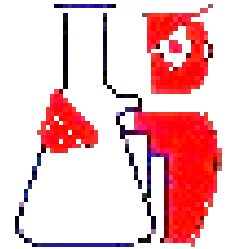




**BENÉMERITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**TESIS PROFESIONAL**

**ESTUDIO DE DOCKING EN  
MOLÉCULAS ANTICANCERÍGENAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICOFARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA**

**FAVIOLA VILLANUEVA PADILLA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO JAVIER MELENDEZ  
BUSTAMANTE**

**ASESOR DE TESIS: DR. RAMSES E. RAMIREZ GUTIÉRREZ**

MARZO 2016



**BUAP**

**M.C. JOSE DE GPE. QUIROZ OROPEZA**  
**DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
**P R E S E N T E**

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno  
de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
**VILLANUEVA PADILLA FAVIOLA**

realizada en el area de Físico-Química, comunican a Ud. la aprobación  
de la misma con la siguiente redacción:

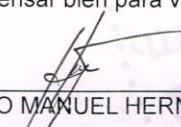
**ESTUDIO DE DOCKING EN MOLÉCULAS ANTICANCERIGENAS**

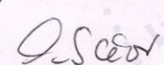
Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los  
11 dias del mes de Febrero de 2016

Atentamente


"Pensar bien para vivir mejor"



  
DR. JULIO MANUEL HERNANDEZ PEREZ

  
DR. THOMAS SCIOR

  
DRA. MARÍA EUGENIA CASTRO SÁNCHEZ

  
C.c.p. Archivo

Facultad  
de Ciencias  
Químicas

Av. San Claudio y 18 Sur,  
Edificio 105-H, Col. San Manuel,  
Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72540  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por haberme permitido terminar esta tesis y por estar conmigo en todo momento.

A la familia Valderrama Montaña por todo el cariño brindado durante todo el trayecto de la carrera, por tratarme como parte de su familia y estar presente en momentos tanto felices como críticos de mi vida.

Así mismo a la familia que va surgiendo a través de la vida, con quien te encariñas y te das cuenta que aunque no compartas sangre son parte de tu familia. Especialmente a Ross, Gabi, Liss, Cris, Abi, Yola, Freddy y Bray.

Manifiesto mi más sincera gratitud a todos los integrantes de la familia Arenas Saldaña por mostrarme su afecto y motivarme a seguir adelante.

Por otro lado a los antiguos y nuevos compañeros del laboratorio, de forma particular a Lucy y Sandy quienes me brindaron su amistad.

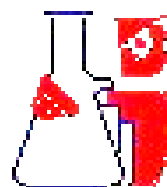
Además a mi familia quienes me han ayudado a crecer como persona, de manera especial a mis sobrinos porque quienes revivo parte de infancia.

Expreso mi agradecimiento al Doctor Francisco J. Meléndez Bustamante y al Doctor Ramsés E. Ramírez Gutiérrez por transmitirme parte de sus conocimientos, ayudarme en la realización de la tesis y principalmente por su paciencia.

Deseo agradecer a la comisión revisora: el Dr. Julio Manuel Hernández Pérez, Dra. María Eugenia Castro Sánchez y Dr. Thomas Scior por su amabilidad y por todas las contribuciones que ayudaron a enriquecer la tesis. Además a la Dra. Norma quien también contribuyo con sus aportaciones y comentarios para la tesis.



Agradecemos al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México y al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por facilitarnos el acceso a sus recursos computacionales para realizar los cálculos.



También agradezco al proyecto MEBF-NAT16-G de la Vicerrectoría y Estudios de Posgrado de la BUAP por la beca otorgada durante la realización de esta tesis. Por último, agradezco al BUAP-CA263 por el apoyo económico recibido y a la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP por el apoyo para la impresión de la tesis.

## ABREVIATURAS

VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VEGFR2	Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular 2
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de Estados Unidos
HF	Método Hartree Fock
RMSD	Raíz de la Desviación Cuadrática Media
HEN	Henatinib
PF00337210	PF
KI8751	KI
ZM323881	ZM

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Cáncer y angiogénesis</i> .....	3
2.1.2. <i>Familia VEGF</i> .....	5
2.1.3. <i>Receptores VEGFR</i> .....	6
2.1.4. <i>Mecanismo de activación del VEGFR2</i> .....	7
2.1.5. <i>Estructura de la proteína quinasa y estados activado e inactivado</i> .....	9
2.1.6. <i>Inhibidores tipo I y tipo II</i> .....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>14</b>
<b>5. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>5.1. ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER</b> .....	<b>15</b>
<b>5.2. HAMILTONIANO MOLECULAR</b> .....	<b>16</b>
<b>5.3. APROXIMACIÓN DE BORN-OPPENHEIMER</b> .....	<b>17</b>
<b>5.4 MÉTODO VARIACIONAL</b> .....	<b>18</b>
<b>5.5. DETERMINANTE DE SLATER</b> .....	<b>19</b>
<b>5.6. APROXIMACIÓN DE HARTREE-FOCK</b> .....	<b>20</b>
<b>5.7. MECÁNICA MOLECULAR</b> .....	<b>22</b>
<b>5.8. ACOPLAMIENTO MOLECULAR</b> .....	<b>23</b>
<b>5.9. EFECTO SOLVENTE</b> .....	<b>26</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>27</b>
<b>6.1 ESTRUCTURA MOLECULAR</b> .....	<b>27</b>
<b>6.2 ANÁLISIS RMN-H DE LA MOLÉCULA DE HENATANIB</b> .....	<b>29</b>
<b>6.3. MOMENTO DIPOLAR</b> .....	<b>29</b>
<b>6.4. CARGAS ESP</b> .....	<b>29</b>
<b>6.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR</b> .....	<b>29</b>
6.5.1. <i>Acoplamiento molecular forzado</i> .....	30
6.5.2. <i>Acoplamiento molecular ciego</i> .....	31
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>7.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR</b> .....	<b>32</b>

7.1.1.	<i>Acoplamiento molecular forzado</i>	32
7.1.2.	<i>Acoplamiento molecular ciego</i>	35
<b>7.2.</b>	<b>ANÁLISIS RMN-H DE LA MOLÉCULA DE HENATINIB</b>	51
<b>7.3.</b>	<b>MOMENTO DIPOLAR</b>	52
<b>7.4.</b>	<b>CARGAS ESP</b>	53
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	57
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	58

# 1. INTRODUCCIÓN

Nuestro cuerpo está compuesto por millones de células las cuales necesitan de oxígeno y nutrientes para su supervivencia pero, ¿quién es el encargado de darle estos requerimientos? nuestro cuerpo que está diseñado de forma perfecta, creó el sistema vascular para ello, el cual está constituido por vasos sanguíneos y linfáticos. Un vaso sanguíneo es una estructura hueca formada por células endoteliales que sirven de barrera selectiva al paso de sustancias. Gracias a esta permeabilidad es posible una transferencia eficiente y no exagerada de nutrientes, gases, líquidos, moléculas de señalización y células de la sangre necesarias para cubrir las exigencias de cada tejido y órgano.

De forma específica, la formación de vasos sanguíneos en el cuerpo humano se lleva a cabo mediante dos procesos: la vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis conduce a la formación de vasos sanguíneos a partir de células precursoras hematopoyéticas, mientras que la angiogénesis lo hace a partir de vasculatura existente, lo anterior significa que para llevar a cabo la angiogénesis primero tiene que surgir la vasculogénesis. Ambos procesos se realizan durante el desarrollo embrionario sin embargo, la angiogénesis es un proceso que se extiende a la vida postnatal.

La angiogénesis es un proceso altamente regulado por factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. Un factor pro-angiogénico crucial en la angiogénesis es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor por sus siglas en inglés) el cual se une a su receptor (VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor por sus siglas en inglés) en las células endoteliales y en consecuencia desencadena cascadas de señalización intracelular que conducen a la angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso importante en el desarrollo del cáncer. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor sólido determinado, entrar a un vaso sanguíneo y trasladarse a un sitio donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis.

Es así como el entendimiento del mecanismo de su funcionalidad se ha convertido en un potencial de estudio, especialmente la inhibición del receptor endotelial vascular. Se han diseñado fármacos que antagonizan este receptor, los cuales han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), que es la agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de Estados Unidos, entre dichos fármacos se encuentran Tivozanib, Axitinib, Motesanib y Linifanib que han mostrado hasta la fecha buenos resultados.

Un tarea importante en el diseño de este tipo de fármacos es predecir cómo la estructura farmacológica molecular se unirá al VEGFR, para esto se hace uso de la técnica *In silico* llamada acoplamiento ligando-receptor, acoplamiento molecular o Docking. Cabe mencionar que se han realizado estudios con esta técnica para este tipo de estructuras con una buena descripción del sistema molecular.

Por lo anterior expuesto, surge el interés por explorar esta herramienta computacional en estructuras anti-angiogénicas. A lo largo de este trabajo de tesis se estudiará un conjunto de moléculas farmacológicas que inhiben el receptor de crecimiento endotelial vascular para conocer el modo de unión de dichas estructuras en el receptor; ya que hasta el momento no tiene conocimiento.

Para efectuar el Docking se usó el programa computacional Autodock 4.2 para Windows. Para realizar la optimización de la estructura electrónica de los fármacos o también llamados ligandos, para lo cual se empleó el método Hartree Fock con la base cc-PVTZ que se encuentran implementados en el programa Gaussian09. Las estructuras optimizadas se obtuvieron tomando en cuenta el efecto del disolvente, en este caso se consideró como disolvente el agua, con el fin de representar lo que ocurre en el organismo humano. Para ello se usa el método SMD (Density-based Solvation Model, por sus siglas en inglés) implementado en el mismo programa.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS

#### 2.1.1. Cáncer y angiogénesis

El término angiogénesis fue acuñado en el año 1935 por el patólogo Arthur Herting [1], dicho término hace referencia a la generación de nuevos vasos sanguíneos a través de vasos ya existentes. Cabe mencionar que este proceso es fundamental durante el desarrollo embrionario, así como después del nacimiento para el crecimiento de los órganos, mientras que en la vida adulta es un proceso limitado a la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino [2].

A pesar de que la angiogénesis se mantiene en estado quiescente, puede ser activada mediante estímulos, los cuales son recibidos por las células endoteliales, no obstante la desregulación de este proceso genera la llamada angiogénesis patológica, mostrada en enfermedades tales como: artritis, enfermedad de Crohn, ceguera en diabetes, cáncer y otras enfermedades [3]. En el presente trabajo de investigación se abordará el cáncer.

El cáncer se caracteriza por un aumento desproporcionado en la masa del tejido afectado y la capacidad de movilizarse hacia nuevos sitios (metástasis) [4]. A nivel molecular, este crecimiento descontrolado es causado por mutaciones o cambios en la expresión de genes que promueven la progresión en el ciclo celular, favorecen la sobrevivencia celular o bien, codifican factores de crecimiento capaces de alterar el microambiente a favor del desarrollo de la masa tumoral; mediante la exacerbación de la angiogénesis [5].

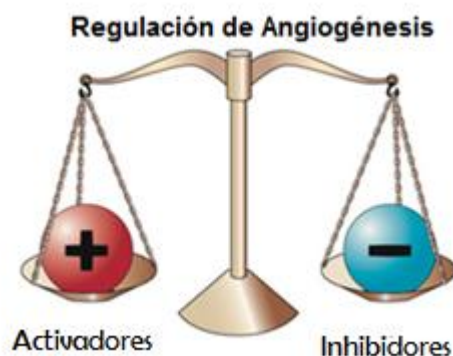
Para demostrar la relación cáncer-angiogénesis tuvieron que realizarse diversos experimentos. Uno de los primeros estudios se reportó en 1939 por Ide y col. quienes proponen que existen factores específicos que estimulan el crecimiento de la vasculatura, además sugieren que estos son liberados del tumor [6]. Posterior a ese trabajo en 1945, Algire y Chalkey realizan una observación microscópica en xenoinjertos tumorales implantados en ratones y concluyen que el crecimiento tumoral estaba vinculado a una red de vasculatura derivada del huésped [7].

Veintitrés años más tarde, se demuestra la existencia de un Factor Tumoral Difusible, que tiene la facultad de atraer nuevos vasos sanguíneos hacia el tumor que se está formando [8,9].

Con el conocimiento de trabajos de investigación previos, en 1970 Judah Folkman inició el diseño de ensayos biológicos para la angiogénesis y fue un año después que Folkman junto con su grupo de investigación explican que la angiogénesis es un conjunto de acciones que favorece el crecimiento tumoral, además observaron que sin el desarrollo de ella, el tumor sólo crecería de 2 a 3 mm [10-12].

Dada la complejidad de la angiogénesis, hoy en día se conoce que es un proceso sumamente regulado por factores anti-angiogénicos además de pro-angiogénicos [13]. Esta regulación se conoce como interruptor o switch y está encendido cuando ocurre la angiogénesis, por lo que se puede decir que en el cáncer se mantiene así, con el fin de favorecer el aumento de factores pro-angiogénicos y la disminución de los factores inhibidores de la angiogénesis (figura 1) [14].

Algunos de los factores anti-angiogénicos son trombospodina, interferones alfa, interleucina-10, interleucina-12 y factor plaquetario 4. Y algunos de factores pro-angiogénicos son el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos, angiopoyetina-1, interleucina-8 y el factor de crecimiento endotelial vascular [15].



