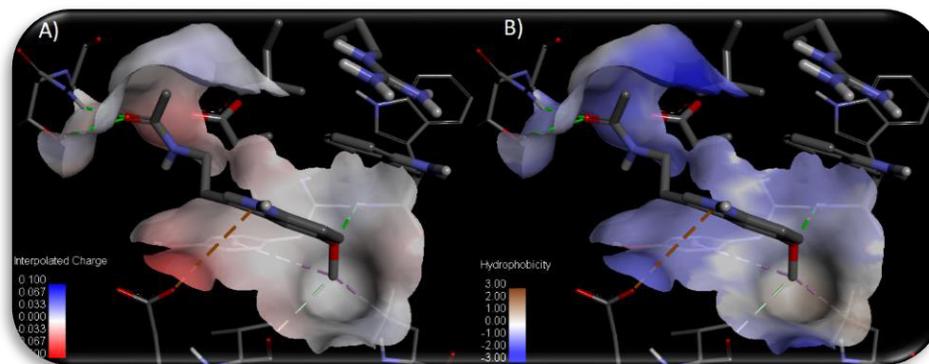


Figura 73. Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

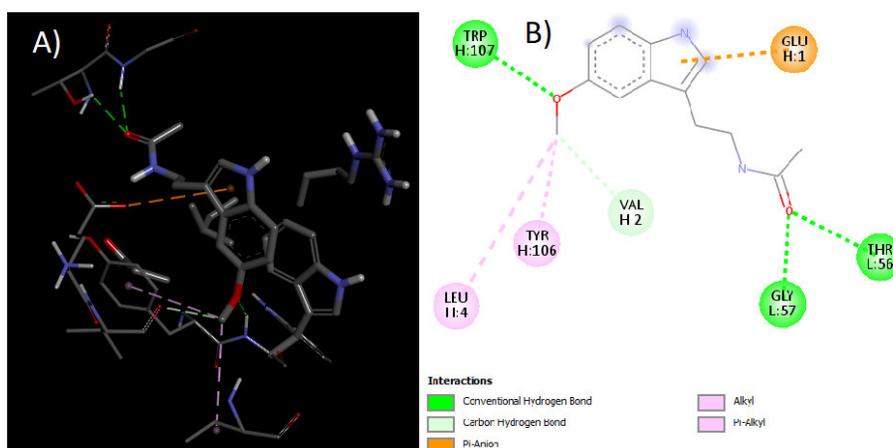


Figura 74. Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando MT en A) modelo 3D y B) modelo 2D.

Tras realizar el acoplamiento dirigido, las energías de afinidad mejoraron para el ligando MT como ya se ha mencionado previamente, el resultado de dicho acoplamiento con la quimiocina MCP-1 se muestra en la figura 72 y que tiene al ligando en la primera pose de unión, aquella con mejor afinidad. Además, en la figura 73.A se advierte la superficie de interacción electrostática del ligando MT originado por la interacción con los residuos de MCP-1, es de notar la presencia de zonas con densidad negativa cuyo origen se debe a los residuos con oxígeno provenientes de la MCP-1, así como el oxígeno carbonilo de la MT. Por otro lado, la figura 73.B muestra la superficie de interacción hidrofóbica entre ambas especies, aquí es notorio la generación de áreas lipofílicas que rodean casi en su totalidad al ligando a excepción de aquellas pequeñas zonas donde coexisten distintas interacciones no covalentes.

Las posibles interacciones que se generan al unirse el ligando MT con la macromolécula MCP-1 se observan en la figura 74 dentro de la cual se ubican interacciones hidrofóbicas como la interacción Alquilo entre el grupo metoxilo de la MT y el residuo LEU4 a una distancia de 4.77 Å y la interacción de tipo  $\pi$ -alquilo entre el metoxilo ya mencionado y el sistema aromático de la TYR106 a 4.83 Å de distancia. Por otro lado, tenemos la formación de una interacción de tipo electrostática entre el sistema aromático de la MT y la densidad positiva del GLU1 encontrándose a una

distancia de 4.81 Å. Así mismo se tiene la posible formación de tres puentes de hidrógeno, dos de ellos con el oxígeno carbonilo de la MT como grupo aceptor y los hidrógenos de GLY57 y THR56 a distancias de 2.18 Å y 2.62 Å, así como ángulos de 150.96 ° y 77.22° respectivamente. Mientras que el último puente de hidrógeno se forma con el oxígeno éster de la MT con el residuo TRP 107 a 2.36 Å de distancia y un ángulo de 136.12 °.

## 7.2.18 Interacciones: MCP-1 con AMK

De manera análoga se procedió a realizar un docking ciego para el ligando AMK con la quimiocina MCP-1 cuyo resultado se muestra en la figura 75.A en donde es posible ver la pose de unión número 2, en este caso tanto la primera como la segunda pose de unión mantenían una misma afinidad de -5.6 kJ/mol, no obstante, la segunda pose comparte cavidad con otras dos poses más cuya energía es de -5.3 kJ/mol a diferencia de la primera pose que no repite ningún otro modo de unión. Además, al analizar la cavidad de unión mediante Proteins Plus, se advierte una nueva superficie de contacto para la primera pose, la cual tiene un DD=0.73 mientras que la cavidad de la pose número 2 tiene un DD=0.81 y justamente coincide con aquella preferida por el ligando MT. Por todo lo anterior se conservará la cavidad de la segunda pose de unión para realizar el docking flexible y dirigido.

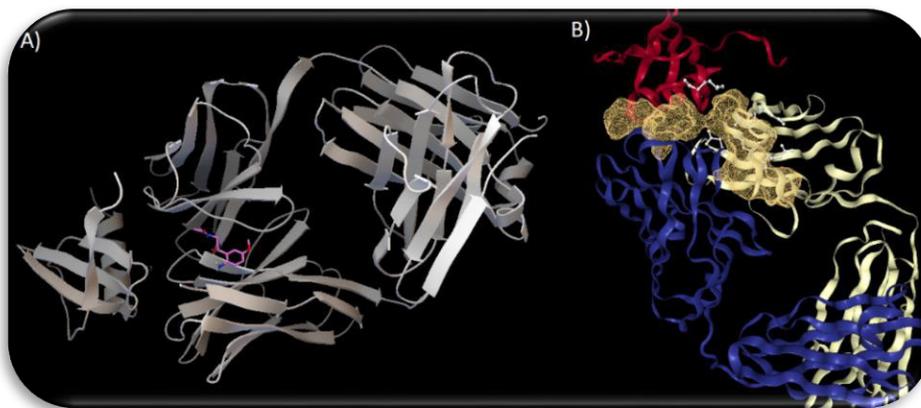


Figura 75. Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización con afinidad obtenida en AutoDock Vina. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.

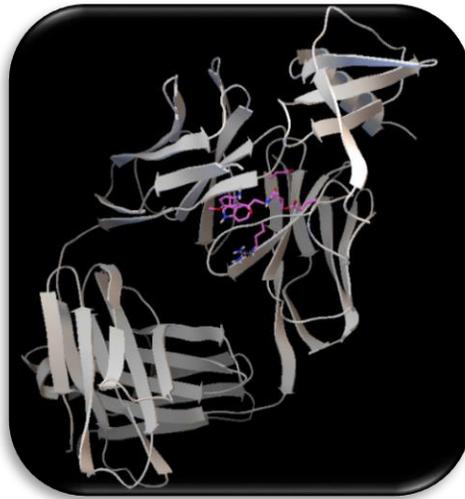


Figura 76. Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK

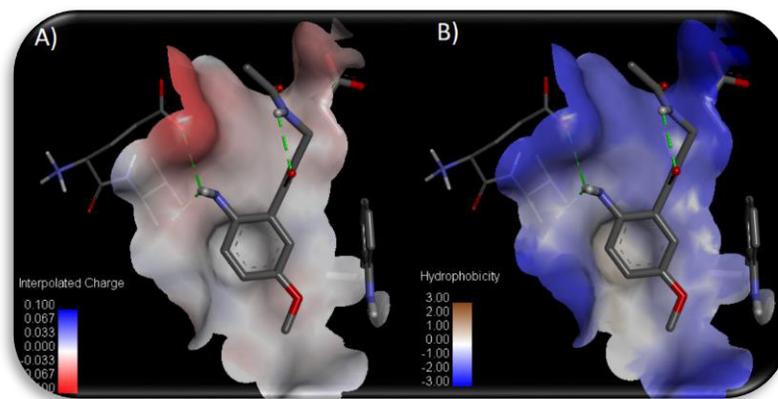


Figura 77. Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica

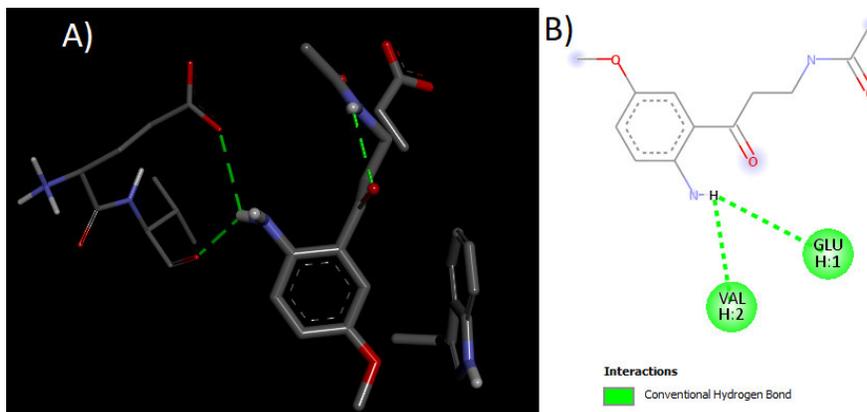


Figura 78. Interacciones detectadas entre la citocina MCP-1 y el ligando AMK en modelo 3D A) y 2D B).

El resultado del docking dirigido entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AMK se muestra en la figura 76 donde es posible observar la primera pose de unión con algunos de los residuos con los cuales interactúa el ligando. Posteriormente se identificaron las superficies de interacciones generadas de la unión entre ambas especies y cuyo resultado se observa en la figura 77, por un lado la superficie electrostática muestra distintas zonas con densidad negativa procedente en general del par libre de electrones de los oxígenos tanto de la macromolécula como de AMK. Mientras que la superficie hidrofóbica muestra una predominante zona lipofílica con respecto al ligando. En cuanto a las interacciones detectadas, en la figura 78 se tiene la presencia de 2 puentes de hidrógeno justo localizados entre el hidrógeno del grupo amino del AMK con oxígenos pertenecientes a los residuos VAL2 y GLU1 que se forman a 2.25 Å y 2.82 Å de distancia así como ángulos de 158.18 ° y 129.14° respectivamente.

## 7.2.19 Interacciones: MCP-1 con AFMK

El ligando AFMK se estudió mediante acoplamiento molecular para determinar el sitio de unión, así como la afinidad de dicho ligando con la proteína MCP-1 y cuyo resultado se presenta en la figura 79.A, aquí se presenta la primera pose de unión, aquella que presentó una mejor afinidad y que se ubica en una cavidad que comparte con otras 3 poses distintas, dos de ellas con energía mayor o igual a -5.0 kJ/mol mientras que las restantes 5 poses se distribuyen en diferentes sitios de la proteína. Posteriormente se identificó dicha cavidad por medio del servidor Proteins Plus donde se observó coincide con las cavidades de MT y AMK dando entonces una buena indicación de la afinidad de dicho sitio de unión con este tipo de ligandos ergo, comparte las mismas características ya mencionadas previamente. La figura 79.B muestra la cavidad correspondiente mediante una malla en color amarillo y donde se han remarcado en color rosa algunos de los residuos que interactúan con el ligando como LEU46, TRYP107, TYR106 y ASP105.