**Figura 1.** La regulación de la angiogénesis se genera a través del equilibrio de factores pro y antiangiogénicos

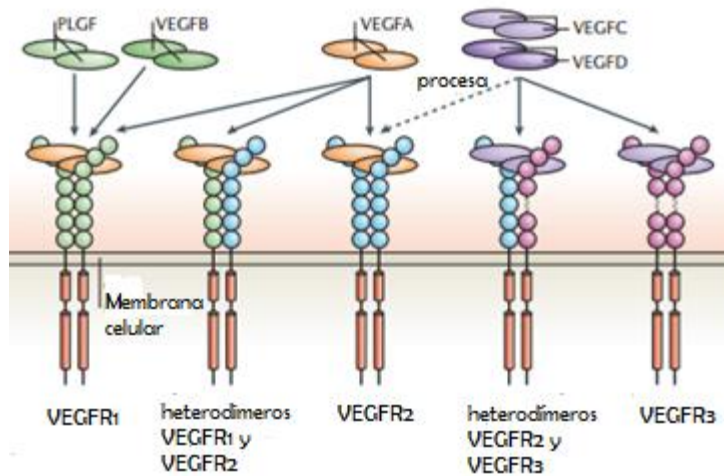
En el cáncer los factores pro-angiogénicos son liberados de las células cancerosas cuando se encuentran amenazadas por un ambiente hipóxico, luego de ser liberados, las células endoteliales reciben esos gradientes de concentración que estimulan la participación de diversos sistemas de receptores y cascadas de traducción que favorecen la remodelación de tejidos e inflamación, dos eventos asociados con la aparición y progresión del cáncer [16].

### 2.1.2. Familia VEGF

Mediante el desarrollo del campo de investigación en la angiogénesis, hoy en día se conoce que un factor esencial que regula dicho proceso es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) [17]. Este factor fue identificado en 1983 y recibió el nombre de Factor de Permeabilidad Vascular (VPF, por sus siglas en inglés). Independientemente, Ferrera y Henzel, describieron por primera vez un factor mitógeno al cual le asignaron el nombre de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular [18]. Connolly indagó sobre tales estudios y concluyó con sus experimentos que VPF y VEGF son la misma molécula [19].

Los miembros de la familia de los Factores de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGFs) son glicoproteínas diméricas de aproximadamente 40 KDa. Esta familia está constituida por cinco isoformas: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PLGF). El VEGFA es el miembro más estudiado, es la isoforma predominante del VEGF y es capaz de traducir las señales de forma más potente entre los distintos tipos de VEGFs. Por otro lado, al VEGFB se le involucra con el desarrollo de la arteria coronaria. Mientras que las isoformas VEGFC y VEGFD se les ha relacionado con el desarrollo del sistema linfático y la permeabilidad vascular. El último miembro PLFG originalmente se descubrió en la placenta, sin embargo, se encuentra presente en muchos tumores y en otras formas de angiogénesis patológicas [20].

Las diferentes isoformas de VEGF se unen a uno o más receptores de crecimiento endotelial vascular (figura 2), pero también pueden interactuar con correceptores como proteoglicanos de heparán sulfato, neuropilina-1 y neuropilina-2 lo que permite que haya más afinidad de unión a los receptores [21].



**Figura 2.** El VEGF en unión con los tres receptores conduce a la formación de receptores homodímeros y heterodímeros.

### 2.1.3. Receptores VEGFR

Los VEGFs se unen a los receptores VEGFR (figura 2), los cuales están constituidos por un N-terminal y por siete dominios de inmunoglobulina en la parte extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular constituido por un segmento yuxtamembrana, un dominio tirosina quinasa y la región carboxi-terminal [17] (figura 3).

Los receptores VEGFR son proteínas quinasas que catalizan la siguiente reacción:

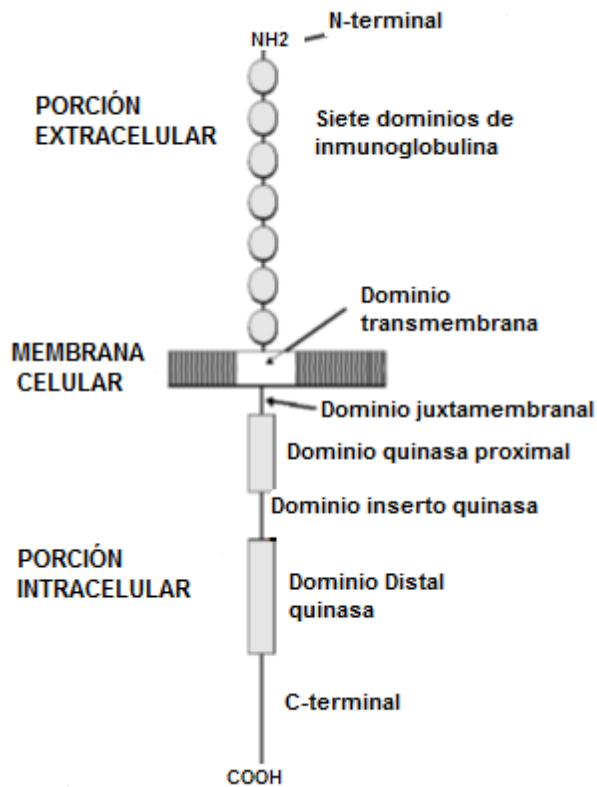


En la cual -OH es el grupo hidroxil de la tirosina; Mg magnesio; ATP representa Trifosfato de Adenosina; ADP se refiere a Difosfato de Adenosina y finalmente  $\text{PO}_3^-$  es el ion Fosfato.

Existen tres tipos de receptores: VEGFR1, VEGFR2, y VEGFR3, cada uno tiene funciones similares y específicas, así el VEGFR1 participa en el proceso de vasculogénesis, angiogénesis y motilidad de monocitos/macrófagos; el VEGFR2 además de estar involucrado en la vasculogénesis y la angiogénesis participa en la

motilidad de células endoteliales y el VEGFR3 se relaciona con el desarrollo de células endoteliales linfáticas.

Cabe resaltar que el VEGFR2 es el factor predominante en la angiogénesis. Este receptor es una glicoproteína de 200 KDa y se expresa en células neuronales, de la retina y hematopoyéticas. El VEGFR2 cuenta con residuos tirosina presentes en el dominio intracelular, algunos de los sitios de fosforilación descritos son Tyr 801, 951, 1054, 1059, 1175 y 1214 [17].



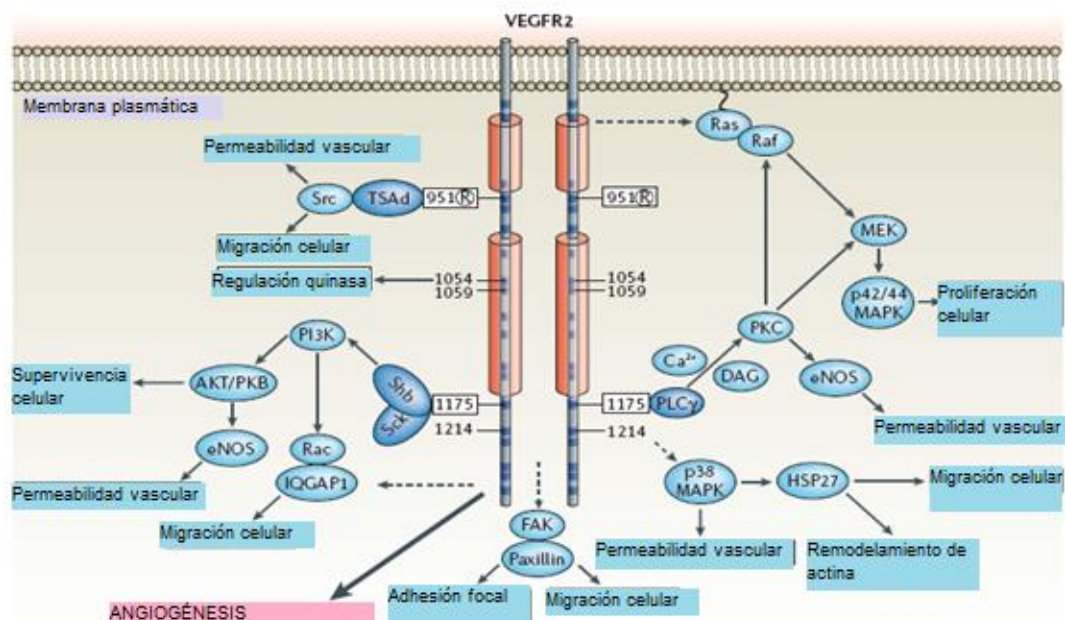
**Figura 3.** Composición y residuos importantes de receptor VEGFR2 de humano.

#### 2.1.4. Mecanismo de activación del VEGFR2

De forma breve, este mecanismo se presenta primero con la unión del VEGFA al VEGFR2 lo que causa la dimerización del receptor; en seguida se activa la proteína quinasa gracias a la autofosforilación, como consecuencia de ello se activan varias rutas intracelulares como: la cascada en la que participa la quinasa de adhesión

focal (FAK), que media la reorganización del citoesqueleto y la migración celular; la vía que activa la fosfolipasa C alfa que regula la permeabilidad vascular y la proliferación celular; y la cascada en la que participa la proteína Shb, que conduce a la permeabilidad vascular, supervivencia y migración celular (figura 4).

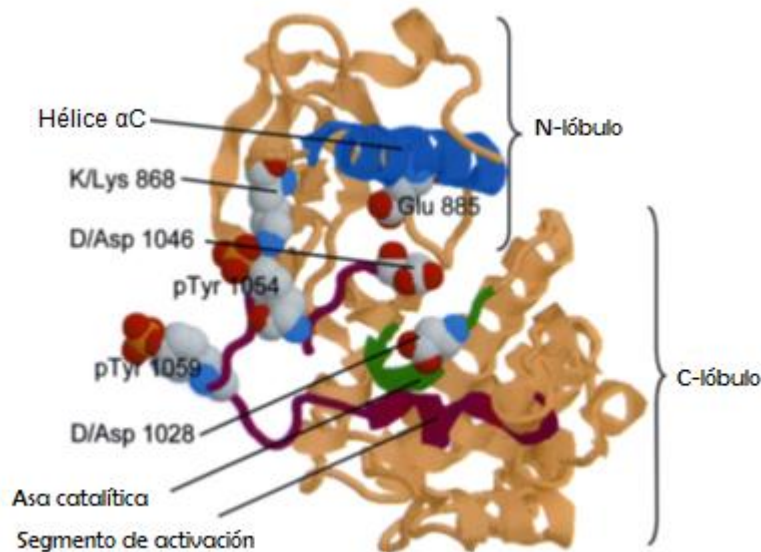
La investigación de este mecanismo ha sido ardua, a tal grado que ciertos investigadores han enfocado sus objetivos en el estudio del proceso de regulación. Tal es el caso de Jskal y colaboradores quienes han demostrado que la unión del VEGFA al receptor se lleva a cabo en el segundo y tercer dominio extracelular, además que la falta de estos dominios provoca que no se lleve a cabo la dimerización [21]. Por otro lado, Parast y colaboradores a través de los experimentos que realizaron concluyeron que la tasa de autofosforilación para el VEGFR2 ocurre en *trans* y no en *cis* [22], es decir, que deben participar dos receptores para llevar a cabo la autofosforilación, para lo cual primero un receptor funge como enzima, mientras que el otro como lo hace sustrato y viceversa.



**Figura 4.** Sitios de fosforilación del VEGFR2 y señal de transducción.

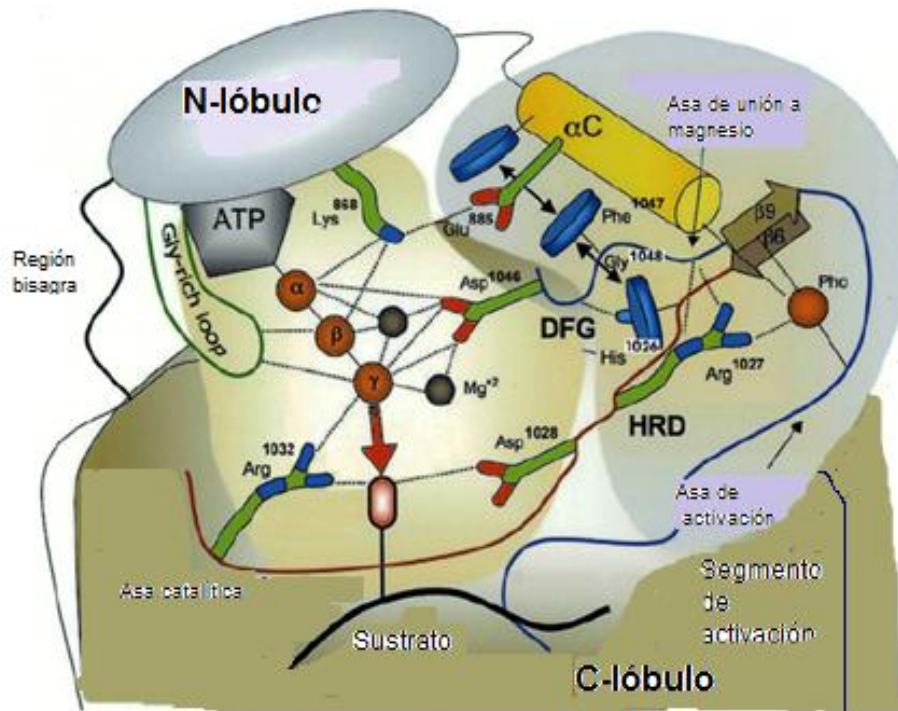
### 2.1.5. Estructura de la proteína quinasa y estados activado e inactivado

Las proteínas quinasa tienen una estructura bilobulada, constituida por el lóbulo pequeño N-lóbulo y el lóbulo largo C-lóbulo, los cuales se unen mediante un bucle denominado bisagra. El lóbulo N-lóbulo tiene predominantemente láminas  $\beta$  antiparalelas y una hélice  $\alpha$  (hélice  $\alpha C$ ), mientras que el C-lóbulo contiene en su mayoría  $\alpha$ hélices (figura 5).