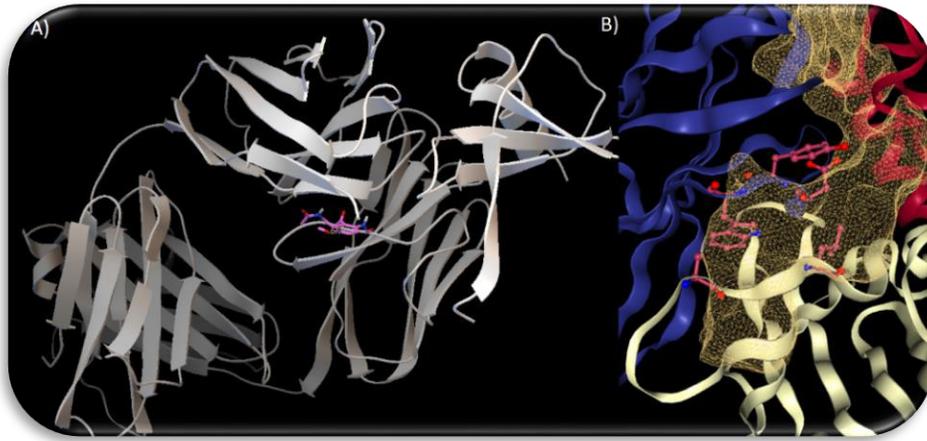


Figura 79. Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidad de mayor capacidad farmacológica obtenida en ProteinPlus.

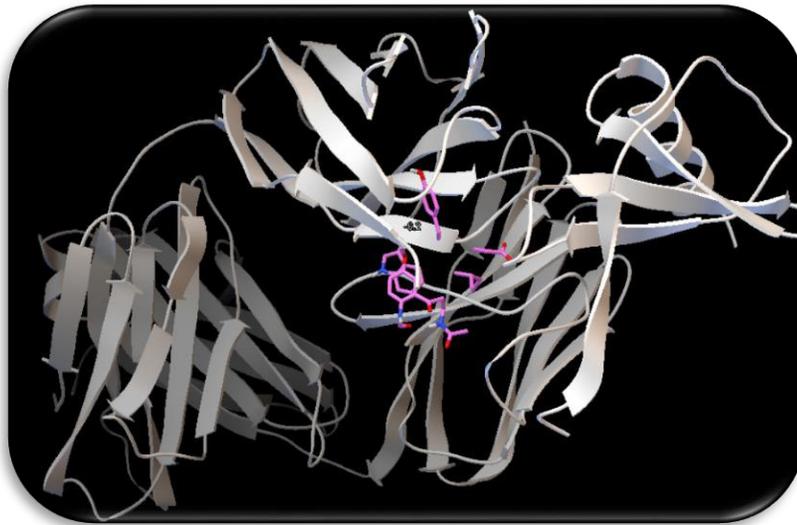


Figura 80. Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK.

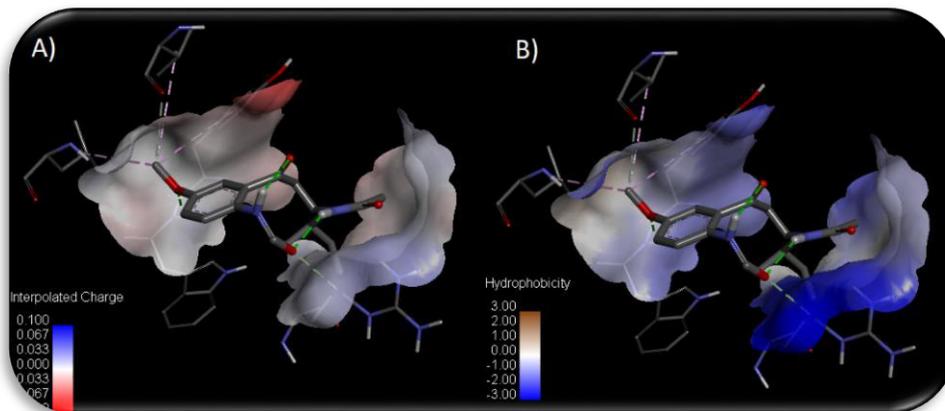


Figura 81. Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

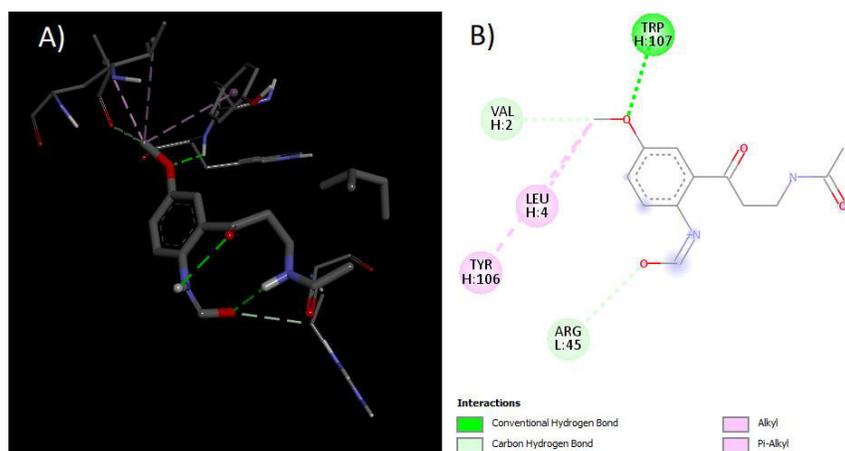


Figura 82. Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando AFMK en modelo 3D A) y 2D B).

Posterior a los resultados del primer acoplamiento realizado se obtuvieron los modos de unión entre el metabolito AFMK y la quimiocina MCP-1 mediante un docking dirigido y flexible, la imagen del complejo formado, así como su primera pose se presenta en la figura 80, posteriormente se tienen las superficies de interacción tanto electrostática como hidrofóbica de dicha unión (fig. 81). El acoplamiento entre ambas especies da como resultado algunas zonas con densidad de carga negativa debido a los electrones libres de los oxígenos presentes en AFMK, mientras que hay una zona con densidad de carga positiva resultante de la presencia de grupos aminos de los residuos de la macromolécula. Además, se tiene la presencia de una superficie predominantemente lipofílica con los residuos de la MCP-1 y que envuelven al ligando AFMK.

Una de las ya recurrentes características del metabolito AFMK es su capacidad de formar múltiples interacciones no covalentes con los residuos del sitio donde se acopla. Se observan en la figura 82 las posibles interacciones formadas entre la macromolécula MCP-1 y el ligando AFMK entre las cuales se encuentran las interacciones de tipo pi-alkilo entre el sistema aromático de la TYR106 y el carbono del metoxilo del AFMK a una distancia de 4.80 Å, además se tiene la interacción alkilo entre los grupos isobutilo e isopropilo de los residuos LEU4 y Val2 respectivamente con el carbono metoxilo previamente mencionado, dichas posibles interacciones se encuentran a una distancia de 4.55 Å y 5.22 Å respectivamente. Otras de las interacciones formadas son aquellas de tipo puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo metoxilo del ligando como grupo aceptor y el hidrógeno de TRP107 a distancia de 2.30 Å y formando un ángulo de 130.16°.

## 7.2.20 Interacciones: MCP-1 con 3OHM

Finalmente se realizó un análisis de acoplamiento molecular entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM utilizando una metodología de docking ciego y cuyo resultado se muestra en la figura 83.A en donde se visualiza la primera pose de unión correspondiente a una energía de  $-6.4$  kJ/mol. El lugar donde el ligando se acopló a la macromolécula es compartido por otras dos poses de unión ambas con energía de  $-6.1$  kJ/mol, mientras que existe otra cavidad en donde se encuentran otros tres modos de unión, pero cuya energía ronda alrededor de los  $-5.8$  kJ/mol. Para discernir entre ambas posibles cavidades se utiliza Proteins Plus, el cual nos indica que la cavidad de las primeras 3 poses mencionadas tiene una  $DD=0.83$  mientras que la segunda cavidad tiene  $DD=0.81$  no obstante, esta última posee mayor superficie de interacción, así como también coincide con el resultado del resto de los ligandos, teniendo así una misma cavidad para la MT y sus metabolitos, por lo cual se ha elegido la segunda cavidad como aquella para definir el docking dirigido.

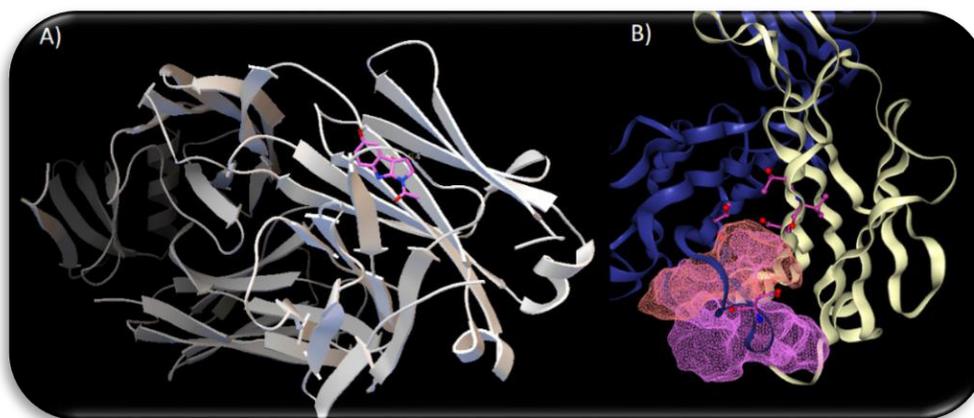


Figura 83. Resultado del docking ciego entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM. Se muestra la cavidad donde se ubicó el modo de unión de mayor afinidad. A) Visualización Obtenida en AutoDock. B) Cavidades donde se ubicó la unión del ligando con la quimiocina MCP-1.

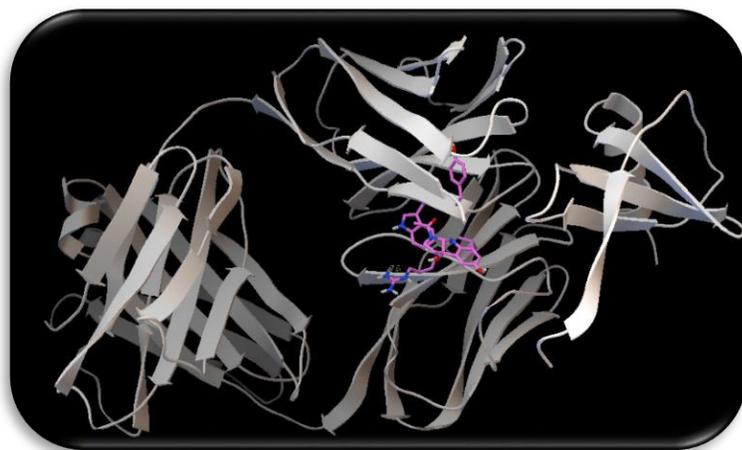


Figura 84. Primera pose resultante del docking flexible entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM.

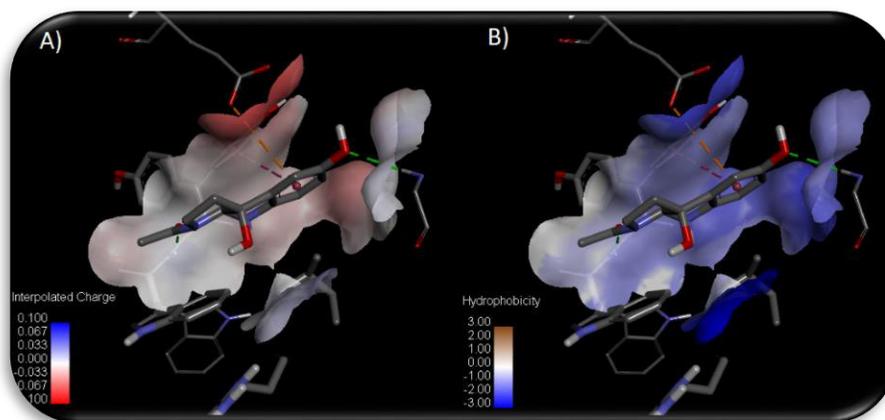


Figura 85. Superficies de interacción entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM. A) Superficie electrostática y B) superficie hidrofóbica.

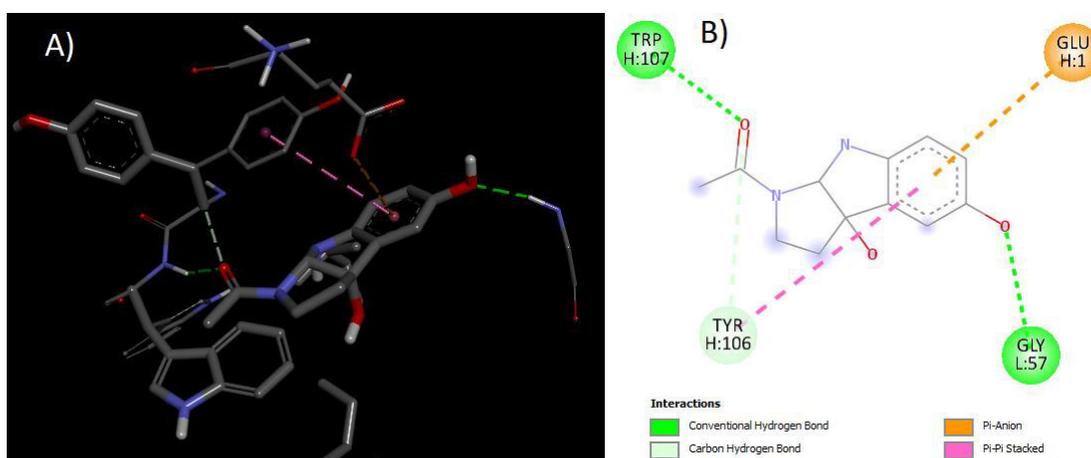


Figura 86. Interacciones detectadas entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM en modelo 3D A) y 2D B).

Al realizar el *docking* dirigido se mejoró los valores de afinidad para el ligando y la macromolécula, así como se definieron mejor las poses de unión entre ambos, el resultado del *docking* dirigido entre la quimiocina MCP-1 y el ligando 3OHM se muestra en la figura 84. Por otro lado, en la figura 85.A se presenta la superficie de interacción electrostática donde se observa poca variabilidad de carga a excepción de la zona donde se encuentra el anillo de benceno del 3OHM y que comparte cercanía con oxígenos de residuos cercanos produciendo así una zona con densidad de carga negativa. Además, en la figura 85.B se tiene la superficie de interacción hidrofóbica donde claramente se observa una mayor generación de zonas lipofílicas como resultado de la unión entre la MCP-1 y el metabolito 3OHM.

También se presentan las posibles interacciones resultantes de la formación del complejo en la figura 86, dentro de las interacciones no covalentes formadas, se tienen aquellas que generan la densidad de carga negativa y que son producto de una traslape de orbitales pi entre las zonas ya indicadas, dicha interacción prevalece a una distancia de 5.02 Å con el residuo TYR106. Además, se tiene la formación de una interacción de tipo pi anión con el sistema aromático del ligando y el

residuo GLU1 a una distancia de 4.57 Å. Así también encontramos la formación de puentes de hidrógeno correspondientes al oxígeno del grupo alcohol del 3OHM con el hidrógeno de la amina perteneciente a GLY57 a una distancia de 2.54 Å y formando un ángulo de 125.9 °, otro puente de hidrógeno se forma con el oxígeno de tipo carbonilo del 3OHM con el hidrógeno del grupo amina del TRP107 a distancia de 2.29 y con un ángulo de 150.88°.

**Tabla 5 Resumen de los residuos de la quimiocina MCP-1 que interactúan con los diferentes ligandos MT y sus metabolitos activos durante el docking**

Ligando	Afinidad de unión (kJ/mol)	Aminoácidos interactuantes y distancia (Å)		
		Puentes de hidrógeno	Interacción Hidrofóbicas	Interacción electrostática
<b>MT</b>	-6.9	GLY57(2.18) THR56(2.62) TRP107(2.36)	LEU4 (4.77) TYR106(4.83)	GLU1(4.81)
<b>AMK</b>	-7.7	VAL2(2.25), GLU1(2.82)	-----	-----
<b>AFMK</b>	-6.2	TYR106(4.80), LEU4(4.55), VAL2(5.22)	TRP107(2.30)	-----
<b>3OHM</b>	-7.0	TYR106(5.02)	GLY57(2.54), TRP107(2.29)	GLU1(4.57)

La formación de complejos entre la quimiocina y la MT, así como con sus metabolitos activos generó estructuras energéticamente estables lo cual indica la posibilidad de que cualquiera de los ligandos pueda interaccionar con la quimiocina MCP-1 y pueda afectar la adhesión de monocitos, no obstante, aún se requieren más estudios para determinar una posible vía de modificación a la quimiocina. Por otra parte, se observa como el ligando 3OHM mantiene con cualquiera de las macromoléculas una mejor energía de afinidad, aunque no la generación de interacciones que puedan mantener dicha unión, mientras que AFMK resulta ser la especie con mayor número de interacciones posibles con cualquiera de las 3 macromoléculas. Otro detalle importante es la superficie de interacción que se forma entre los complejos de la MCP-1 dado que todos ellos poseen un poco de densidad de carga, así como una total dominación de superficies lipofílicas. Estos estudios ayudarán a comprender mejor la capacidad de la MT, así como sus metabolitos de unirse a proteínas involucradas en el proceso inflamatorio durante el daño renal agudo, así como abrir nuevas puertas para estudiar posibles vías metabólicas durante el proceso.

## 7.3 Docking: proteína-proteína

La interleucina 18 trabaja como una citocina proinflamatoria al formar un complejo con su receptor conocido como IL-18 receptor  $\alpha$  (IL18R $\alpha$ ) formando un dímero que posteriormente se unirá a una tercera proteína conocida como el receptor  $\beta$  de IL-18 en la membrana plasmática que posteriormente desencadenará la liberación de citocinas proinflamatorias<sup>101</sup>. Este capítulo estudiará la forma en que afecta la unión de la MT y sus metabolitos activos a la citocina IL-18 para su posterior unión con su receptor IL18R $\alpha$ , a través de una metodología computacional de docking proteína-proteína utilizando el servidor ClusPro<sup>102</sup>.

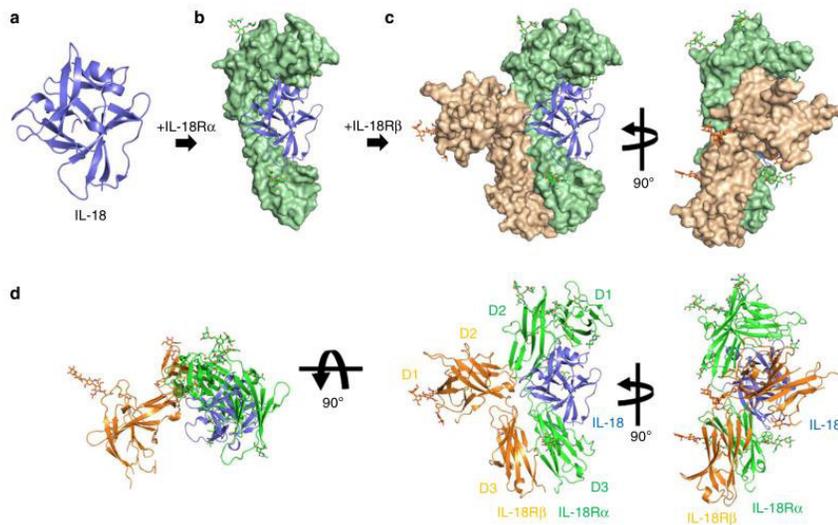


Figura 87. Diagrama esquemático de la formación de los complejos IL18/R $\alpha$ /R $\beta$ . Imagen obtenida de Tsutsumi et al<sup>101</sup>.

El proceso se realizará utilizando la citocina IL-18 obtenida previamente por medio de homología y a la cual se le ha acoplado los ligandos correspondientes mediante AutoDock Vina, mientras que el receptor  $\alpha$  de la proteína IL-18 se obtuvo de la base de datos de PDB con código 3WO3. Posteriormente se analizaron las energías ponderadas, así como las estructuras correspondientes a los complejos (clústeres) formados, se obtuvieron tanto clústeres que se forman electrostáticamente, como hidrofólicamente favorecidos, así como aquellos por interacciones de tipo VdW. Primero se obtuvo la puntuación y formación del dímero natural entre IL-18 y su receptor alfa mediante ClusPro y cuyo resultado se observa en la figura 88 y 89, esta imagen muestra el clúster de mejor puntuación ponderada y que coincide con los modelos ya reportados de unión, es importante destacar que al igual que sucede con el docking proteína-ligando, el docking realizado por ClusPro tiene una puntuación que ayuda al usuario a conocer los complejos formados pero que no debe ser tomado como criterio único para la decisión para la determinación de estructuras.

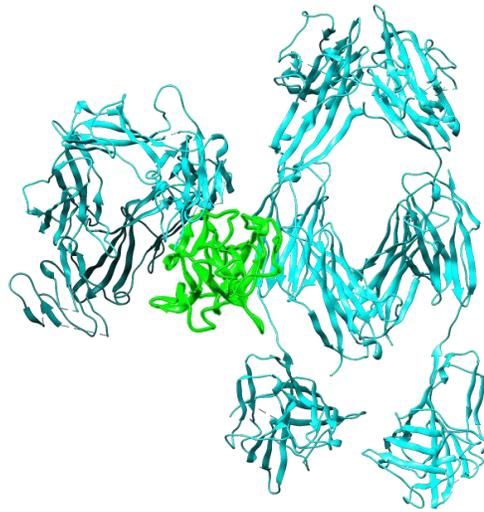


Figura 88. Dímero formado entre la citocina IL-18 (verde) y su receptor IL18R $\alpha$  (azul). Complejo de energía ponderada obtenido mediante el servidor ClusPro.

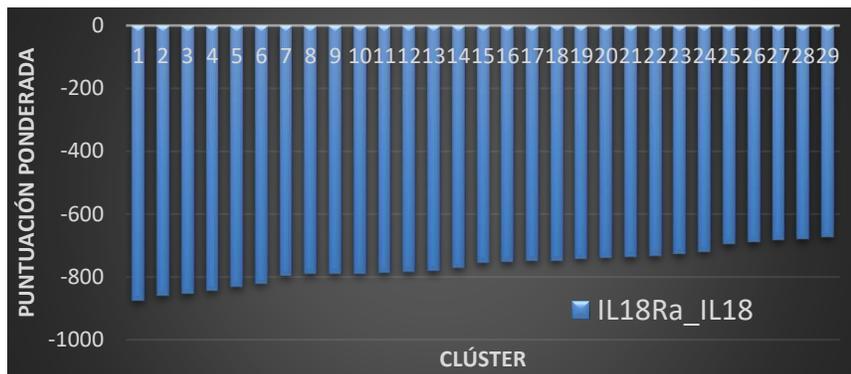


Figura 89. puntuación ponderada de los clústeres formados entre la citocina IL18 y su receptor alfa.

### 7.3.1 Efecto equilibrado de la MT en la formación del dímero

La figura 90 muestra la puntuación ponderada en la formación de clústeres entre el complejo IL18\_MT (azul), aquella citocina IL-18 a la que se le ha unido una MT, con el receptor alfa de IL18 y que se compara con la puntuación de los clústeres formados de la IL-18 sin MT (morado) y su receptor alfa. Es notable ver en este primer resultado como aquellas estructuras formadas con IL-18 a la cual se le ha introducido el ligando MT tienen una menor puntuación con respecto al dímero natural, existe una notable diferencia en cuanto a las puntuaciones entre ambos clústeres y que mantiene una constancia en cuanto a cualquiera de los modos de unión al siempre ser ligeramente menos estable cuando se tiene la MT unida a la citocina. Por su parte en la figura 90 (lado derecho) se muestra la estructura del clúster formado entre IL18\_MT y el IL18R $\alpha$  en la cual el sitio de unión se mantiene con respecto a la unión natural.

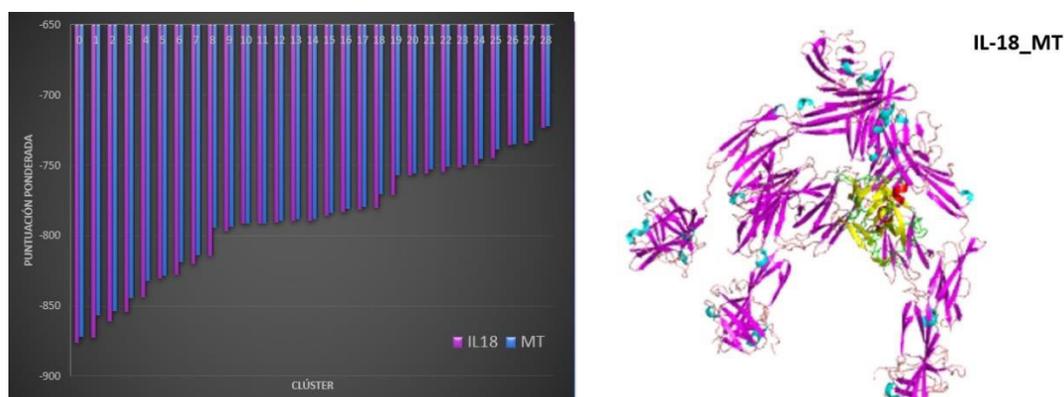


Figura 90. Izquierda: Puntuación ponderada equilibrada entre el complejo IL18\_MT y el IL18R $\alpha$  (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$  (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose entre IL18\_MT (amarillo) y el IL18R (morado).