**Figura 5.** Estructura del núcleo de la proteína quinasa catalítica del VEGFR2.

EL VEGFR2 tiene dos estados, el activado y el inactivado [22]. El estado activado tiene una conformación abierta, con el segmento de activación colocado lejos del sitio catalítico (figura 6), mientras que el estado inactivado se obtiene cuando el segmento de activación se une al sitio de unión de ATP bloqueando la entrada de esta molécula.



**Figura 6.** Diagrama de interacciones entre los residuos del núcleo catalítico del VEGFR2 humano, ATP y sustrato de la proteína. Se representan los residuos catalíticos importantes que están en contacto con ATP y la proteína sustrato en fondo ocre. Las estructuras secundarias y los residuos que involucran la regulación de la actividad catalítica aparecen en fondo gris. Las interacciones entre el grupo HRD, el grupo DFG y la  $\alpha$ C hélice se muestran en flechas negras mientras que los contactos polares se indican con líneas punteadas. El Phc se refiere a una fosfotirosina con el segmento de activación.

El segmento de activación contiene un dominio conservado DFG que puede adquirir las conformaciones DFGin y DFGout [22]. En la conformación inactiva la posición de la fenilalanina del fragmento DFG ocupa parcialmente el sitio de unión a ATP, debido a la ausencia de éste y el aspartato (del mismo dominio) no se une a ese sitio; lo que reprime la coordinación del magnesio que se requiere en la catálisis.

El cambio conformacional de quinasa inactiva (DFGout) a quinasa activa (DFGin) provoca que el aspartato del fragmento DFG ocupe el sitio de unión a ATP (figura 6) que había sido ocupada por la fenilalanina en la conformación DFGout, disponiendo a la quinasa para llevar a cabo la fosforilación [22].

Para que se lleve a cabo el ciclo catalítico, primero surge un cambio conformacional del estado inactivo al activo que involucra cambios tanto en el  $\alpha$ C hélice como en el segmento de activación. Posteriormente, en el estado activo los dos lóbulos se mueven uno respecto al otro y el ATP y la proteína sustrato se unen en la conformación abierta, la catálisis se origina en la conformación cerrada y el ADP y el sustrato fosforilado se liberan durante la progresión al estado abierto completando el ciclo.

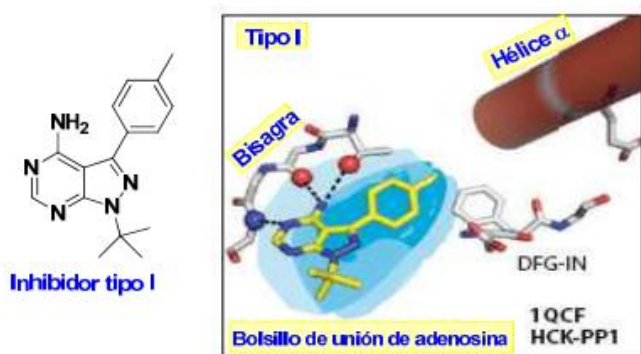
### 2.1.6. Inhibidores tipo I y tipo II

Se conocen estrategias convencionales para erradicar el cáncer como las quimioterapias, radioterapias y cirugías, sin embargo una diana molecular importante para combatir dicha enfermedad es la inhibición de la actividad quinasa.

Para que una proteína quinasa lleve a cabo su función, se requiere la unión de la proteína-sustrato y ATP, antes de que la actividad catalítica pueda transferir el fosfato. Es por ello que el diseño de fármacos inhibidores quinasa se basa en impedir la unión de ATP, o del sustrato, o de ambos de modo que quede bloqueada la proteína.

La inhibición de las quinasas se puede generar mediante dos tipos de inhibidores, los inhibidores tipo I y los inhibidores tipo II [23].

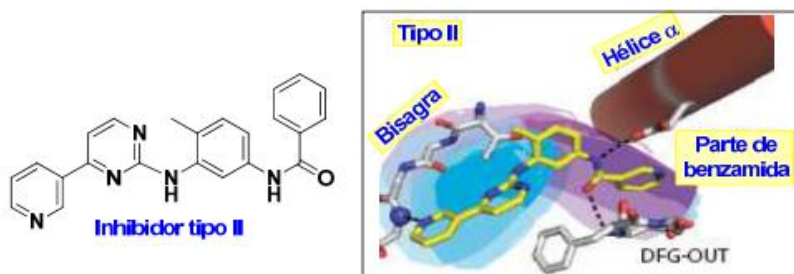
Los inhibidores tipo I se definen así por que ocupan la parte de adenosina de ATP, y se pueden unir tanto a la conformación inactiva (DFG out) como a la conformación activa (DFG in). Estos inhibidores tienden a formar aproximadamente de uno a tres puentes de hidrógeno con los residuos de la región bisagra (región donde se unen los extremos N- y C-terminal de los dominios quinasa) estos puentes de hidrógeno son similares a los que normalmente se forman con la adenina, además se forman interacciones hidrofóbicas alrededor de la zona ocupada por el anillo de adenina del ATP (figura 7) [23]. Las interacciones por puente de hidrógeno se pueden formar con los residuos Glu 915, Cys 917 y Asn 921 de la región bisagra.



**Figura 7.** Unión de un inhibidor tipo I con la quinasa

En contraste con los inhibidores tipo I, los inhibidores tipo II se unen sólo a la conformación inactiva (DFG out). Estos inhibidores además de ocupar el sitio de adenosina de ATP ocupan un sitio hidrofóbico que es adyacente al sitio de unión de ATP llamado sitio alostérico. En la parte del sitio alostérico, tienden a formar un puente de hidrógeno con el ácido glutámico (Glu 883) en la  $\alpha$  hélice y otro con el ácido aspártico (Asp 1044) del motivo DFG out [24]. A pesar de que es característico de los inhibidores Tipo II ocupar el sitio alostérico, estos pueden formar uno o dos puentes de hidrógeno con la región bisagra (figura 8) [23].

Según las estructuras cristalinas o de rayos-X que existen del receptor VEGFR2 con los inhibidores tipo II, se deben formar dos puentes de hidrógeno de los antes mencionados (ver párrafo anterior) e interacciones hidrofóbicas para considerarse un inhibidor de este tipo; los dos puentes de hidrógeno se pueden formar con el sitio alostérico o uno con el sitio alostérico y otro con la región bisagra.



**Figura 8.** Unión de un inhibidor tipo II al sitio de unión de ATP y al sitio alostérico de la proteína quinasa

## 3. JUSTIFICACIÓN

### 3.1 JUSTIFICACIÓN

Según las estadísticas del Informe Mundial contra el Cáncer 2015 de la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad aqueja a cerca de 8.2 millones de personas en todo el mundo, cifra que incluye 4 millones de muertes. Por lo tanto, esta enfermedad representa una de las prioridades en la Salud Pública dada la evolución ascendente de morbilidad, coste económico y problema sanitario y social que provoca.

Este trabajo se realiza con la finalidad de aportar a través de la Química Computacional, un modelo de inhibición del receptor de crecimiento endotelial vascular, en la enfermedad cáncer; problema que no sólo cobra importancia a nivel nacional sino también estatal, ya que datos del INEGI arrojan que Puebla ocupa el sexto lugar a nivel nacional de incidencia en cáncer de mamá y próstata.

La ventaja que ofrece la Química Computacional es que puede predecir diferentes propiedades químicas y mecanismos de reacción, disminuyendo tiempo y costos para estudiar y analizar diferentes propiedades.

En el presente trabajo, se hace uso de la Química Computacional para determinar el sitio y modo de unión que tiene un grupo de moléculas con el receptor de crecimiento endotelial vascular, ya que dichas moléculas no cuentan con una estructura cristalina. Esto con la finalidad de reportar qué tipo de inhibidores son las estructuras farmacológicas estudiadas, ya que hasta el momento no se encuentra reportado a qué tipo de inhibidores corresponden.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Utilizar la Química Cuántica y el acoplamiento molecular en un grupo de fármacos antiangiogénicos para describir el modo de unión en el VEGFR2.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Buscar, reunir y utilizar la información necesaria, tanto fisicoquímica, informática, como farmacológica, para la resolución de un problema biológico, mediante el uso de la técnica de acoplamiento molecular.
2. Obtener el receptor VEGFR2 y ligandos a partir del banco de datos RCSB Protein Data Bank.
3. Optimizar las estructuras con el método HF y la base cc-PVTZ en fase disolución con el método SMD y como disolvente agua.
4. Llevar a cabo el acoplamiento fármaco-receptor entre las estructuras antiangiogénicas y el VEGFR2 obtenido de la estructura cristalina 1Y6A, con la finalidad de conocer si el fármaco corresponde a un inhibidor tipo I.
5. Llevar a cabo la simulación de acoplamiento molecular entre las estructuras antiangiogénicas y el VEGFR2 obtenido de la estructura de rayos-X 1YWN, con el propósito de saber si alguna estructura es inhibidor tipo II.
- 6.- Determinar el momento dipolar de las cuatro estructuras antiangiogénicas.
- 7.-Determinar las cargas ESP de las estructuras farmacológicas.

## 5. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Al resolver las ecuaciones de la química cuántica es posible calcular la función de onda, a partir de la cual pueden predecirse propiedades físicas y químicas del sistema las cuales ayudan a la comprensión de un gran número de fenómenos.

### 5.1. ECUACIÓN DE SCHRÖDINGER

En 1926 Erwin Schrödinger representó la ecuación que permite describir cómo cambia la función de onda con las coordenadas y el tiempo, la cual es el punto de partida de toda descripción cuántica. Para el caso de una partícula la ecuación de Schrödinger está dada por la siguiente expresión

$$\left[ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right] \Psi(\vec{r}, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t}, \quad (5.1)$$

donde  $\hbar$  es la constante de Planck,  $m$  es la masa de la partícula,  $V$  es el potencial en el cual se mueve la partícula y  $\nabla^2$  es el operador Laplaciano. La ecuación de Schrödinger para un conjunto de partículas es similar, en tal caso  $\Psi$  es una función de las coordenadas de todas las partículas en el sistema así como del tiempo  $t$ . La función de onda no tiene significado físico sin embargo, el producto de la función de onda por su complejo conjugado sí, el cual es interpretado como la densidad de distribución de probabilidad de la partícula. Al resolver la ecuación de Schrödinger para  $\Psi$ , sujeta a las condiciones a la frontera establecidas, es posible obtener propiedades del sistema como la energía [25].

Utilizando el método de separación de variables en la ecuación de Schrödinger, la función de onda se puede escribir como el producto de una función espacial y una función temporal:

$$\Psi(\vec{r}, t) = \psi(\vec{r})\Phi(t). \quad (5.2)$$

Sustituyendo estas funciones en la ecuación (5.1) se obtienen dos ecuaciones, una que depende del tiempo y otra que es función de la posición de la partícula.

Los modelos computacionales basados en la mecánica cuántica tienen interés por la resolución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (expresada en la ecuación 5.3) donde se consideran a los estados estacionarios, los cuales no dependen del tiempo, es decir, la densidad de probabilidad no cambia con el tiempo y la energía es constante:

$$\left[ -\frac{h^2}{8\pi^2m} \nabla^2 + V \right] \psi(\vec{r},) = E\psi(\vec{r}), \quad (5.3)$$

donde  $E$  es la energía de la partícula y la entidad que aparece entre corchetes en esta ecuación es el operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ).

La ecuación (5.3) es una ecuación de valor propio ya que al aplicar el operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) sobre la función  $\psi(\vec{r})$  se obtiene como resultado la misma función multiplicada por la energía.

## 5.2. HAMILTONIANO MOLECULAR

Para la construcción del Hamiltoniano molecular, se consideran la mayoría de las interacciones posibles que intervienen en una molécula, como las generadas por los núcleos y los electrones. Una aproximación del Hamiltoniano para un sistema molecular completo se muestra en la ecuación (5.4), donde se consideran las interacciones de los núcleos y los electrones, pero se omiten las interacciones spin-órbita y todas las interacciones magnéticas y relativistas.

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{elec} \left( \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) - \frac{1}{2} \sum_{\mu=1}^{nucl} \left( \frac{\partial^2}{\partial x_\mu^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_\mu^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_\mu^2} \right) + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{\nu>\mu} \frac{Z_\mu Z_\nu}{|\vec{R}_\mu - \vec{R}_\nu|} - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{Z_\mu}{|\vec{r}_i - \vec{R}_\mu|} + \sum_{i=1}^{elec} \sum_{j>i} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} \quad (5.4)$$

donde  $\mu$  y  $\nu$  representan a los núcleos, mientras que  $i$  y  $j$  se refieren a los electrones,  $\vec{\mathbf{R}}_\mu$  y  $\vec{\mathbf{r}}_i$  corresponde a los vectores de posición de los núcleos y electrones respectivamente y  $Z_\mu$   $Z_\nu$  refiere al número atómico de los núcleos  $\mu$  y  $\nu$ .

Los dos primeros términos de la ecuación (5.4) son los operadores de energía cinética de los electrones y núcleos, respectivamente, mientras que los últimos tres términos conciernen a la energía potencial de las repulsiones de los núcleos, la atracción entre electrones y núcleos y la repulsión entre electrones, en ese orden.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para un sistema molecular, tiene la siguiente forma:

$$\hat{\mathbf{H}}\psi(\vec{\mathbf{r}}, \vec{\mathbf{R}}) = E\psi(\vec{\mathbf{r}}, \vec{\mathbf{R}}) \quad (5.5)$$

donde  $\psi$  es una función que depende de las componentes de los vectores de los electrones ( $\vec{\mathbf{r}}$ ) y los núcleos ( $\vec{\mathbf{R}}$ ) en la molécula.

### 5.3. APROXIMACIÓN DE BORN-OPPENHEIMER

Esta aproximación es un planteamiento básico en la mecánica cuántica y fue desarrollado por Born y Oppenheimer en 1927, este formalismo permite tratar por separado los movimientos electrónicos y los movimientos nucleares de un sistema molecular. Esta aproximación considera que las masas nucleares son mucho mayores que las electrónicas, por lo cual, al cambiar de posición los núcleos instantáneamente cambian los electrones (debido a su menor masa), consecuentemente la distribución electrónica dentro de un sistema molecular dado depende únicamente de la posición de los núcleos y no de su velocidad [26].

De acuerdo con la ecuación (5.4) el hamiltoniano molecular se puede expresar como:

$$\hat{\mathbf{H}}(\vec{\mathbf{r}}, \vec{\mathbf{R}}) = \hat{\mathbf{H}}_{el}(\vec{\mathbf{r}}, \vec{\mathbf{R}}) + \hat{\mathbf{T}}_N(\vec{\mathbf{R}}) \quad (5.6)$$

donde  $\hat{\mathbf{H}}_{el}(\vec{\mathbf{r}}, \vec{\mathbf{R}})$  es el hamiltoniano puramente electrónico

$$\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}) = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{elec} \left( \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2} \right) - \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{i=1}^{elec} \frac{Z_{\mu}}{|\vec{r}_i - \vec{R}_{\mu}|} + \sum_{i=1}^{elec} \sum_{j>i} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \sum_{\mu=1}^{nucl} \sum_{v>\mu} \frac{Z_{\mu} Z_v}{|\vec{R}_{\mu} - \vec{R}_v|}. \quad (5.7)$$

Por otro lado la función de onda puede ser expresada como producto de dos funciones:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \Phi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \Phi_N(\vec{R}) \quad (5.8)$$

por tanto sustituyendo en la ecuación (5.5) se tiene:

$$[\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}) + \hat{T}_N(\vec{R})] \Phi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \Phi_N(\vec{R}) = E \Phi_{el}(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \Phi_N(\vec{R}). \quad (5.9)$$

Considerando la configuración nuclear fija ( $\vec{R}_0$ ) los términos de energía cinética nuclear se omiten por lo que la ecuación de Schrödinger para el Hamiltoniano electrónico se expresa como:

$$\hat{H}_{el}(\vec{r}, \vec{R}_0) \Phi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) = E_{el}^n \Phi_{el}^n(\vec{r}, \vec{R}_0) \quad (5.10)$$

Al resolver la ecuación de Schrödinger electrónica para diferentes configuraciones nucleares ( $\vec{R}_k$ ), se genera una red de puntos de energía para cada estado electrónico  $n$  que constituye la superficie de energía potencial  $U_N^n(\vec{R}_k)$  para el movimiento de los núcleos en el campo promedio creado por los electrones.

Para resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para el hamiltoniano electrónico se recurre a una de las aproximaciones la aproximación del método variacional.

## 5.4 MÉTODO VARIACIONAL

Uno de los criterios más usados para adaptar funciones de base a un sistema es el método variacional. El método variacional es un método de aproximación para resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo.

Este teorema dice que dado un sistema con Hamiltoniano  $\hat{H}$ , si  $\Psi$  es una función normalizada que se comporta bien y que satisface las condiciones a la frontera del problema, se satisface:

$$\int \Psi^* \hat{H} \Psi d\tau \geq E_0, \quad (5.11)$$

donde  $E_0$  es el valor exacto o experimental de la energía del estado fundamental. En otras palabras, la energía del estado fundamental calculada con una función de onda aproximada es siempre el límite superior de la energía exacta. Esto asegura que dicha energía nunca será la más baja que la energía real del sistema y que cuanto más se mejore la representación de la función más cerca estaremos de la energía exacta.

Para utilizar el método variacional es necesario proponer la función de onda, una propuesta es expresarla como un determinante de Slater, el cual se describe a continuación.

## 5.5. DETERMINANTE DE SLATER

Este método matemático se llama así en honor al físico y químico teórico John C. Slater que propuso su utilización con el fin de asegurar que la función de onda electrónica sea antisimétrica respecto del intercambio de dos electrones.

Los determinantes de Slater se construyen a partir de funciones de onda monoeléctricas  $\phi(\chi_i)$  denominadas *spin-orbital*, es decir, para un sistema de N electrones se usa una función de onda para cada electrón independiente de las demás. Cada *spin-orbital* se expresa por:

$$\begin{aligned} \phi(\chi_i) &= \phi_i(r)\alpha(\omega) \\ \phi(\chi_{i+1}) &= \phi_i(r)\beta(\omega) \end{aligned} \quad (5.12)$$

Donde  $\phi_i(r)$  es un orbital espacial,  $\alpha$  o  $\beta$  son funciones de *spin* y  $\chi_i$  representa las coordenadas  $r$  y  $\omega$ .

Para puntualizar el determinante de Slater conviene concretar previamente el Producto de Hartree, el cual define la función de onda polielectrónica como un producto de orbitales moleculares monoeléctricos [27,28].

Por tanto el determinante de Slater queda representado por la ecuación (5.13), la cual considera el principio de Pauli, el cual menciona que la función de onda debe ser antisimétrica, es decir, que cambie de signo respecto al intercambio de coordenadas espaciales y de *spin*.

$$\Psi(\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\chi_1) & \phi_2(\chi_1) & \dots & \phi_N(\chi_1) \\ \phi_1(\chi_2) & \phi_2(\chi_2) & \dots & \phi_N(\chi_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \phi_1(\chi_N) & \phi_2(\chi_N) & \dots & \phi_N(\chi_N) \end{vmatrix} \quad (5.13)$$

donde  $(N!)^{-1/2}$  es el factor de normalización. Las filas de un determinante de Slater están definidas por los electrones y las columnas por los *spin*-orbitales.

## 5.6. APROXIMACIÓN DE HARTREE-FOCK

La finalidad de este método es buscar los *spin*-orbitales que minimicen la energía, tomando en cuenta el principio variacional y el determinante de Slater. A través del principio variacional se puede encontrar la mejor función de onda de un sistema molecular con lo cual la energía calculada sera igual o mayor a la energía exacta o experimental y mediante el determinante de Slater se obtendrá la función de onda polielectrónica establecida por el producto de funciones monoeléctricas.

Por tanto utilizar el principio variacional usando como función de prueba un determinante de Slater es posible minimizar la energía  $E_0$  con respecto a la función de onda que se puede calcular por:

$$E_0 = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \sum_a^N \langle \Psi_a(r_1) | h(r_1) | \Psi_a(r_1) \rangle + \frac{1}{2} \sum_a^N \sum_b^N \langle \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_a(r_1) \Psi_b(r_2) \rangle \quad (5.14)$$

$$-\langle \Psi_a(r_1)\Psi_b(r_2) | r_{12}^{-1} | \Psi_b(r_1)\Psi_a(r_2) \rangle$$

donde  $\hat{H}$  es el Hamiltoniano electrónico completo. El primer término de la ecuación (5.14) es el Hamiltoniano mono-electrónico o de *core*. En cual el operador  $h(r_1)$  está representado por:

$$h(r_1) = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad (5.15)$$

El segundo término en (5.14) se denomina integral de Coulomb y tiene el análogo clásico de la repulsión interelectrónica. El tercer término es la integral de intercambio, que aparece como consecuencia de la antisimetría de la función de onda de los electrones y no tiene un análogo clásico.

El método Hartree Fock busca los spin-orbitales  $\Psi_a$  que minimicen la energía de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$f|\Psi_a\rangle = \varepsilon_a|\Psi_a\rangle \quad (5.16)$$

En la cual  $f$  es el operador Fock, y depende de las soluciones de los orbitales  $\Psi_a$ .

El operador de Fock contiene una suma de operadores mono-electrónicos constituidos por una parte de energía cinética, otra de atracción núcleo-electrón y el potencial de HF, además incluye un promedio de los efectos de todos los otros N-1 electrones.

La solución de la ecuación de HF (ecuación 5.16) se resuelve iterativamente a través del método llamado campo autoconsistente, el cual determina la mejor función de onda electrónica posible y con ello la mejor energía electrónica.

En el presente trabajo además de utilizar la mecánica cuántica (mencionada en apartados anteriores) se utiliza la mecánica molecular, ya que es la base del acoplamiento molecular, por lo que la describiremos a continuación.

## 5.7. MECÁNICA MOLECULAR

Este método no es un método mecanocuántico y no usa un operador Hamiltoniano o función de onda molecular, sino que se basa en un modelo mecano clásico simple de la estructura molecular.

En este modelo, las moléculas son tratadas como un conjunto de esferas en el espacio, unidas entre sí mediante muelles y gobernadas por un conjunto de funciones de potencial mecánico clásicas

Estas fuerzas se pueden describir como funciones de energía potencial, de modo que a cada aspecto estructural (longitudes de enlace, diedros, interacciones no enlazantes, etc.), se le puede asignar un tipo de función. Al conjunto de estas funciones de energía potencial se le denomina “campo de fuerza” [25].

La mecánica molecular se basa en lo siguiente:

- ✚ Tratan las moléculas como conjuntos de esferas (átomos), con masa  $m$ , radio  $r$ , volumen  $V$ , unidos por muelles (enlaces) con constante  $K$  (asimilable a fuerza de enlace).
- ✚ No trata explícitamente los electrones.
- ✚ Para describir las diferentes interacciones: tensión de enlaces, flexión de ángulos y energías torsionales, así como interacciones no enlazantes, se utilizan funciones de potencial individuales.
- ✚ Las funciones de energía potencial se relacionan con parámetros derivados empíricamente que describen las interacciones entre los átomos.

donde:

$$E = \sum e_{ten} + \sum e_{flex} + \sum e_{ffp} + \sum e_{tor} + \sum e_{cruc} + \sum e_{vdw} + \sum e_{el} \quad (5.17)$$

$E$  es la energía potencial total de la molécula.

$e_{ten}$  es la suma de la energía del estiramiento de enlace.

$e_{flex}$  es la energía de flexión de ángulo de enlace.

$e_{ffp}$  es la energía de flexión fuera del plano.

$e_{tor}$  es la energía de torsión, que se relaciona con la rotación alrededor del enlace.

$e_{cruc}$  es la energía de interacciones entre estos átomos que producen un término cruzado.

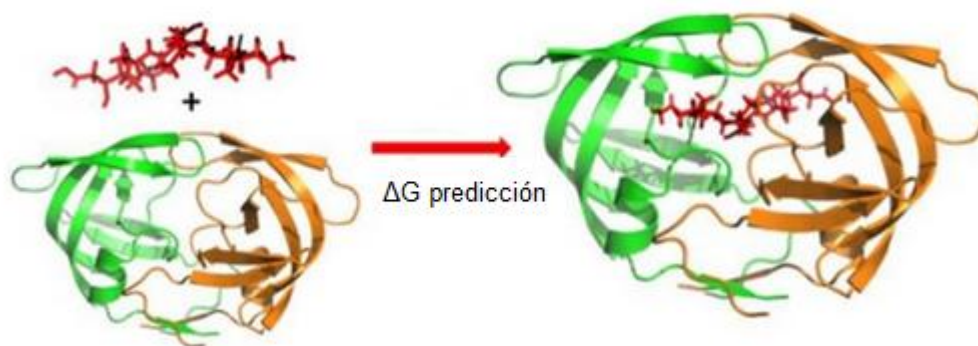
$e_{vdw}$  es la energía proveniente de las interacciones de van der Waals.

y  $e_{el}$  es la energía que corresponde a interacciones electrostáticas entre átomos.

✚ La suma de todas las interacciones determina la distribución espacial (conformación) de un conjunto de átomos.

## 5.8. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular, acoplamiento fármaco-receptor o también llamado Docking es una herramienta en el cual el ligando se une a una proteína de interés. El enfoque de esto es simular computacionalmente el proceso de reconocimiento celular, para alcanzar una conformación óptima tanto para la proteína, como para su ligando, haciendo que la orientación entre estos minimice la energía libre y permita predecir si la unión se llevara a cabo o no. El acoplamiento molecular es una herramienta clave en el diseño de fármacos asistido por computadora. El objetivo es predecir el modo predominante de unión de un ligando con una estructura proteica (figura 9).



**Figura 9.** Acoplamiento molecular, Acoplamiento Fármaco-Receptor o Docking

El acoplamiento molecular tiene una amplia variedad de usos y aplicaciones en el descubrimiento de fármacos, incluyendo la búsqueda de estructuras potenciales y estudios de estructura-actividad.

Actualmente, existen una gran variedad de programas de acoplamiento molecular, tales como DOCK (académico) [29], AutoDock (acceso libre) [30-31], FlexX (comercial) [32-33], FlexE (comercial) [34], GEMDOCK (libre) [35], MEdock (libre) [36], MolDock (académico) [37], Tribe-PSO (libre)[38], SODOCK (académico) [39], Surflex (comercial) [40], GOLD (comercial) [41-43], ICM-PRO (comercial) [44,45], Glide (comercial) [46], Cdocker (comercial) [47], LigandFit (comercial) [48], MCDock (académico) [49], RDock (académico) [50], ZDock (académico) [51], M-ZDOCK (académico) [52], MSDOCK (académico) [53], entre otros.