## 7.3.2 Efecto electrostático de la MT en la formación del dímero

El servidor ClusPro nos permite identificar efectos de interacciones electrostáticas mediante la puntuación ponderada de los clústeres formados. La figura 91 resume los resultados obtenidos, del lado izquierdo se tienen las puntuaciones ponderadas correspondientes a las estructuras electrostáticamente favorecidas y que se han comparado con las puntuaciones del dímero natural (sin MT). Se observa como las energías si bien no tienen una marcada diferencia en cuanto a la ponderación, a lo largo de los 27 clústeres presentados se tiene una constancia de mayor estabilidad para las estructuras a las cuales se les ha acoplado MT al IL18, este comportamiento muestra entonces una afectación en cuanto a las propiedades electrostáticas de la unión del dímero el cual puede notarse mediante el acoplamiento observado en la figura 91 de lado derecho donde el sitio de unión se ha desplazado considerablemente hacia uno de los extremos o brazos del receptor IL18R $\alpha$  indicando así que la presencia de MT modifica electrostáticamente la interacción de IL18, modificando su preferencia de unión con su receptor.

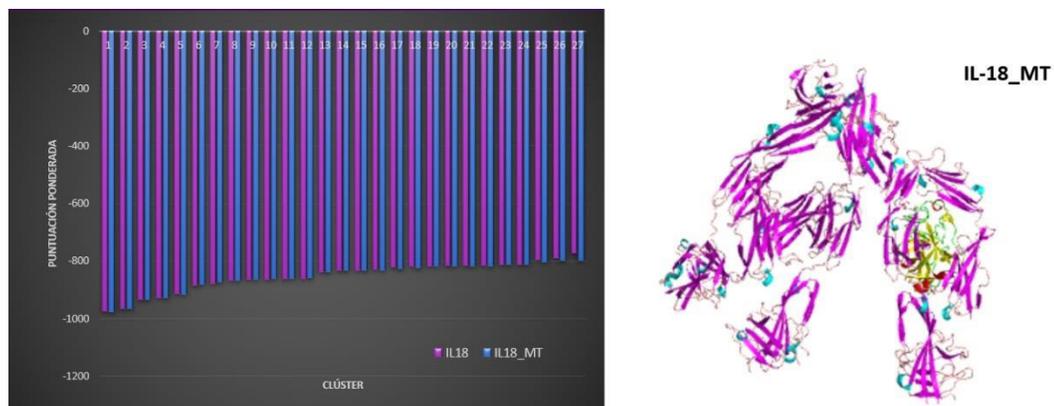


Figura 91. Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras electrostáticamente favorecidas entre el complejo IL8\_MT y el IL18R $\alpha$  (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$  (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose electrostáticamente favorecida entre IL18\_MT (amarillo) y el IL18R (morado).

### 7.3.3 Efecto hidrofóbico de la MT en la formación del dímero

Para el caso de las estructuras hidrofóbicamente favorecidas y cuyos resultados de ponderación se presentan en la figura 92 se tiene que aquellos clústeres formados con IL-18 al cual se le ha acoplado MT tienen una mayor estabilidad, la cual muestra una pequeña pero constante diferencia a lo largo de los 21 clústeres así entonces vemos que dicha diferencia no resulta significativa lo cual coincide con el modelo de acoplamiento que se muestra en la figura 92 lado derecho en el cual el sitio de unión no tuvo modificación alguna por la presencia de MT. Así entonces podemos inferir que la MT no provoca ningún cambio en las propiedades de interacciones hidrofóbicas durante la unión del dímero.

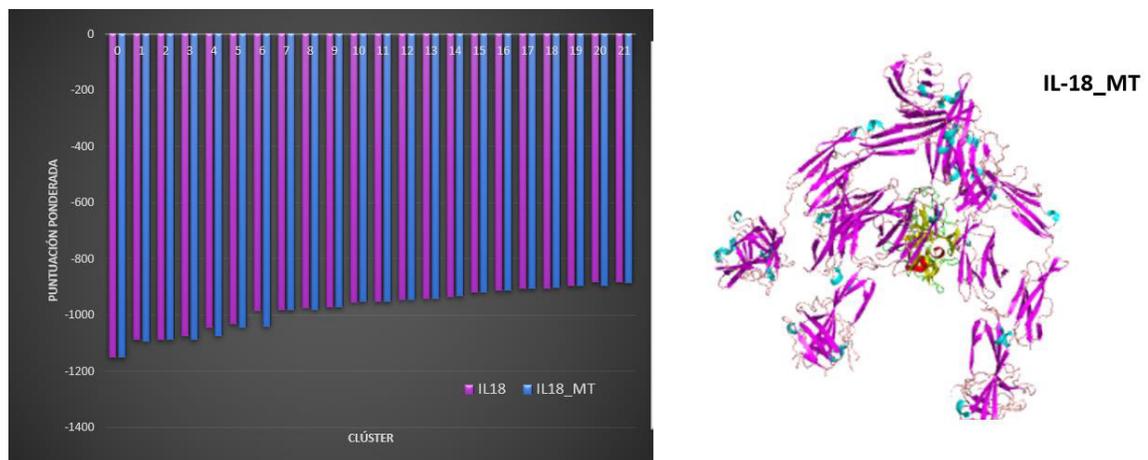


Figura 92. Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras hidrofóbicamente favorecidas entre el complejo IL<sub>8</sub>\_MT y el IL18R $\alpha$  (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$  (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose hidrofóbicamente favorecida entre IL<sub>18</sub>\_MT (amarillo) y el IL18R (morado).

### 7.3.4 Efecto de la MT en las interacciones VdW en la formación del dímero

Finalmente se presentan los clústeres favorecidos por interacciones de tipo VdW, para los cuales se presenta un resumen en la figura 93, del lado izquierdo se observa la puntuación ponderada para los diferentes clústeres formados en los cuales es posible observar una diferencia pequeña resultado de la introducción de la MT en la citocina IL-18 y que provoca una menor estabilidad en el complejo formado, comportamiento que se repite a lo largo de los 29 modelos. De manera análoga se presenta el modelo de docking en la figura 93 de lado derecho donde se advierte como el complejo IL18\_MT se mueve del sitio de unión habitual y desplazándose hacia uno de los brazos de su receptor. Este comportamiento es similar, aunque no idéntico del todo al mostrado por las estructuras electrostáticamente favorecidos y esto se debe a la naturaleza de las interacciones que se ven afectadas debido a la presencia de la MT en la citocina IL-18.

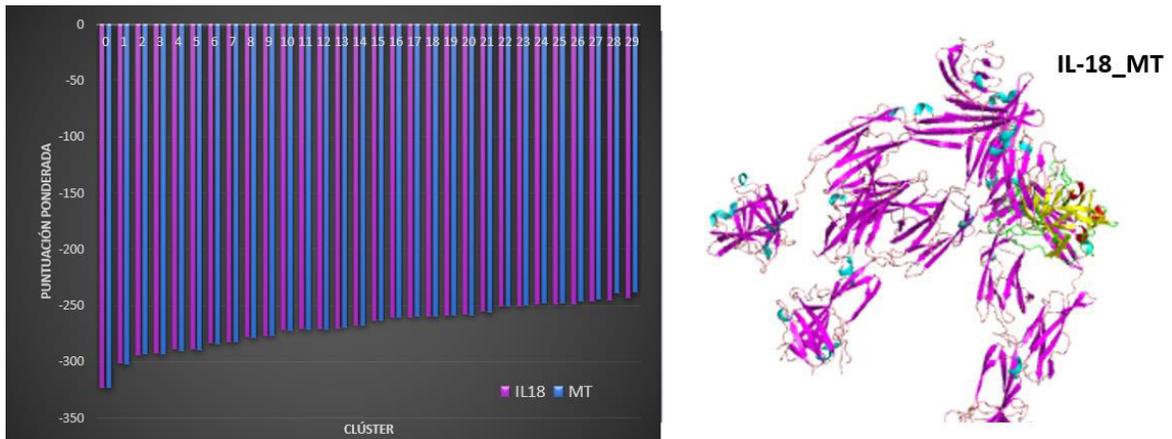


Figura 93. Izquierda: Puntuación ponderada de estructuras favorecidas por interacciones de tipo VdW entre el complejo IL8\_MT y el IL18 $\alpha$  (azul) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18 $\alpha$  (morado). Derecha: imagen del acoplamiento resultante de la primera pose favorecida por interacciones de tipo VdW entre IL18\_MT (amarillo) y el IL18R (morado).

### 7.3.5 Efecto de los metabolitos de la MT en la formación del dímero

De manera análoga se procedió a realizar el mismo procedimiento para cada uno de los metabolitos activos de la MT, no obstante, se encontró que los resultados para cada uno de los ligandos tienen exactamente el mismo valor o con diferencias decimales de 1 unidad, la comparación de la puntuación ponderada para las estructuras equilibradas se muestra en la figura 94 en la cual se decidió mostrar una comparativa en lugar de insertar valores idénticos a los ya explicados en la sección de MT.

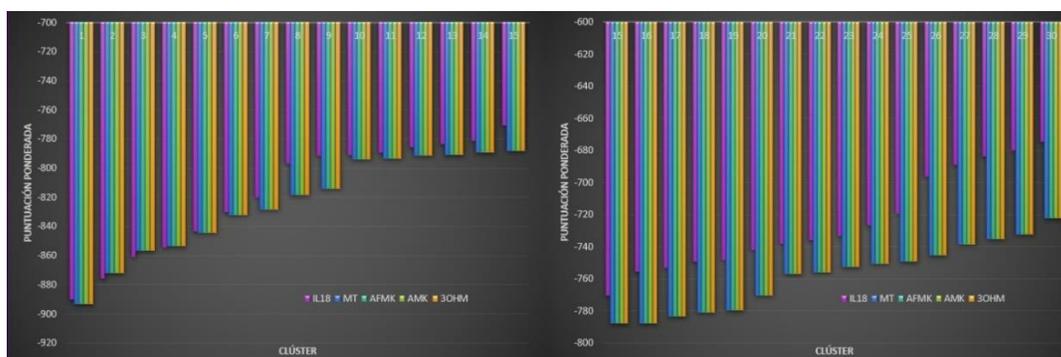


Figura 94. Puntuación ponderada de estructuras equilibradas entre el complejo IL8\_X, donde X es MT o sus metabolitos, y el IL18R $\alpha$  (diferentes colores) comparado con el clúster formado con IL18 e IL18R $\alpha$  (morado). Se ha dividido los 30 clústeres en dos grupos para una mejor apreciación de los datos.

Así entonces es notable como la presencia de ligandos afecta a la estabilidad del dímero formado entre IL18 y su receptor IL18R $\alpha$  mediante la modificación de sus interacciones de tipo electrostáticas así como de tipo VdW, mientras que no se observa un cambio considerable en cuanto a las interacciones de tipo hidrofóbico lo cual coincide con los resultados individuales obtenidos del docking proteína-ligando con las citocinas, en el cual se observaba la generación de superficies de interacción electrostáticas o de zonas con cargas mientras que la presencia de zonas de tipo hidrofóbicas permanecía constante, fenómeno que se observa al inverso con la MCP-1.

Sin embargo se observa como la metodología empleada no permite una diferenciación entre los 4 diferentes ligandos, siendo entonces los resultados idénticos para el ligando que se elija acoplar a la citocina IL-18 y que se presenta mediante una analogía en la figura 95, donde la inclusión de un ligando representado por un cuadro naranja pequeño, afecta la unión entre la citocina y su receptor pero al cambiar este ligando provoca un efecto idéntico más no diferenciable del anterior o posterior ligando a usar.

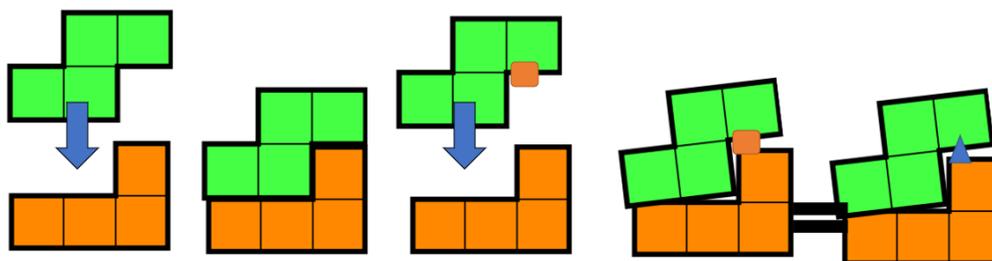


Figura 95. Analogía de los resultados obtenidos para todos los ligandos al unirse a IL-18 para posteriormente acoplar a su receptor. Se encuentran que la presencia de un ligando (cuadro naranja pequeño) afecta la estabilidad de la formación del dímero pero la metodología usada no permite diferenciar entre uno u otro ligando (azul).

## 7.4 Descriptores de la DFT conceptual para los ligandos MT y sus metabolitos activos

Para conocer el comportamiento químico de los ligandos MT, así como sus metabolitos activos se utilizará la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) que ayudará a entender la conducta de un sistema químico mediante descriptores de reactividad tanto globales como locales. Para ello se realizaron los cálculos DFT mediante el software Gaussian 09, donde se optimizó la geometría sin restricciones mediante un funcional M06-2x y utilizando un conjunto base 6-311+g(d,p). Los ligandos optimizados fueron utilizados posteriormente para los estudios de acoplamiento molecular. Para el cálculo de las funciones Fukui condensadas, se calcularon mediante un análisis poblacional utilizando un esquema de cargas atómicas de Hirshfeld, utilizando las fórmulas ya descritas tanto de DFT conceptual como de las funciones Fukui condensadas en el capítulo de generalidades. Las geometrías optimizadas de los ligandos utilizados se presentan en la figura 96, se utiliza tanto la MT (A) como sus respectivos tres metabolitos activos reportados, el AFMK (B), el AMK (C) en los que la MT se convierte casi en su totalidad a condiciones fisiológicas, mientras que el 3OHM (D) se le suele encontrar en concentraciones considerables bajo estrés oxidativo.

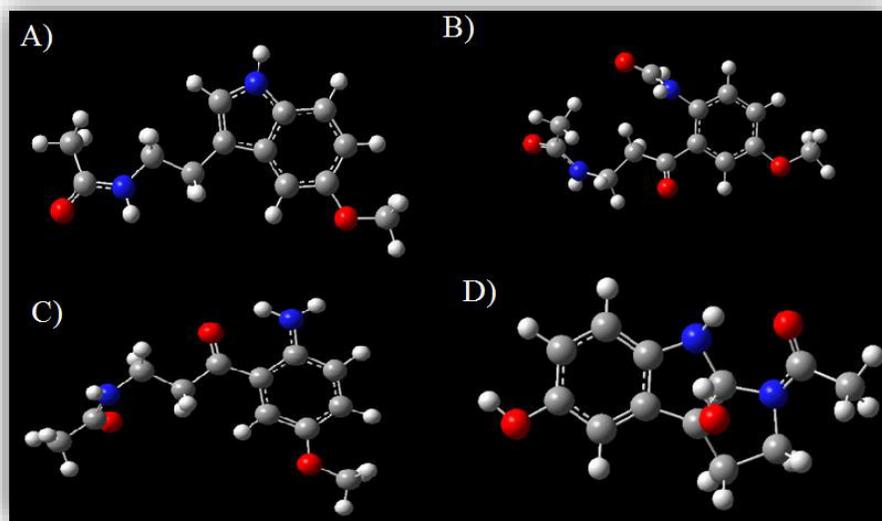


Figura 96. Ligandos con geometría optimizada mediante cálculos DFT utilizando un nivel de teoría M06-2X/6-311+g(d,p). A) MT, B) AFMK, C) AMK y D) 3OHM.

## 7.4.1 Descriptores globales para la MT y sus metabolitos activos

Los resultados de los descriptores globales de la reactividad de la DFT conceptual se graficaron y reunieron en la figura 97 tanto para MT como para sus metabolitos activos: AFMK, AMK y 3OHM. Se establece el orden de reactividad mediante el índice de electrofilicidad global en la cual se puede observar que la especie más reactiva es el AFMK>AMK>3OHM>MT así entonces se observa que los metabolitos activos poseen una mayor reactividad que la MT. En cuanto a la estabilidad se selecciona como indicador el índice de dureza en el cual 3OHM>MT>AFMK>AMK lo cual indica a partir del principio de máxima dureza que la especie más estable es el 3OHM y que coincide con bajos valores de electrofilicidad, estos resultados coinciden con la blandura global que nos indica que 3OHM<MT<AFMK<AMK. El AFMK presentó una mayor reactividad lo cual coincide con los resultados del acoplamiento al presentar el mayor número de interacciones posible, mientras que 3OHM se encuentra por encima de MT, aunque la diferencia es mínima llegó a presentar el menor número de interacciones no covalentes durante el acoplamiento molecular.

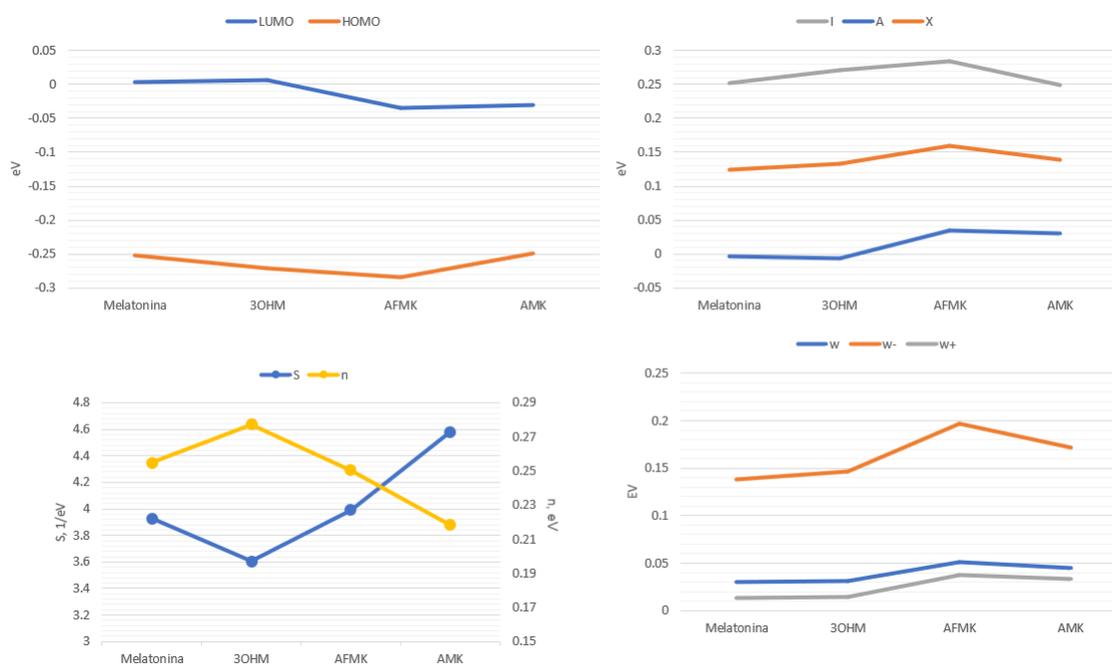


Figura 97. Descriptores globales para MT y sus metabolitos activos.

En cuanto al potencial de ionización  $I$  se tiene que AFMK>3OHM>MT>AMK lo que indica que especies como AMK tienen una mayor capacidad de eliminar un electrón de su estructura y que es comparable con la MT, mientras que especies como AFMK tienen mayor capacidad de captar un electrón como se observa en el descriptor de afinidad electrónica  $A$  donde AFMK>AMK>3OHM>MT y que coincide con la electronegatividad  $\chi$  que indica AFMK>AMK>3OHM>MT confirmando así un comportamiento más reactivo por parte de los

metabolitos activos que de la MT. En cuanto a los índices de electrofilicidad se tiene que la capacidad electrodonante sigue el orden AFMK>AMK>3OHM>MT mientras que la capacidad electroaceptora se ordena como AFMK>AMK>3OHM>MT. De esta manera tiene una capacidad de más fácil donar densidad electrónica y que se observa en las interacciones de acoplamiento al obtenerse una gran variedad de interacciones de tipo pi con los residuos de la macromolécula tanto de AFMK como de AMK. Finalmente con base en el principio ácido-base duros y blandos indica como un gran valor de *gap* HOMO-LUMO (aproximadamente igual a la dureza) está relacionado con especies duras mientras que valores pequeños de *gap* se presenta en especies blandas, así pues se tiene que el mayor valor de *gap* lo presenta 3OHM>MT>AFMK>AMK lo cual habla de una tendencia de reacción de 3OHM a reaccionar con especies duras mientras que AFMK y AMK tendrán una mayor capacidad de reaccionar con residuos blandos, lo cual se observa durante las interacciones del acoplamiento molecular.

## 7.4.2 Descriptores locales para la MT y sus metabolitos activos

Se han realizado cálculos de las funciones Fukui condensadas para observar el comportamiento químico de los ligandos de manera intramolecular (a nivel local) y cuyas funciones fueron calculadas mediante las ecuaciones expuestas en el capítulo de generalidades, la figura 98 presenta los valores obtenidos para los descriptores locales del ligando MT donde se incluye la numeración de los átomos en la molécula, así como un mapa de potencial electrostático (MPE). Se han tomado en cuenta aquellos átomos en los cuales se observó se formaban interacciones no covalentes con los residuos de la macromolécula durante el acoplamiento.

Para el ligando MT se observa que aquellos átomos correspondientes a la formación del anillo aromático tienen una tendencia más del tipo electrofílico en los carbonos 1, 2, 4 y 5 mientras que aquellos carbonos cercanos a heteroátomos como el C3 y el C6 tienen un carácter más nucleofílico, el MPE muestra una variación intermedia en cuanto a la densidad puesto que de manera general muestra una acumulación de densidad de carga negativa pero menor a la mostrada por los átomos de oxígeno, estos últimos muestran una alta densidad lo que los convierte en candidatos para aceptar moléculas electrofílicas y donar densidad electrónica.

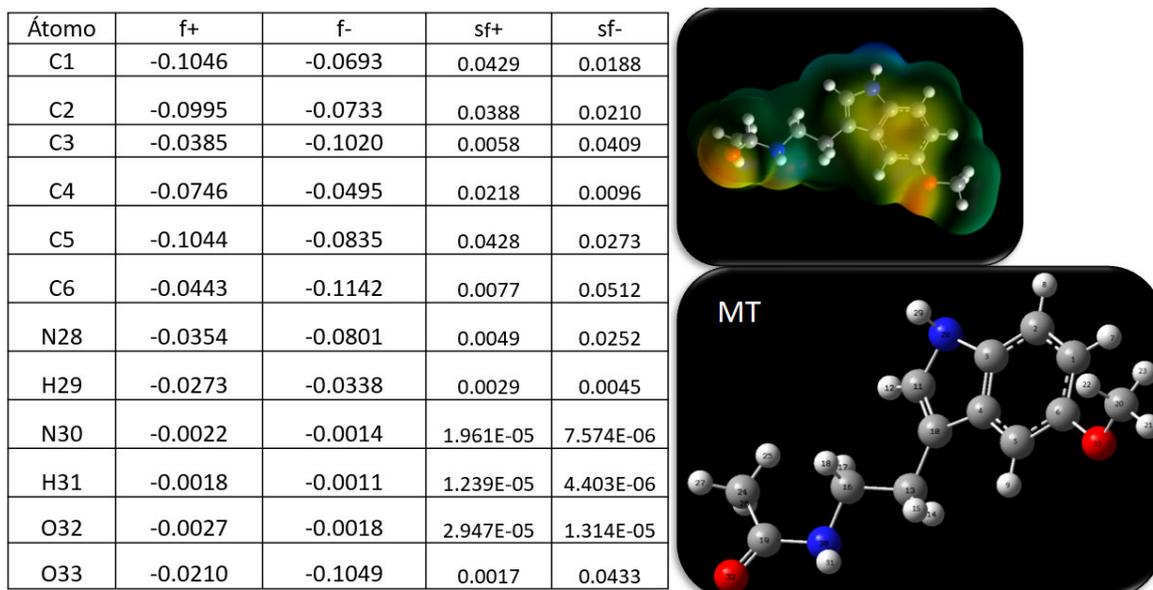


Figura 98. Descriptores locales para la molécula de MT. Se incluye numeración atómica y MPE.