En la mayoría de estos programas, la primera etapa de un estudio de acoplamiento implica la definición de una región de unión, es decir, un área en la proteína en la que el ligando se puede anclar. En este caso, toda la superficie del objetivo se escanea para explorar los diferentes sitios de unión [54]. El siguiente paso consiste en la búsqueda de los modos de unión (posición y conformación preferida).

Para este fin, se utilizan dos tipos de algoritmos: el algoritmo de búsqueda y la función de puntuación. El primero genera la búsqueda espacial de todas las

conformaciones y orientaciones posibles que pueden haber en el conjunto proteína-ligando.

El número de algoritmos de búsqueda disponibles está aumentando continuamente, para optimizar la velocidad, fiabilidad, la cobertura y la precisión en el muestreo del espacio de interés. Actualmente, estos algoritmos pueden ser clasificados en rígidos, ligando flexible y proteína flexible.

Por otro lado, una función de puntuación calcula cierta energía que estima la afinidad entre la proteína y el ligando para cada unión y posteriormente clasifica las diferentes uniones que son generadas por el algoritmo de búsqueda. Este valor debe idealmente representar la termodinámica de la interacción del sistema de proteína-ligando (la energía libre de unión) con el fin de distinguir correctamente los verdaderos modos de unión [55]. Al final de este proceso, la mejor solución-debe corresponder al verdadero modo de unión y debe ser muy próxima a la observada experimentalmente.

En términos generales, las funciones de puntuación pueden ser agrupadas en cuatro categorías principales: funciones de puntuación del campo de fuerza, funciones de puntuación empíricas, basadas en el conocimiento y puntuaciones de consenso.

Termodinamicamente, la fuerza de interacción entre una proteína y un ligando es descrita por la afinidad de unión o energía libre de unión (Gibs). asumiendo una sencilla reacción de equilibrio de la siguiente forma



donde P es la proteína, L ligando y PL el complejo, la constante de disociación  $K_d$ , (o constante de unión) se utiliza generalmente para describir la estabilidad de la formación de complejos:

$$K_d = [P][L]/[PL] \quad (5.19)$$

Esta ecuación se relaciona con la siguiente

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_d \quad (5.20)$$

donde

R es la constante de los gases (8.314 J/molK) y T es la temperatura.

En términos generales, un método de acoplamiento molecular debe ser capaz de estimar la interacción entre el receptor y el ligando y este valor debe ser proporcional a la energía libre de unión; clasificándolos correctamente y permitiendo acercarse a lo que se observa experimentalmente.

Debido a que en este trabajo se optimizaron las estructuras moleculares en fase disolución hablaremos un poco del modelo SMD (Density-based Solvation Model, por sus siglas en inglés) en el siguiente apartado.

## 5.9. EFECTO SOLVENTE

La interacción entre el solvente y el soluto impactan en la química general de la molécula en estudio, tal interacción puede alterar la energía, la estabilidad y la orientación molecular. Así las propiedades relacionadas con la energía (frecuencias vibracionales, espectro, etc) pueden cambiar. Por tanto es importante tomar en cuenta los modelos de disolución en las moléculas en estudio con el fin de que la simulación molecular sea la más cercana a la realidad.

El modelo SMD intenta utilizar la densidad electrónica para estimar el área accesible al disolvente de la superficie y las tensiones superficiales atómicas para determinar la cavidad y las energías de repulsión y dispersión.

## 6. METODOLOGÍA

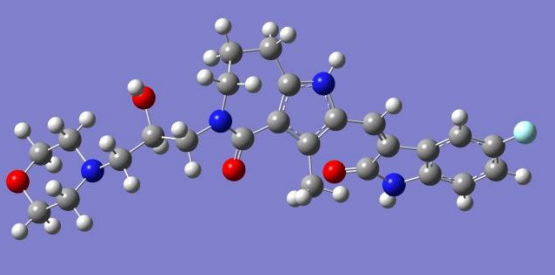
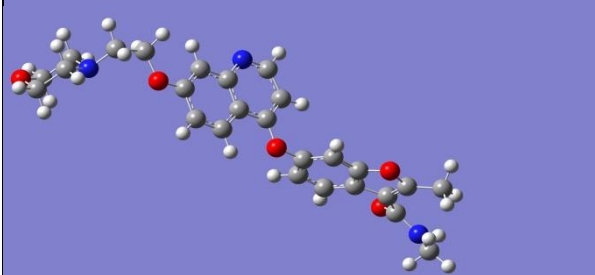
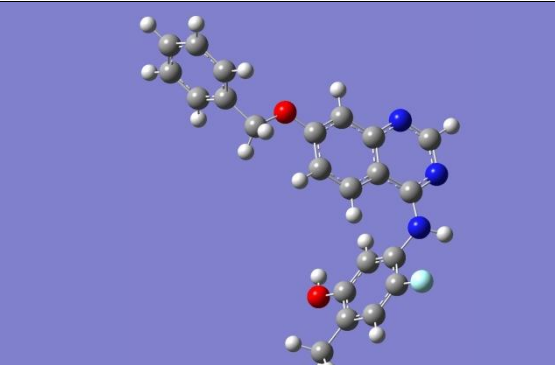
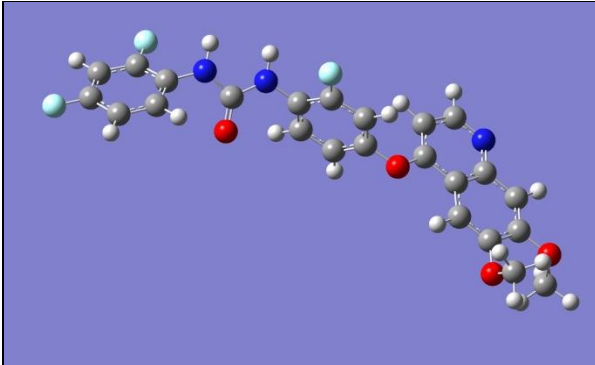
La metodología se divide en tres secciones: Estructura Molecular, acoplamiento molecular, Momento Dipolar y cargas ESP.

### 6.1 ESTRUCTURA MOLECULAR

Se definieron las estructuras moleculares de cuatro compuestos anti-angiogénicos las cuales se construyeron en el programa Spartan 08 V1.2.0 y cuyas estructuras se presentan en la tabla 1.

Los cálculos computacionales se llevaron a cabo con el paquete mecánico cuántico Gaussian 09 [56], optimizando las estructuras moleculares anti-angiogénicas, sin restricciones a nivel de teoría Hartre Fock [57] y la base cc-pVTZ [58] en fase acuosa (constante dieléctrica de 78.5) usando el modelo SMD (Density-based Solvation Model, por sus siglas en inglés) [59] al mismo nivel de teoría a temperatura de 25°C. La única molécula que contaba con rayos X era PF00337210, la cual se extrajo del PDB y se optimizó con el mismo método y base antes mencionada. Por otra parte se realizaron cálculos de frecuencias para corroborar que las estructuras corresponden a un mínimo en la superficie de energía potencial.

La optimización de la geometría se utiliza para localizar la conformación más estable y de mínima energía de cada una de las estructuras. Las propiedades físicas y químicas dependen de las geometrías caracterizadas por las distancias de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión, siendo estos últimos los de mayor variación.

HEN*	PF
	
ZM	KI
	

**Tabla 1.** En la tabla aparecen las abreviaturas de las estructuras antiangiogénicas HEN corresponde a Henatinib [60,61], PF es PF00337210 [62], ZM pertenece a ZM323881 [63] y KI a KI8751 [64].

## 6.2 ANÁLISIS RMN-H DE LA MOLÉCULA DE HENATANIB

Se realizó una búsqueda completa en diferentes bases de datos de la estructura cristalina de la molécula Henatinib, lamentablemente no se encontraron rayos-X de dicha molécula, sólo se encontró desde el punto de vista experimental, el espectro RMN de protón (RMN-H) [60,61]. En este trabajo se realizó el cálculo RMN-H con el método GIAO [65] (Gauge-Independent Atomic Orbital, por sus siglas en inglés) a partir de la geometría optimizada en fase disolución para comparar su espectro experimental y determinar de esta manera la forma de la estructura molecular más parecida a la estructura experimental.

## 6.3. MOMENTO DIPOLAR

Se calculó el momento dipolar teóricamente de las estructuras moleculares con el método HF [57] y la base cc-PVTZ [58] en fase disolución usando el modelo SMD (Density-based Solvation Model, por sus siglas en inglés) [59] para ver si existía una relación con la concentración máxima inhibitoria (IC50).

## 6.4. CARGAS ESP

Con el fin de describir las zonas a diferente tipo de ataque se determinaron las cargas ESP (electrostatic potencial, por sus siglas en inglés) en las cuatro moléculas de estudio para ver que átomos son los más susceptibles a recibir un ataque electrofílico y nucleofílico. El átomo con la carga más pequeña es el átomo más dispuesto a recibir un ataque electrofílico y el átomo con mayor carga es el átomo susceptible a recibir un ataque nucleofílico.

## 6.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Se llevó a cabo un estudio de Acoplamiento Fármaco-Receptor para investigar los posibles modos de unión de las estructuras anti-angiogénicas con el receptor

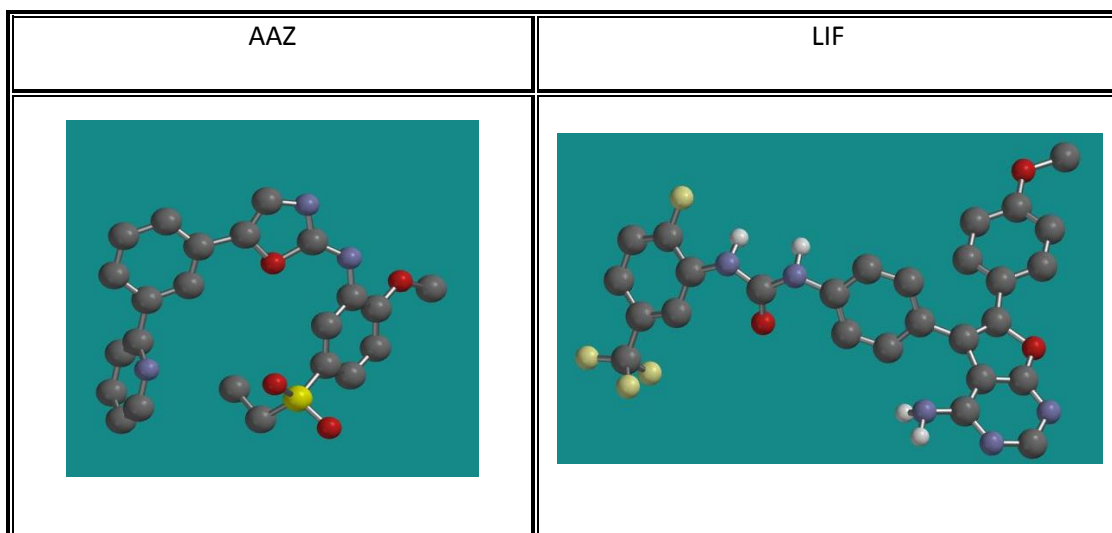
VEGFR2, utilizando el software Autdock 4.2 [30-31]. Los rayos X de la estructura cristalina de VEGFR-2 se obtuvieron de la base de datos Protein Data Bank [66]. El acoplamiento molecular se llevó a cabo utilizando dos metodologías: acoplamiento molecular forzado y acoplamiento molecular ciego.

### 6.5.1. Acoplamiento molecular forzado

Este estudio se utilizó con la finalidad de obtener controles positivos, es decir comprobar lo que se tiene en la base de Datos Protein Data Bank con lo que se obtiene en el acoplamiento molecular, con el fin de que se obtenga el mismo sitio y modo de unión del ligando dentro del receptor, tal como aparece en la estructura cristalina. En el presente trabajo se realizan dos pruebas de acoplamiento molecular forzado y se calculó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD, Root mean square deviation, por sus siglas en inglés) para evaluar la semejanza de la estructura cristalina y el acoplamiento molecular.

El primer cálculo se lleva a cabo con un inhibidor del que se tiene conocimiento que es inhibidor tipo I (AAZ, ID PDB) y el receptor VEGFR2 en su conformación DFG out. Para ello se obtuvo la estructura cristalina 1Y6A (ID PDB) [67], posteriormente, se extrae el ligando del complejo y se separan las coordenadas del ligando y del receptor. A continuación se realiza el acoplamiento molecular, en el cual se debe obtener la misma orientación y posición de los rayos-X.

El segundo acoplamiento molecular se realiza con el ligando LIF (ID PDB), el cual se sabe que es un inhibidor tipo II y el receptor VEGFR2 en su conformación DFG out obtenido de la estructura cristalina 1YWN (ID PDB) [68]. Para ello se extrae el ligando y el receptor VEGFR2 del complejo, posteriormente se realiza el acoplamiento fármaco-receptor y se compara con la estructura cristalina.



**Tabla 2.** Estructura de los ligandos AAZ y LIF extraídos de la base de datos PDB.

### 6.5.2. Acoplamiento molecular ciego

En este tipo de acoplamiento molecular se ejecuta cuando no se conoce el sitio y modo de unión del ligando dentro del receptor, en este caso se conoce el sitio de unión por lo que se utiliza éste cálculo para describir el sitio de unión de las moléculas en estudio y el VEGFR2 y el modo de unión.