Con respecto al ligando AMK, se muestra el resultado de las FF, así como la numeración y el MPE en la figura 99. AMK presenta una menor acumulación de densidad negativa en su anillo aromático en comparación con la MT, los carbonos 5 y 3 se ven polarizados frente a la presencia de heteroátomos, por un lado, C3 tiene un claro carácter nucleofílico mientras C5 tiene un de tipo anfipático. Los oxígenos O32 y O33 tienen una menor capacidad de donar densidad electrónica debido a la formación del doble enlace que los une a la cadena principal, mientras que O31 posee una mayor capacidad de donar densidad electrónica y aceptar un electrófilo. En cuanto al grupo amino, el N28 tiene un carácter nucleofílico dado sus electrones libres, efecto que pierde el N26 y que puede observarse mediante la blandura local.

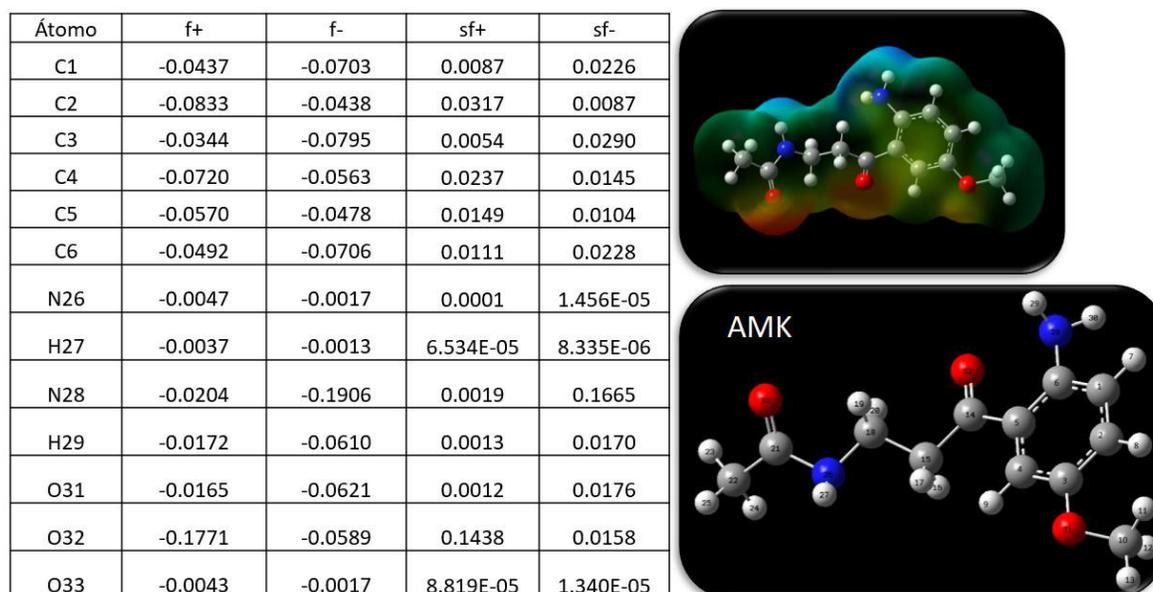


Figura 99. Descriptores locales para la molécula de AMK. Se incluye numeración atómica y MPE.

El ligando AFMK, cuya principal característica responde a la cantidad y variedad de interacciones no covalentes formadas presenta, como se muestra en la figura 100, una distribución de carbonos tanto con carácter electrofílico como nucleofílico, el C6 que se localiza cerca de un grupo amino posee la capacidad de donar densidad electrónica en comparación con otros átomos como el C2 o el C4 que tienen más tendencia a aceptar densidad electrónica. Por otro lado, los oxígenos O34, O35 tienen una menor capacidad de donar densidad electrónica dado la generación del doble enlace correspondiente, por otro lado, tiene un oxígeno, el O32 que tiene un carácter fuertemente nucleofílico pudiendo así donar densidad electrónica fácilmente, así como el O33 que tiene una cualidad más anfipática. Además, tiene al N30 el cual tiene una buena capacidad de aceptar densidad electrónica dada su localización cercana a un grupo carbonilo, caso contrario el N28 que se localiza entre el grupo carbonilo y el anillo aromático, dándole así un carácter más nucleofílico.

Átomo	f+	f-	sf+	sf-
C1	-0.0411	-0.0630	0.0067	0.0158
C2	-0.0826	-0.0650	0.0272	0.0168
C3	-0.0340	-0.1076	0.0046	0.0462
C4	-0.0795	-0.0958	0.0252	0.0366
C5	-0.0608	-0.0434	0.0147	0.0075
C6	-0.0445	-0.0996	0.0079	0.0396
N28	-0.0060	-0.0326	0.00014	0.0042
H29	-0.0097	-0.0221	0.00037	0.0019
N30	-0.0052	-0.0015	0.00010	9.092E-06
H31	-0.0052	-0.0016	0.00011	1.095E-05
O32	-0.0165	-0.1350	0.00109	0.0727
O33	-0.0233	-0.0395	0.0021	0.0062
O34	-0.1743	-0.0311	0.1214	0.0038
O35	-0.0062	-0.0019	0.00015	1.478E-05

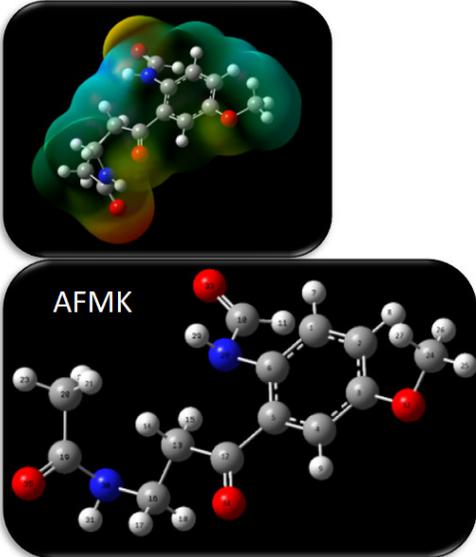


Figura 100. Descriptores locales para la molécula de AFMK. Se incluye numeración atómica y MPE.

Finalmente, el ligando 3OHM quién presenta una buena afinidad con las proteínas, pero escasas interacciones, se presenta en la figura 101. Presenta un anillo aromático rodeado de una densidad electrónica correspondiente a sus electrones pi, no obstante, posee poca capacidad para donar dicha densidad como se observa en los carbonos 2,3,5 y 6. Por otro lado, de los 3 oxígenos disponibles, sólo 1 de ellos, el O27 tiene un alto carácter nucleofílico lo que le permite entonces donar densidad electrónica, mientras que los oxígenos O29 y O31 tienen un carácter más anfipático, el nitrógeno N13 se encuentra

polarizado debido al anillo aromático lo que provoca su capacidad más electrofílica a diferencia del N21 que tiene una mayor capacidad de donar su densidad electrónica.

Átomo	f+	f-	sf+	sf-
C1	-0.0584	-0.1125	0.0123	0.0456
C2	-0.1337	-0.0868	0.0645	0.0271
C3	-0.1361	-0.0628	0.0667	0.0142
C4	-0.0470	-0.1042	0.0079	0.0391
C5	-0.0932	-0.0595	0.0313	0.0127
C6	-0.1298	-0.0578	0.0608	0.0120
N13	-0.0189	-0.1085	0.0128	0.0034
H14	-0.0130	-0.0400	0.0117	0.0029
N21	-0.0054	-0.0079	0.0001	0.0002
O27	-0.0314	-0.0915	0.0035	0.0302
O29	-0.0246	-0.0178	0.0021	0.0011
O31	-0.0071	-0.0115	0.0001	0.00047

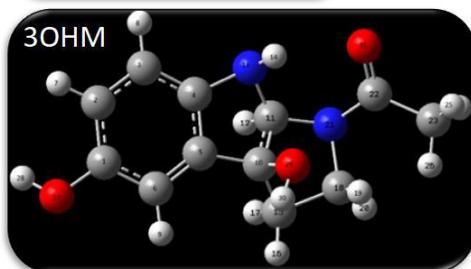
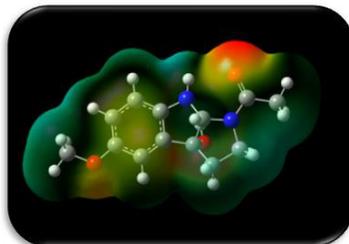


Figura 101. Descriptores locales para la molécula de 3OHM. Se incluye numeración atómica y MPE.

# 8

## Conclusiones

Se estudió el efecto de la melatonina, así como sus metabolitos activos en proteínas proinflamatorias relacionadas al proceso inflamatorio durante el daño renal agudo, como la citocina IL18 y el MCP-1 así como una citocina antiinflamatoria, la IL-13. Se evaluaron las características químicas de los ligandos, así como el estudio de acoplamiento molecular entre las especies mencionadas para conocer su posible participación para disminuir los efectos del padecimiento renal y evitar su evolución a un daño renal crónico.

Se generó un modelo homólogo estadísticamente confiable de la estructura de la citocina IL-18 de ratas, al no disponer de esta en la literatura, para el estudio de acoplamiento molecular, el modelo posee una distribución de residuos energéticamente estable, encontrándose dentro del rango de proteínas nativas de peso molecular similar.

El estudio de acoplamiento molecular mostró posibles sitios de unión de los ligandos con la macromolécula IL-18 que en general muestran energías de afinidad estables reflejando una buena tendencia de los ligandos a unirse a la citocina IL-18. El sitio de unión fue elegido con base a los resultados del docking ciego y a los de Proteins Plus, dicho sitio fue compartido por todos los ligandos y mostró tener características como una  $DD=0.83$ , una superficie promedio de  $701.9 \text{ \AA}^2$  y un volumen de  $474.88 \text{ \AA}^3$ . Las energías de afinidad fueron entonces mejoradas mediante un docking dirigido en la cavidad seleccionada, devolviendo así distintas poses de unión cada una con energías estables. El ligando 3OHM mostró tener para todos los casos las mejores afinidades con respecto a la MT y los 2 restantes metabolitos activos, seguido se encuentra el AFMK, el AMK y finalmente la MT, demostrando así una mayor reactividad de los metabolitos frente a la MT.

Por su parte la citocina IL-13 presentó rangos de energía de afinidad estable con la MT y sus metabolitos activos, al ser comparadas las afinidades entre IL-13 e IL-18 se encontró que tanto MT como AMK no presentaron preferencia por alguna de las 2 citocinas teniendo así tanto poses con mejor así como poses con menor energía al enfrentarlas, por su parte 3OHM y AFMK mostraron una diferencia notable por la citocina IL-18 donde el metabolito AFMK fue quién mostró una marcada diferencia de afinidad por IL-18, a consecuencia de las múltiples interacciones formadas en el sitio de unión. MCP-1 también mostró buenas afinidades por los ligandos, no obstante, la afinidad y sobre todo el número de interacciones formadas tuvo menor capacidad con respecto a IL-18 dado que mostraron una naturaleza de unión distinta entre ambas proteínas.

Con respecto a las interacciones formadas, el ligando AFMK demostró tener la mayor capacidad de formar interacciones no covalentes en el sitio de unión para cualquiera de las macromoléculas estudiadas, así como una mayor variedad de interacciones, presentando interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y en algunos casos interacciones electrostáticas.

Tanto AMK como MT tienen una participación intermedia en la formación de interacciones, al ser menores que AFMK y variando en número según la proteína a estudiar, generalmente presentan gran cantidad de interacciones hidrofóbicas, y en menor cantidad puentes de hidrógeno, mientras que interacciones electrostáticas no llegan a presentar. De manera general a pesar de la buena afinidad energética de las macromoléculas por 3OHM, no muestra gran cantidad de interacciones, llegando a limitar a aquellas de tipo hidrofóbicas y en algunos casos puentes de hidrógeno.

El acoplamiento proteína-proteína realizado permitió conocer el efecto de la unión de un ligando en la citocina IL-18 con su proteína receptora IL18R $\alpha$ , los resultados muestran como la incorporación de un ligando como la MT afecta las propiedades electrostáticas así como las interacciones de tipo VdW durante la unión modificando así la afinidad hacia el sitio de unión y desplazándolo hacia uno de los brazos del receptor, afectando así ligeramente la estabilidad del dímero necesario para desencadenar las funciones de la citocina IL-18, no obstante la metodología no muestra tener variaciones suficientes en cuanto a las puntuaciones ponderadas para poder distinguir entre uno u otro ligando, siendo idénticos los resultados para la MT y sus metabolitos activos.

Los resultados de este estudio muestran que tanto la MT como sus metabolitos activos poseen una buena afinidad para unirse a las proteínas que intervienen en el daño renal agudo, la IL-18 en específico mostró tener un sitio de unión bien definido, donde el ligando AFMK tiene la mayor posibilidad de ser el ligando que provoque el efecto regulador de la inflamación, al ser un metabolito que se encuentra en mayor concentración en el cuerpo así como la segunda mejor afinidad y el mayor número de interacciones no covalentes, mientras que su integración a la citocina mostró tener la capacidad de disminuir la afinidad por su ligando. Estos resultados sugieren una tendencia favorable de la MT y sus metabolitos de unirse a la citocina proinflamatoria IL-18 y provocar cambios en las interacciones electrostáticas de la IL-18 los cuales a su vez modifican la estabilidad al unirse con su proteína receptora IL-18R $\alpha$  y por ende afecta el dímero consecuente.

# 9

---

## ***Trabajo futuro***

Como parte del trabajo a futuro se propone estudiar la estabilidad de las interacciones formadas por la MT, así como sus metabolitos durante la unión consecuente del acoplamiento molecular, este estudio se realizará por medio de dinámica molecular para así observar el comportamiento de las interacciones no covalentes,

Se propone estudiar las consecuencias de un acoplamiento sucesivo mediante el cual se unan más de un mismo tipo de ligando a la macromolécula, observar el tipo de interacción formada, así como identificar un posible número máximo de ligandos acoplables, finalmente estudiar la estabilidad de los complejos formados entre la citocina con acoplamiento sucesivos y su receptor alfa.

Se plantea estudiar el efecto de un solvente como el agua durante el proceso de acoplamiento molecular a fin de mejorar la aproximación del proceso y conocer los posibles cambios que esto genere en las afinidades, así como en el sitio de unión.

La evaluación de las afinidades de la MT, así como sus metabolitos con respecto a la unión de otras citocinas participantes del proceso es algo pendiente, como por ejemplo la citocina IL-1 y sus variantes, los cuales juegan un papel fundamental en el proceso inflamatorio y que tienen una estructura semejante con IL-18, siendo pertenecientes a la misma familia.

---

# 10

## **Bibliografía**

- (1) Hernández-Plata, E.; Quiroz-Compeán, F.; Ramírez-García, G.; Barrientos, E. Y.; Rodríguez-Morales, N. M.; Flores, A.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Méndez, I.; Díaz-Muñoz, M.; Robles, J.; Martínez-Alfaro, M. Melatonin Reduces Lead Levels in Blood, Brain and Bone and Increases Lead Excretion in Rats Subjected to Subacute Lead Treatment. *Toxicol. Lett.* **2015**, *233* (2), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.009>.
- (2) Soto-Arredondo, K. J.; Robles, J.; Díaz-Cervantes, E.; Ruiz-Ramírez, C.; García-Revilla, M. A.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Díaz-Muñoz, M.; Méndez, I.; Flores, A.; Acevedo-Aguilar, F. J.; Martínez-Alfaro, M. Effects of Lead and Lead–Melatonin Exposure on Protein and Gene Expression of Metal Transporters, Proteins and the Copper/Zinc Ratio in Rats. *BioMetals* **2018**, *31* (5), 859–871. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0127-1>.
- (3) Díaz-Cervantes, E.; García-Revilla, M. A.; Soto-Arredondo, K.; Villaseñor-Granados, T.; Martínez-Alfaro, M.; Robles, J. Computational Study of Metal Complexes Formed with EDTA, Melatonin, and Its Main Metabolites: Implications in Lead Intoxication and Clues to a Plausible Alternative Treatment. *J. Mol. Model.* **2019**, *25* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3898-y>.
- (4) INEGI. Nota Técnica Estadística De Defunciones Registradas 2019. **2019**, 60.
- (5) Sánchez-Cedillo, A.; Cruz-Santiago, José; Mariño-Rojas, F. B.; Hernández-Estrada, S.; García-Ramírez, C. Carga de La Enfermedad: Insuficiencia Renal, Diálisis-Hemodiálisis y Trasplante Renal En México. Costo de La Enfermedad. *Rev. Mex. Traspl.* **2020**, *9* (1), 15–25. <https://doi.org/10.35366/94025>.
- (6) Torres-Toledano, M.; Granados-García, V.; López-Ocaña, L. R. Global Burden of Disease of Chronic Kidney Disease in Mexico. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* **2017**, *55* (Suppl 2), S118-23.
- (7) VILLARREAL, H. Insuficiencia Renal Aguda. *Gac. Med. Mex.* **1957**, *87* (1), 36–47.

- (8) Tamayo Orozco, J.; Lastiri Quirós, S. *La Enfermedad Renal Crónica En México*; 2016.
- (9) Díaz García, J. D.; Arceo, E. Daño Renal Asociado a Metales Pesados: Trabajo de Revisión. *Rev. Colomb. Nefrol.* **2017**, *5* (1), 43. <https://doi.org/10.22265/acnef.5.2.254>.
- (10) Morales, a. I.; Arévalo, M.; Pérez-Barriocanal, F. Mecanismos Implicados En La Nefrotoxicidad Producida Por Aminoglucósidos. *Nefrología* **2000**, *20* (5), 408–414.
- (11) Caicedo, M. A. Nefropatía Por Medios de Contraste y Aminoglucosidos. In *Nefrología Básica 2*; 2008; p 1018.
- (12) Martínez-Alfaro, M.; Ramírez-García, G.; Gutiérrez-Granados, S.; Alcaraz-Contreras, Y.; Gallegos-Corona, M. A.; de Larrea, G. Z. L.; Cárbaz-Trejo, A. Melatonin Attenuates the Effects of Sub-Acute Administration of Lead on Kidneys in Rats without Altering the Lead-Induced Reduction in Nitric Oxide. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2013**, *27* (4), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2013.05.003>.
- (13) Villaseñor-Granados, T.; Díaz-Cervantes, E.; Soto-Arredondo, K. J.; Martínez-Alfaro, M.; Robles, J.; García-Revilla, M. A. Binding of Pb-Melatonin and Pb-(Melatonin-Metabolites) Complexes with DMT1 and ZIP8: Implications for Lead Detoxification. *DARU, J. Pharm. Sci.* **2019**, *27* (1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00256-5>.
- (14) Liu, Z.; Li, H.; Soleimani, M.; Girijashanker, K.; Reed, J. M.; He, L.; Dalton, T. P.; Nebert, D. W. Cd<sup>2+</sup> versus Zn<sup>2+</sup> Uptake by the ZIP8 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Dependent Symporter: Kinetics, Electrogenicity and Trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365* (4), 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.067>.
- (15) Fujishiro, H.; Yano, Y.; Takada, Y.; Tanihara, M.; Himeno, S. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in Transport of Cadmium and Manganese in Mouse Kidney Proximal Tubule Cells. *Metallomics* **2012**, *4* (7), 700–708. <https://doi.org/10.1039/c2mt20024d>.
- (16) Tan, D. X.; Manchester, L. C.; Terron, M. P.; Flores, L. J.; Reiter, R. J. One Molecule, Many Derivatives: A Never-Ending Interaction of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species? *J. Pineal Res.* **2007**, *42* (1), 28–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x>.
- (17) Barrientos, A. Insuficiencia Renal : Factor de Riesgo de Enfermedades

Cardiovasculares. *Libr. la Salud Cardiovasc. del Hosp. Clin. SanCarlos y la Fund. BBVA* **2004**, 141.

- (18) Cristian Varela, U.; Prieto-Rayó, J. C. Fibrosis Sistémica Nefrogénica: La Pandemia Que No Fue. *Rev. Med. Chil.* **2014**, *142* (12), 1565–1574. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001200010>.
- (19) Canga, A.; Kislikova, M.; Martínez-Gálvez, M.; Arias, M.; Fraga-Rivas, P.; Poyatos, C.; de Francisco, Á. L. M. Función Renal, Fibrosis Sistémica Nefrogénica y Otras Reacciones Adversas Asociadas a Los Medios de Contraste Basados En El Gadolinio. *Nefrología* **2014**, *34* (4), 428–438. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2014.Apr.12375>.
- (20) Salanova Villanueva, L.; Santos Sánchez-Rey, B.; Sanz Sainz, M. Mecanismos Inflamatorios y Fibróticos En La Enfermedad Renal. Protagonistas y Terapéutica. *Rev. del Lab. Clínico* **2018**, *11* (4), 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.11.004>.
- (21) Chung, A. C. K.; Lan, H. Y. Chemokines in Renal Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22* (5), 802–809. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050510>.
- (22) Strutz, F.; Zeisberg, M. Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17* (11), 2992–2998. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006050420>.
- (23) Zhou, D.; Liu, Y. Understanding the Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12* (2), 68–70. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.215>.
- (24) Radogna, F.; Diederich, M.; Ghibelli, L. Melatonin: A Pleiotropic Molecule Regulating Inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80* (12), 1844–1852. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.041>.
- (25) Fan, J.; Xie, K.; Wang, L.; Zheng, N.; Yu, X. Roles of Inflammasomes in Inflammatory Kidney Diseases. *Mediators Inflamm.* **2019**, *2019*, 2923072. <https://doi.org/10.1155/2019/2923072>.
- (26) Gerdes, N.; Sukhova, G. K.; Libby, P.; Reynolds, R. S.; Young, J. L.; Schönbeck, U. Expression of Interleukin (IL)-18 and Functional IL-18 Receptor on Human Vascular Endothelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Macrophages: Implications for Atherogenesis. *J. Exp. Med.* **2002**, *195* (2), 245–257. <https://doi.org/10.1084/jem.20011022>.
- (27) Dinarello, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the

- Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, 27, 519–550.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- (28) Dr. Cesar A Restrepo V, D. C. P. P. S. Anatomía y Fisiología. *Anat. y Fisiol.* **2017**, 790–795.
- (29) Killen, A. Reabsorción y Secreción Tubulares. *About* **2017**, 1–40.
- (30) NIDDK. Los Riñones y Cómo Funcionan. *Natl. Kidney Urol. Dis. Inf. Clear.* **2009**, 8 (4), 16.
- (31) Uremico, S. H.; Trombotica, P. T. Básica 2.
- (32) Navarro, J. F.; Mora, C.; Martínez, A.; Górriz, J. L.; Soler, M. Enfermedad Renal Diabética: Etiopatogenia y Fisiopatología. | Nefrología Al Día. *Nefrol. al día, Soc. Española Nefrol.* **2020**, 1.
- (33) Santamaría, R.; Gorostidi, M. S. de N. H. U. C. de A. Presión Arterial y Progresión de La Enfermedad Renal Crónica. *NefroPlus* **2013**, 5, 4–11.  
<https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2013.May.12105>.
- (34) Udani, S.; Lazich, I.; Bakris, G. L. Epidemiology of Hypertensive Kidney Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2011**, 7 (1), 11–21.  
<https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.154>.
- (35) Cabrera, W. E.; Behets, G.; Lamberts, L.; D’Haese, P. Plomo y Nefropatía. Biomarcadores Urinarios En La Detección de Daño Renal Precoz. *Rev. Med. Chil.* **2016**, 144 (6), 704–709. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000600003>.
- (36) Jorge Morales, B. Drogas Nefrotóxicas. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **2010**, 21 (4), 623–628. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(10\)70578-2](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(10)70578-2).
- (37) Rodríguez-Barbero, A.; Rodríguez-Lopez, A. M.; González-Sarmiento, R.; López-Novoa, J. M. Gentamicin Activates Rat Mesangial Cells. A Role for Platelet Activating Factor. *Kidney Int.* **1995**, 47 (5), 1346–1353.  
<https://doi.org/10.1038/ki.1995.190>.
- (38) Rodríguez-Barbero, A.; López-Novoa, J. M.; Arévalo, M. Involvement of Platelet-Activating Factor in Gentamicin Nephrotoxicity in Rats. *Exp. Nephrol.* **1997**, 5 (1), 47–54.
- (39) Venado, A.; José, M.; Rodríguez, M. Insuficiencia Renal Crónica. *Diálisis y Traspl.* **1995**, 2 (4), 573–588. <https://doi.org/10.1007/BF01210624>.
- (40) Jimeno Martín, I.; Ignacio Minguela, J.; Ocharan-Corcuera, J.; Chena, A.;