El grupo de estructuras moleculares de interés no cuentan con una estructura cristalina por lo que se utilizó la metodología de acoplamiento molecular ciego, el objetivo es describir el sitio y modo de unión en el receptor VEGFR2 y conocer si alguna de las estructuras es inhibidor tipo I o tipo II.

Para lograr dicho objetivo se realizan dos cálculos:

- ✚ El primero con la idea fundamental de conocer si la molécula farmacológica es inhibidor tipo I, para ello se utilizan las estructuras de interés de la Tabla 1 y el receptor VEGFR2 obtenido de la estructura cristalina 1Y6A (ID PDB). Para considerar un inhibidor tipo I se debe formar de uno a tres puentes de hidrógeno con los residuos de la región bisagra, Cys 917, Glu 915 y Asn 921 (figura 7).

- ✚ El segundo cálculo es para descartar si alguna estructura es inhibidor tipo II, para ello se utilizan las moléculas de la Tabla 1 y el receptor VEGFR2 de la estructura cristalina 1YWN (ID PDB). Para considerarlos así se deben formar al menos dos puentes de hidrógeno, ya sea dos puentes de hidrógeno con el sitio alostérico (Glu 883 o Asp 1044) o uno con el sitio alostérico y otro con un residuo de la región bisagra (ya sea Cys 917, Glu 915 o Asn 921) (figura 8).

Gracias a la metodología anterior se pudieron encontrar resultados interesantes en este estudio y que son discutidos en el siguiente capítulo.

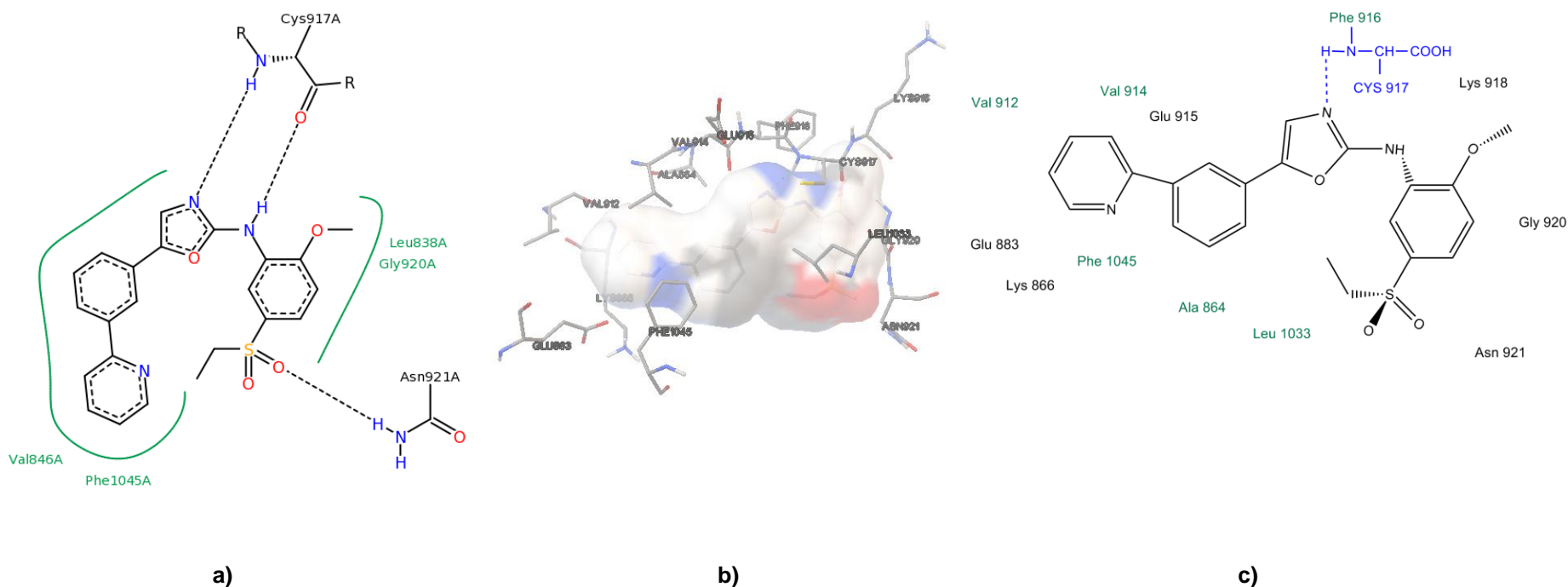
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

#### 7.1.1. Acoplamiento molecular forzado

Los resultados en esta sección son importantes, ya que por medio del acoplamiento molecular forzado podemos concretar si el uso de la metodología es la correcta para el grupo de moléculas de estudio. Si los controles no resultan confiables ( $RSMD > 2 \text{ \AA}$ ), esto nos advierte que se debe de cambiar de algoritmo.

En la figura 10 y 11 se muestran los controles positivos para el inhibidor tipo I e inhibidor tipo II y se muestra que cumple con las interacciones que tiene en la estructura cristalina. Además se obtiene un RSMD en el primer caso de 0.730 y el segundo 0.217 con lo cual se demuestra que los resultados son confiables, ya que la bibliografía reporta que se debe tener como máximo un valor de 2 Å.

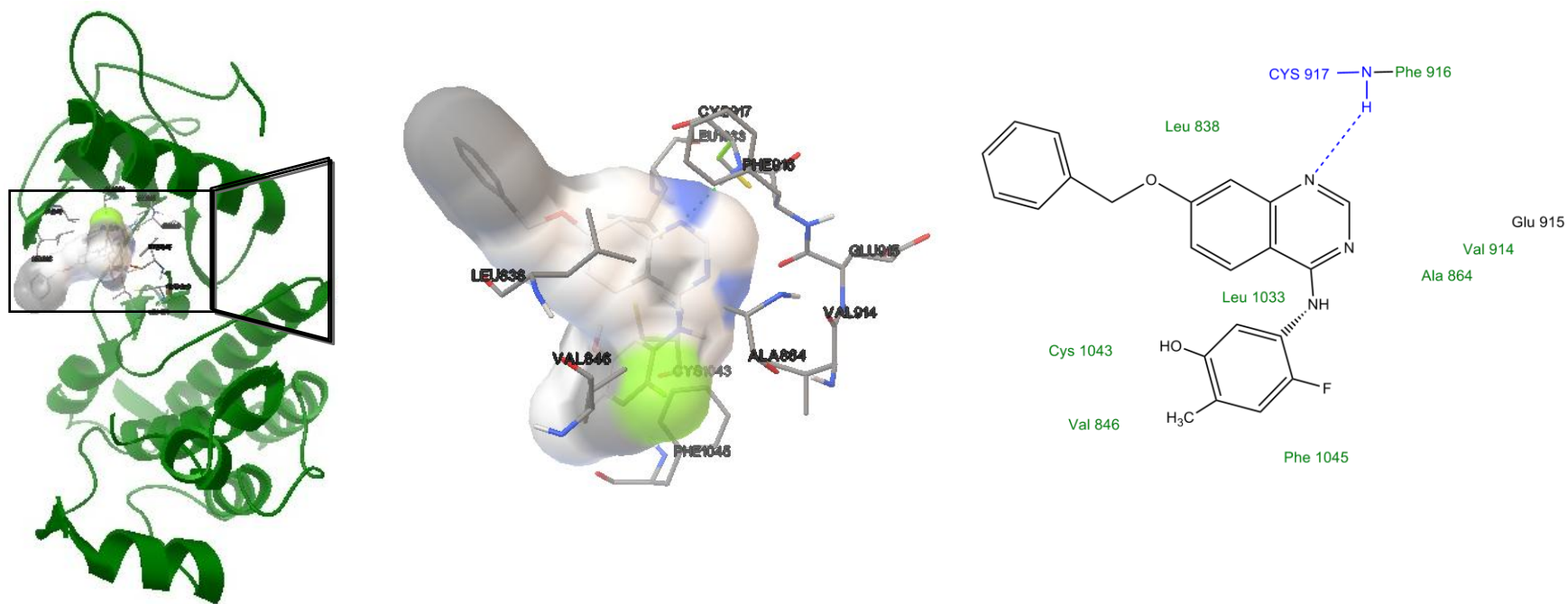


**Figura 10. a)** Estructura cristalina de 1Y6A [67] donde se muestran interacciones hidrofóbicas y por puente de hidrógeno **b)** Acoplamiento molecular forzado realizado en Autodock 4.2 para obtener control positivo para inhibidor Tipo I **c)** Acoplamiento molecular forzado realizado en Autodock 4.2 en dos dimensiones.

En la figura 10 se muestra que en la estructura cristalina se forman tres puentes de hidrógeno, dos con Cys 917 y el otro con Asn 921, además se observan interacciones hidrofóbicas. Por otro lado, la figura contiene el acoplamiento molecular realizado en Autodock 4.2 donde se muestra un puente de hidrógeno con Cys 917 e interacciones hidrofóbicas. A pesar de que el acoplamiento molecular realizado en Autodock 4.2 no cuenta con las tres interacciones por puente de hidrógeno se considera un control positivo ya que el RMSD es menor a 2 Å.



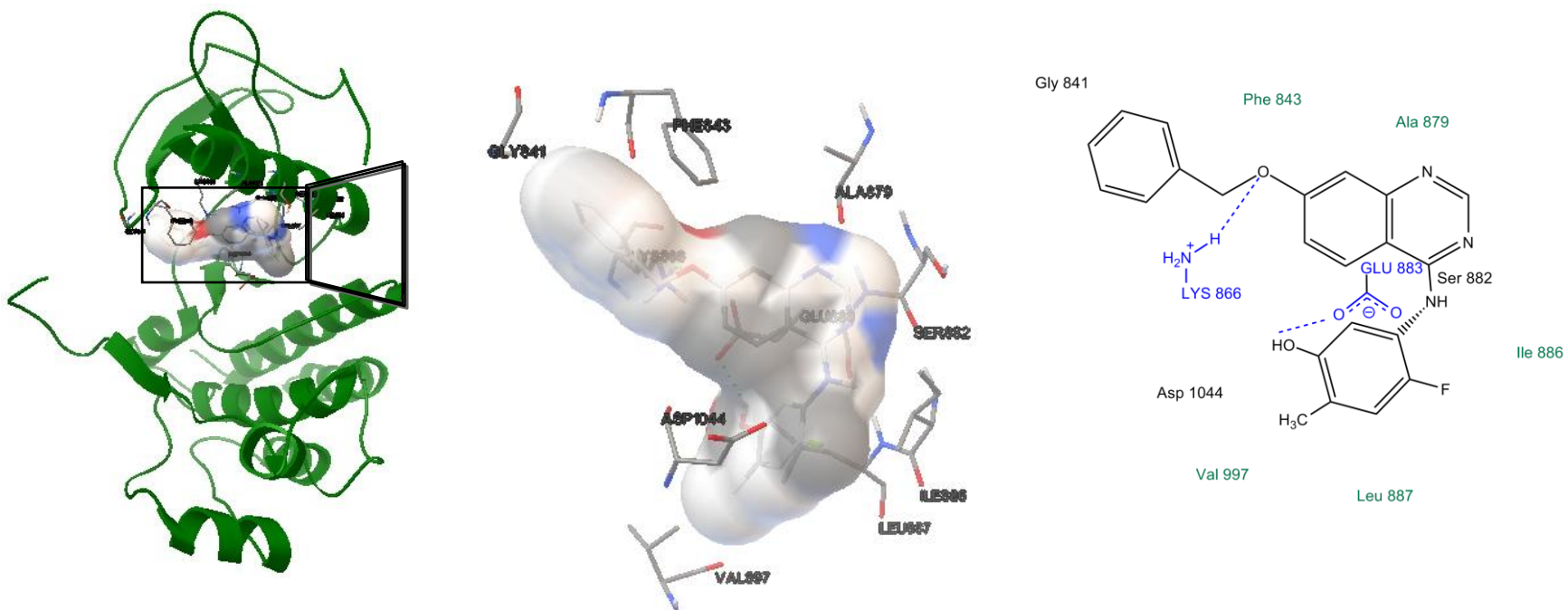
## 7.1.2. Acoplamiento molecular ciego



**Figura 12.** Acoplamiento molecular de ZM con el VEGFR2 (estructura cristalina 1Y6A). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrogeno.

En la figura 12 la estructura molecular se une al receptor en la parte denominada bisagra desde el residuo Val 914 hasta la Cys 917, dentro de éstas interacciones se forman un puente de hidrógeno con nitrógeno de la quinazolina del ZM y el hidrógeno del NH de la Cys 917. Las interacciones restantes se unen al receptor en las láminas  $\beta$ plegadas del N-lóbulo.