- Ruiz-de-Gauna, R. Indicaciones y Tipos de Accesos Para Hemodiálisis. *Dial. y Traspl.* **2008**, 29 (4), 173–176. [https://doi.org/10.1016/S1886-2845\(08\)75061-6](https://doi.org/10.1016/S1886-2845(08)75061-6).
- (41) Montoro, J.; Segarra, A.; López, R.; Monterde, J. 12. Nefrología. *Farm. Hosp.* **2007**, 31.
- (42) Ostabal Artigas, M.; Fragero Blesa, E.; Comino García, A. Estructura y Función de Las Citocinas. *Med. Integr.* **2003**, 41 (3), 151–161.
- (43) Aguirre, M. V.; Quintana, R.; Brandan, N. C i t o q u i n a S. *Medicina (B. Aires)*. **2002**.
- (44) Zhang, J.-M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesth. Clin.* **2009**, 69 (2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.Cytokines.
- (45) Caio Marcio Barros de Oliveira; Kimiko Sakata, R.; Machado Issy, A.; Roberto Gerola, L.; Salomão, R. Citocinas y Dolor. *Rev Bras Anesthesiol ARTÍCULO REVISIÓN Rev. Bras. Anesthesiol.* **2011**, 61 (2), 137–142.
- (46) Yasuda, K.; Nakanishi, K.; Tsutsui, H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>.
- (47) Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **2009**, 29 (6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
- (48) Luciardí, M. C.; Carrizo, T. R.; Díaz, E. I.; Áleman, M. N.; Bazán, M. C.; Abregú, A. V. Proinflammatory State in Obese Children. *Rev. Chil. Pediatr.* **2018**, 89 (3), 346–351. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062018005000501>.
- (49) Ammon Brzezinski, M. D. Melatonin in Humans. *N. Engl. J. Med.* **1997**, 10.
- (50) Pérez-Beltrán, C. F.; Díaz-Greene, E. J.; Rodríguez-Weber, F. L. Melatonina y Su Utilidad En La Práctica Diaria. *Med. Interna Mex.* **2014**, 30 (4), 419–424.
- (51) Alejandro, J. G.; Guarneros-Roniger Daniela, D.; Andrés, B. M.; Laurel-Gardeazábal Itzna, E. Actualidades En Las Aplicaciones Clínicas de La Melatonina En Trastornos Del Sueño. *Rev. Mex. Neurocienc.* **2013**, 14 (1), 39–43.

- (52) Hardeland R. Antioxidative Protection by Melatonin. *Endocrine* **2005**, *27* (2), 119–130.
- (53) Huang, Y.-S.; Jiang, J.-W.; Wu, G.-C.; Cao, X.-D. Effect of Melatonin and Electroacupuncture (EA) on NK Cell Activity, Interleukin-2 Production and POMC-Derived Peptides in Traumatic Rats. *Acupunct. Electrother. Res.* **2002**, *27* (2), 95–105.  
<https://doi.org/10.3727/036012902816026077>.
- (54) Shafer, L. L.; McNulty, J. A.; Young, M. R. Assessment of Melatonin's Ability to Regulate Cytokine Production by Macrophage and Microglia Cell Types. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *120* (1–2), 84–93.  
[https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00419-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00419-2).
- (55) Pioli, C.; Caroleo, M. C.; Nistico, G.; Doria, G. Melatonin Increases Antigen Presentation and Amplifies Specific and Non Specific Signals for T-Cell Proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* **1993**, *15* (4), 463–468.  
[https://doi.org/10.1016/0192-0561\(93\)90060-c](https://doi.org/10.1016/0192-0561(93)90060-c).
- (56) Gitto, E.; Romeo, C.; Reiter, R. J.; Impellizzeri, P.; Pesce, S.; Basile, M.; Antonuccio, P.; Trimarchi, G.; Gentile, C.; Barberi, I.; Zuccarello, B.; Stefanutti; Gitto, E.; Ford, H. Melatonin Reduces Oxidative Stress in Surgical Neonates. *J. Pediatr. Surg.* **2004**, *39* (2), 184–189.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2003.10.003>.
- (57) Küçükakin, B.; Lykkesfeldt, J.; Nielsen, H. J.; Reiter, R. J.; Rosenberg, J.; Gögenur, I. Utility of Melatonin to Treat Surgical Stress after Major Vascular Surgery - A Safety Study. *J. Pineal Res.* **2008**, *44* (4), 426–431.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00545.x>.
- (58) Mó, O.; Yáñez, M. La Química Computacional En La Nueva Frontera. *Arbor* **2011**, *187* (EXTRA), 143–155.  
<https://doi.org/10.3989/arbor.2011.extran1119>.
- (59) Cuevas, G. Química Computacional. *Rev. Cienc.* **2005**, *56* (2), 33–42.
- (60) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*; John Wiley & Sons, 2017.
- (61) Kubicki, J. D.; Bleam, W. F. *An Introduction to Molecular Modeling*; 2015.  
<https://doi.org/10.1346/cms-wls-12.1>.
- (62) Young, D. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*; John Wiley & Sons, 2004.

- (63) Vazquez, N.; Ines, M. *Algunos Aspectos Básicos de La Química Computacional*; UNAM, 2006.
- (64) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. 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. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1–3), 215–241. <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>.
- (65) Thomas, L. H. The Calculation of Atomic Fields. In *Mathematical proceedings of the Cambridge philosophical society*; Cambridge University Press, 1927; Vol. 23, pp 542–548.
- (66) Fermi, E. Eine Statistische Methode Zur Bestimmung Einiger Eigenschaften Des Atoms Und Ihre Anwendung Auf Die Theorie Des Periodischen Systems Der Elemente. *Zeitschrift für Phys.* **1928**, *48* (1–2), 73–79.
- (67) Morell, C. Introduction to Density Functional Theory of Chemical Reactivity. **1972**, *1* (3), 1–41.
- (68) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136* (3B), B864.
- (69) Levy, M. Electron Densities in Search of Hamiltonians. *Phys. Rev. A* **1982**, *26* (3), 1200.
- (70) Levy, M. Universal Variational Functionals of Electron Densities, First-Order Density Matrices, and Natural Spin-Orbitals and Solution of the  $v$ -Representability Problem. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, *76* (12), 6062–6065.
- (71) Shimony, A.; Feshbach, H. Physics as Natural Philosophy: Essays in Honor of Laszlo Tisza on His Seventy-Fifth Birthday. **1982**.
- (72) Ratcliff, L. *Optical Absorption Spectra Calculated Using Linear-Scaling Density-Functional Theory*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (73) Parr, R. G. Density Functional Theory of Atoms and Molecules. In *Horizons of quantum chemistry*; Springer, 1980; pp 5–15.
- (74) Manzanilla, B.; Robles, J. Conceptual Dft Reactivity Descriptors Computational Study of Graphene and Derivatives Flakes: Doped Graphene, Graphane, Fluorographene, Graphene Oxide, Graphyne, and

- Graphdiyne. *J. Mex. Chem. Soc.* **2020**, *64* (3), 238–252.  
<https://doi.org/10.29356/jmcs.v64i3.1167>.
- (75) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (5), 1793–1873.  
<https://doi.org/10.1021/cr990029p>.
- (76) Chattaraj, P. K.; Giri, S. Electrophilicity Index within a Conceptual DFT Framework. *Annu. Reports Prog. Chem. - Sect. C* **2009**, *105*, 13–39.  
<https://doi.org/10.1039/b802832j>.
- (77) Parr, R. G.; Szentpály, L. v; Liu, S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (9), 1922–1924.
- (78) Wang, B.; Rong, C.; Chattaraj, P. K.; Liu, S. A Comparative Study to Predict Regioselectivity, Electrophilicity and Nucleophilicity with Fukui Function and Hirshfeld Charge. *Theor. Chem. Acc.* **2019**, *138* (12), 1–9.  
<https://doi.org/10.1007/s00214-019-2515-1>.
- (79) Yang, W.; Parr, R. G. Hardness, Softness, and the Fukui Function in the Electronic Theory of Metals and Catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82* (20), 6723–6726. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6723>.
- (80) Chattaraj, P. K.; Maiti, B.; Sarkar, U. Philicity: A Unified Treatment of Chemical Reactivity and Selectivity. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (25), 4973–4975.
- (81) Benfenati, E. *In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity*; Springer, 2016.
- (82) Schneider, G. *De Novo Molecular Design*; John Wiley & Sons, 2013.
- (83) Vivas-Reyes, R.; Ahumado, M.; Cabezas, J. Modelamiento Por Homología de La Estructura Tridimensional de La Fosfolipasa A2 Citosólica Pancreática Dependiente de Calcio Presente En Rattus Norvegicus. *Rev. Colomb. química* **2010**, *39* (2), 181–197.
- (84) Zhang, Y.; Arakaki, A. K.; Skolnick, J. TASSER: An Automated Method for the Prediction of Protein Tertiary Structures in CASP6. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *61* (S7), 91–98.
- (85) Skolnick, J.; Kihara, D.; Zhang, Y. Development and Large Scale Benchmark Testing of the PROSPECTOR\_3 Threading Algorithm. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2004**, *56* (3), 502–518.
- (86) Zhang, Y.; Skolnick, J. Tertiary Structure Predictions on a Comprehensive

Benchmark of Medium to Large Size Proteins. *Biophys. J.* **2004**, *87* (4), 2647–2655. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045385>.

- (87) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (88) BIOVIA. Discovery Studio Visualizer Software. Dassault Systemes 2012.
- (89) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (90) Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T. L. NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (suppl\_2), W5–W9.
- (91) Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-Web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (suppl\_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.
- (92) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. Gaussian 09, Revision C. 01 [CP]. Wallingford CT: Gaussian. Inc 2010.
- (93) Schöning-Stierand, K.; Diedrich, K.; Fährrolfes, R.; Flachsenberg, F.; Meyder, A.; Nittinger, E.; Steinegger, R.; Rarey, M. Proteins Plus: Interactive Analysis of Protein–Ligand Binding Interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (W1), W48–W53.
- (94) Desta, I. T.; Porter, K. A.; Xia, B.; Kozakov, D.; Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* **2020**, *28* (9), 1071–1081.
- (95) Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, T.; Rippmann, F.; Rarey, M. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (2), 360–372. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>.
- (96) Rael, E. L.; Lockey, R. F. Interleukin-13 Signaling and Its Role in Asthma. *World Allergy Organ. J.* **2011**, *4* (3), 54–64. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e31821188e0>.
- (97) De Pablo Sánchez, R.; Monserrat Sanz, J.; Prieto Martín, A.; Reyes

Martín, E.; Alvarez De Mon Soto, M.; Sanchez Garcia, M. The Balance between Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Citokines in Septic States. *Med. Intensiva* **2005**, *29* (3), 151–158.  
[https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(05\)74222-4](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(05)74222-4).

- (98) Fragoso-Lona, J. M.; Ramírez-Bello, J.; Cruz-Robles, D.; Pérez-Méndez, O.; de la Peña, A.; Vargas-Alarcón, G. Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Markers in Coronary Artery Disease and Acute Ischemic Coronary Syndrome. *Arch. Cardiol. México* **2009**, *79* (1), 54–62.
- (99) Taub, D. D.; Proost, P.; Murphy, W. J.; Anver, M.; Longo, D. L.; Van Damme, J.; Oppenheim, J. J. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), -2, and -3 Are Chemotactic for Human T Lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95* (3), 1370–1376.
- (100) Gerszten, R. E.; Garcia-Zepeda, E. A.; Lim, Y.-C.; Yoshida, M.; Ding, H. A.; Gimbrone, M. A.; Luster, A. D.; Luscinskas, F. W.; Rosenzweig, A. MCP-1 and IL-8 Trigger Firm Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. *Nature* **1999**, *398* (6729), 718–723.
- (101) Tsutsumi, N.; Kimura, T.; Arita, K.; Ariyoshi, M.; Ohnishi, H.; Yamamoto, T.; Zuo, X.; Maenaka, K.; Park, E. Y.; Kondo, N.; Shirakawa, M.; Tochio, H.; Kato, Z. The Structural Basis for Receptor Recognition of Human Interleukin-18. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–13.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms6340>.
- (102) Meng, X.; Song, M.; Mezei, M.; Cui, M. NIH Public Access. **2011**, No. June. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.