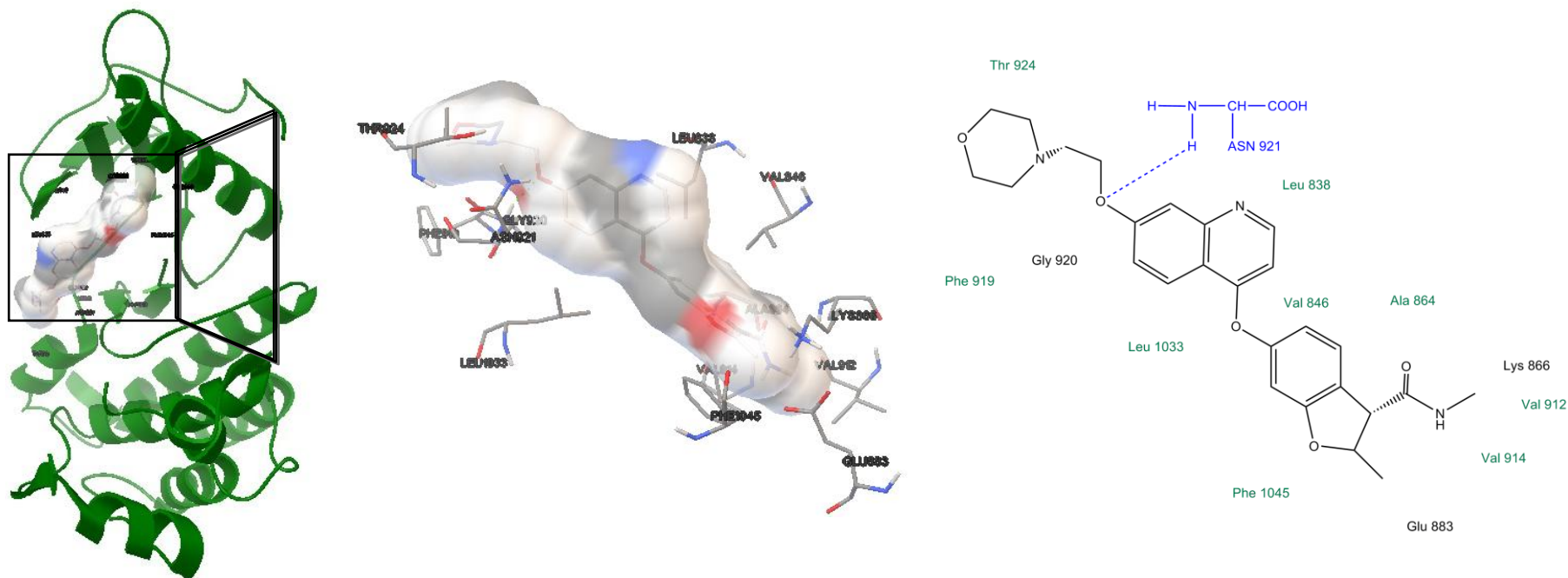
La estructura farmacológica PF es antagonista del receptor VEGFR2 en su conformación DGFout (estructura cristalina 1Y6A) debido a que en el acoplamiento molecular se forma un puente de hidrógeno con la Cys 917 un residuo de interés para la inhibición, considerándolo un inhibidor tipo I[23].



**Figura 13.** Acoplamiento molecular de ZM con el VEGFR2 (estructura cristalina 1YWN). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

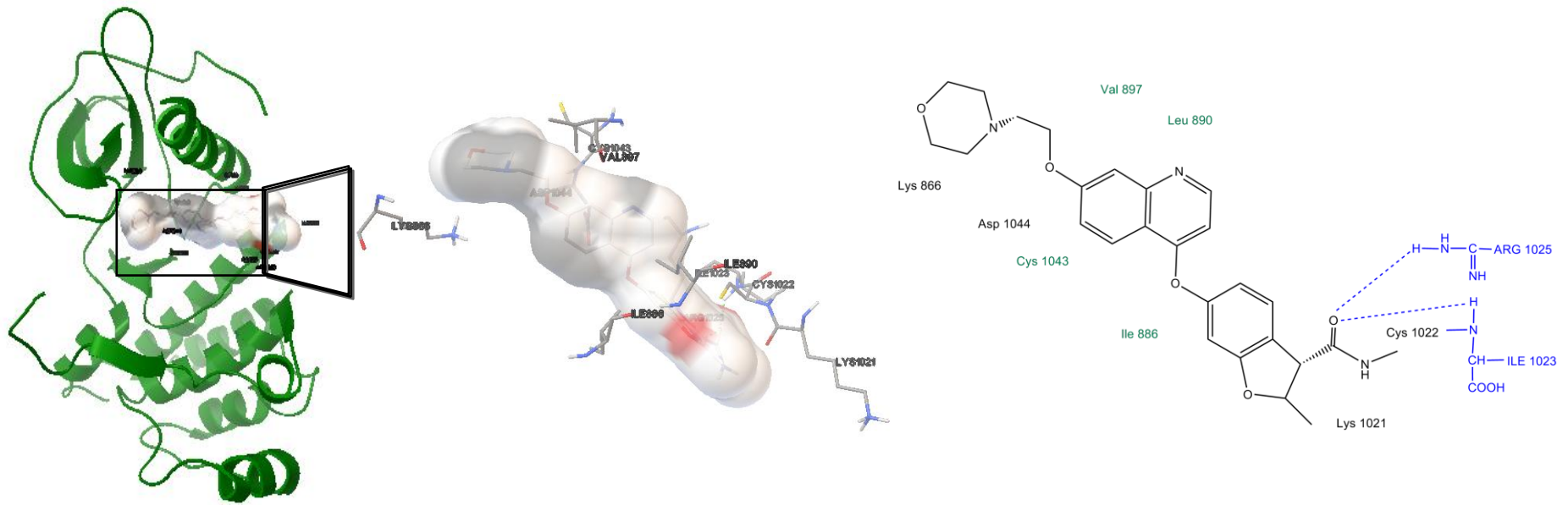
En la figura 13 se muestra que ZM se une en la  $\alpha$ -hélice desde el aminoácido Ala 879 hasta Leu 887. Además se forman dos puentes de hidrógeno, uno con el OH de ZM y el oxígeno del grupo carboxilo de la Glu 883 y otro con el oxígeno de ZM y el hidrógeno de la Lys 866. De acuerdo a lo anterior la estructura ZM no se consideraría un inhibidor tipo II, ya que no cuenta con los dos puentes de hidrógeno característicos [24].

Comparando los acoplamientos moleculares anteriores, se observa que aunque es la misma estructura la que se utiliza como ligando el sitio de unión es diferente, sin embargo, la posición de ZM se mantiene ligeramente similar en el receptor en ambos acoplamientos.



**Figura 14.** Acoplamiento molecular de PF con el VEGFR2 (estructura cristalina 1Y6A). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

El acoplamiento molecular (figura 14) muestra que PF se une en un sitio alejado del asa de activación. Asimismo, también se puede observar que la estructura farmacológica forma en su mayoría interacciones hidrofóbicas. Se acopla en el sitio de unión al ATP en el residuo Lys 866 y se puede observar que en la región bisagra se forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del ligando y el hidrógeno del NH de la Asn 921, gracias a esta última interacción se considera que esta molécula es un inhibidor tipo I [23].

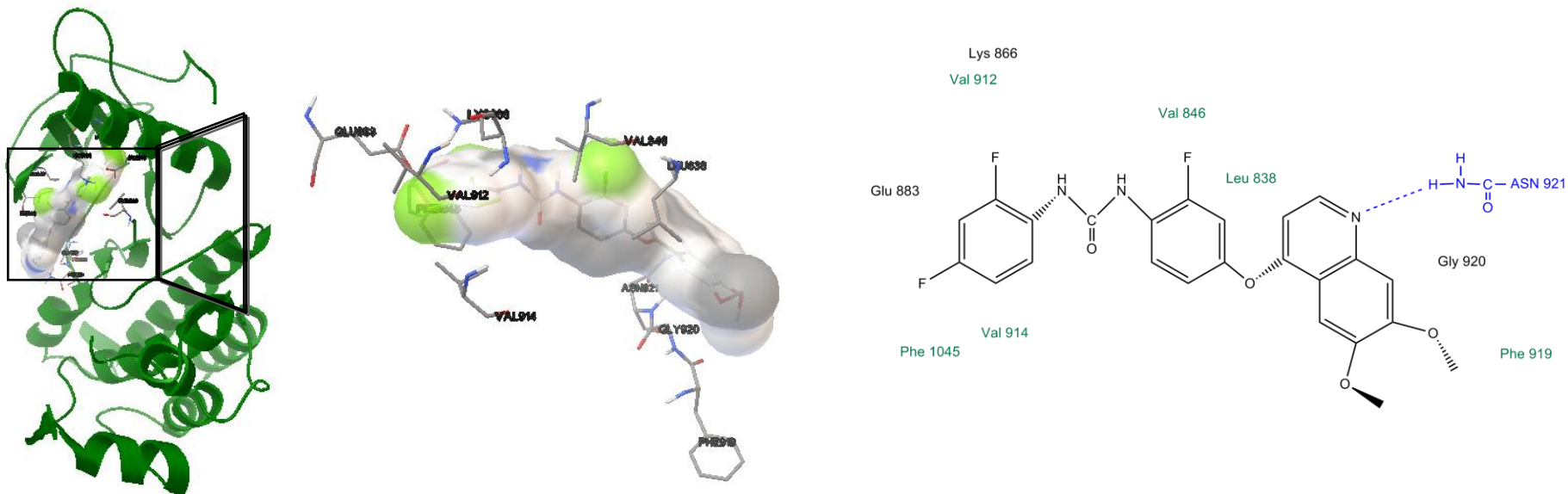


**Figura 15.** Acoplamiento molecular de PF con el VEGFR2 (estructura cristalina 1YWN). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

En la figura 15, se observa que la estructura farmacológica se acopla en el asa de activación y en la  $\alpha$ -hélice, de forma contraria al acoplamiento molecular anterior, además la orientación y el sitio de unión del mismo cambia.

Por otro lado, PF se une al VEGFR-2 en el sitio de unión a ATP en el residuo Lys 866, en la  $\alpha$ -hélice en el aminoácido Ile886 y Val 897, mientras que el asa de activación se acopla desde Lys 1021 a Arg 1025, donde forma dos puentes de hidrógeno y se une al sitio alostérico con el residuo Asp 1044.

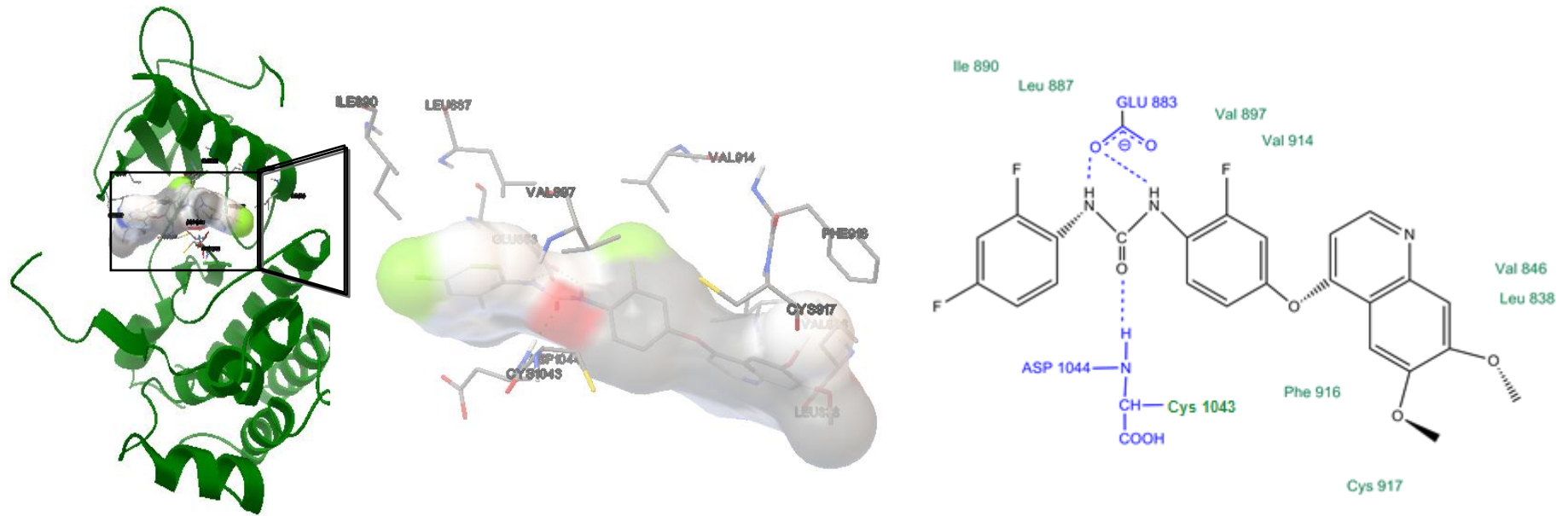
De acuerdo con la figura 15, se observa que la mayor energía de interacción se localiza en el asa de activación, esto se debe a los dos puentes de hidrógeno que se forman, no obstante éstos no son los residuos que caracterizan a un inhibidor tipo II [24].



**Figura 16.** Acoplamiento molecular de KI con el VEGFR2 (estructura cristalina 1Y6A). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrogeno.

De la figura 16 se observa que KI se une con el sitio de unión ATP con el residuo Lys 866, al  $\alpha$ -hélice con el residuo Glu 883, además a la región bisagra desde el aminoácido Phe 919 hasta Asn 921 además forma interacción con el segmento de activación con el residuo Phe 1045 y las demás interacciones se unen al receptor en las láminas  $\beta$ plegadas del N-lóbulo.

En el acoplamiento fármaco-receptor de la figura 16 se aprecia que la estructura molecular se une a la región bisagra con el residuo Asn 921 que caracterizan a un inhibidor tipo I [23] por lo que se consideraría un inhibidor de este tipo.

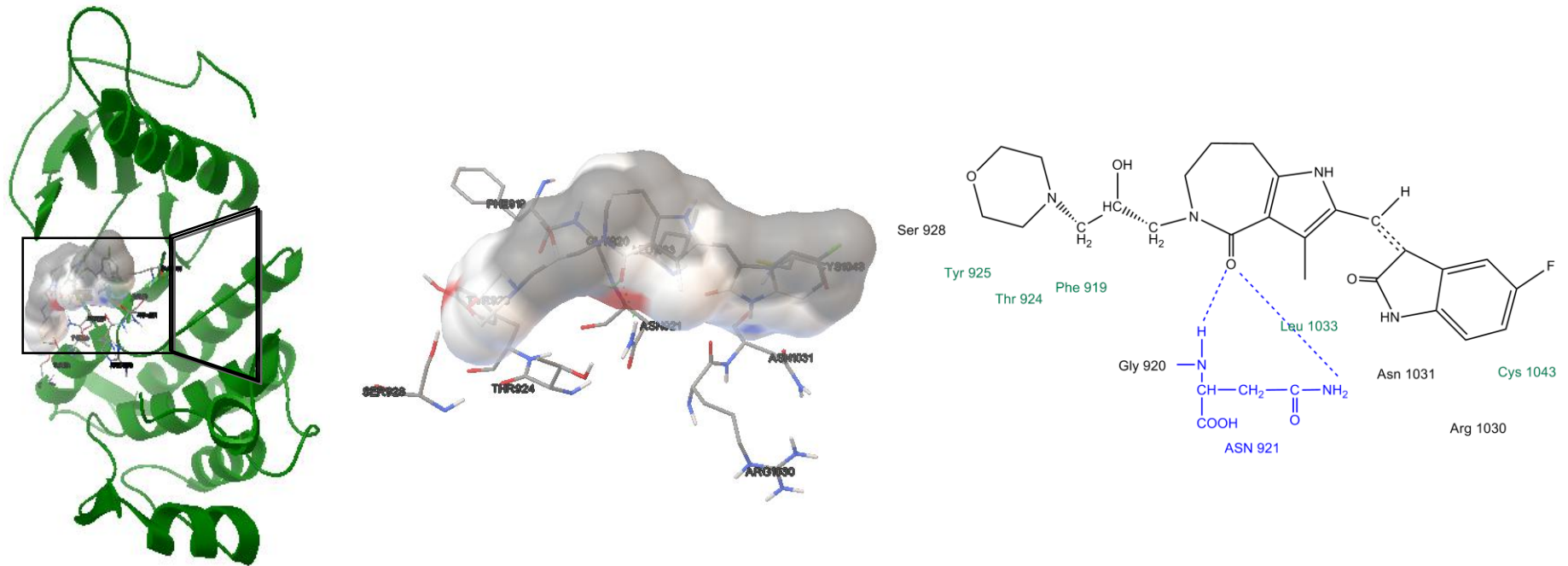


**Figura 17.** Acoplamiento molecular de KI con el VEGFR2 (estructura cristalina 1YWN). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

En el acoplamiento molecular de la figura 17, se observa que la estructura KI se une a la región bisagra desde el aminoácido Val 914 hasta Cys 917, al  $\alpha$ -hélice desde el aminoácido Glu 883 hasta Ile 890, y al asa de activación con los residuos Cys 1043 y Asp 1044.

Este ligando se considera inhibidor tipo II ya que existen tres interacciones por puentes de hidrógeno, una con el residuo Asp 1044 y dos con Glu 883 en el sitio alostérico [24].

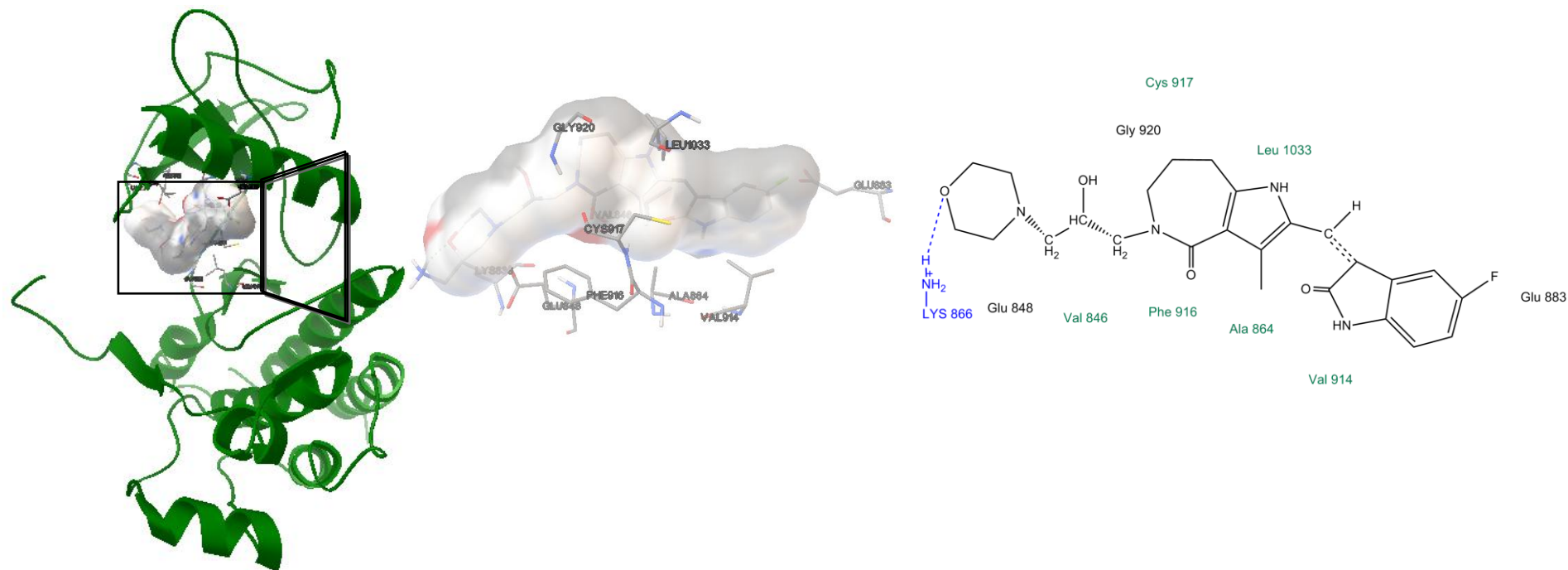
De acuerdo con el acoplamiento molecular de la figura 16 y la figura 17, KI se considera tanto inhibidor tipo I como inhibidor tipo II, ya que la estructura farmacológica cumple con las interacciones necesarias para ambos tipos de inhibidores.



**Figura 18.** Acoplamiento molecular de HEN con el VEGFR2 (estructura cristalina 1Y6A). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

La figura 18 muestra que el compuesto HEN no se une al  $\alpha$ -hélice. Sin embargo, se une en la región bisagra desde el aminoácido Phe 919 hasta Asn 921, donde forma dos puentes de hidrógeno con este último. Las interacciones restantes las lleva a cabo con las láminas  $\beta$ -plegadas en el N-lóbulo.

En el acoplamiento molecular mostrado en la misma figura, se forman dos puentes de hidrógeno con un residuo de interés por lo que este compuesto se considera inhibidor tipo I [23].



**Figura 19.** Acoplamiento molecular de HEN con el VEGFR2 (estructura cristalina 1YWN). En color naranja se muestran los residuos hidrofóbicos, en negro los aminoácidos hidrofílicos y en azul los residuos con los que se forman puentes de hidrógeno.

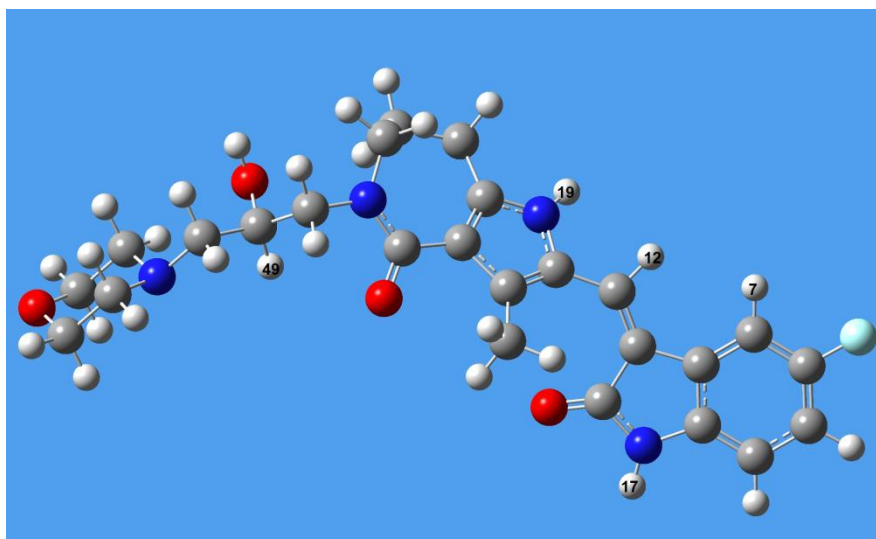
El acoplamiento molecular de HEN con VEGFR-2 (1YWN) mostrado en la figura 19 el ligando se une en la  $\alpha$ -hélice con el residuo Glu 883, así como en la región bisagra desde el aminoácido Phe 916 hasta Gly 920 y las demás interacciones las hace con las láminas  $\beta$ -plegadas en el N-lóbulo.

Del análisis anterior, HEN no se considera un inhibidor tipo II, debido a que no presenta al menos dos interacciones por puente de hidrógeno con los residuos de interés (figura 8) [24].

## 7.2. ANÁLISIS RMN-H DE LA MOLÉCULA DE HENATINIB

En la tabla de la izquierda se muestran los valores de desplazamiento químico tanto teórico como experimental de ciertos protones, los cuales aparecen en color azul en la imagen de la derecha.

Átomo	Desplazamiento químico/ppm	
	Teórico	Exp
12	8.38	7.75
19	8.31	13.73
7	8.12	7.78
17	7.50	10.91
49	3.73	3.9



De acuerdo con los valores calculados y con los valores de la estructura experimental se muestra cierta similitud, por lo que se toma su geometría para realizar cálculos posteriores.

### 7.3. MOMENTO DIPOLAR

A continuación en la Tabla 2 se muestran los valores del momento dipolar y de la concentración máxima inhibitoria (IC50). Los valores de momento dipolar son obtenidos de las estructuras optimizadas usando el método HF [57] y la base cc-pVTZ [58] en fase disolución con el modelo SMD [59].

Estructura Antiangiogénica	Momento dipolar (Debye)	IC50 (nM)
<b>ZM</b>	6.6715	2
<b>KI</b>	8.0339	0.9
<b>PF</b>	9.5284	0.8
<b>HEN</b>	10.7694	0.6

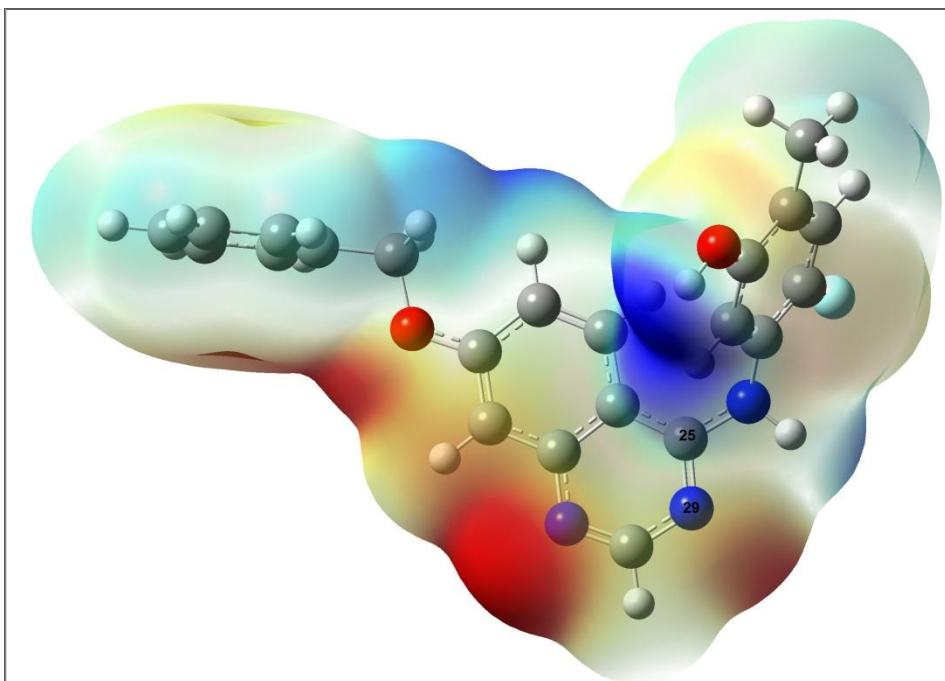
**Tabla 2.** IC50 obtenido experimentalmente y momento dipolar obtenido teóricamente de las estructuras farmacológicas.

Como se puede observar en la Tabla 2, el momento dipolar del conjunto de estructuras farmacológicas se encuentra entre 6.6715 y 10.7694 Debyes. La molécula más soluble del conjunto es HEN.

Además, se observa que existe una relación inversamente proporcional entre el momento dipolar y el IC50 que es la concentración del inhibidor que produce una inhibición de la actividad al 50%. Por lo que se establece que entre más polar sea la molécula más eficaz será el fármaco.

Por otro lado, al intentar predecir el valor de IC50 de otro isómero de HEN, por medio de un ajuste de datos, obtenidos del momento dipolar y el IC50, no fue posible obtener un resultado adecuado debido a que el valor de  $r^2$  fue de 0.78, por lo que se sugiere que el grupo de estudio debe ser más grande para establecer una relación (por ejemplo: lineal, logarítmica).

## 7.4. CARGAS ESP

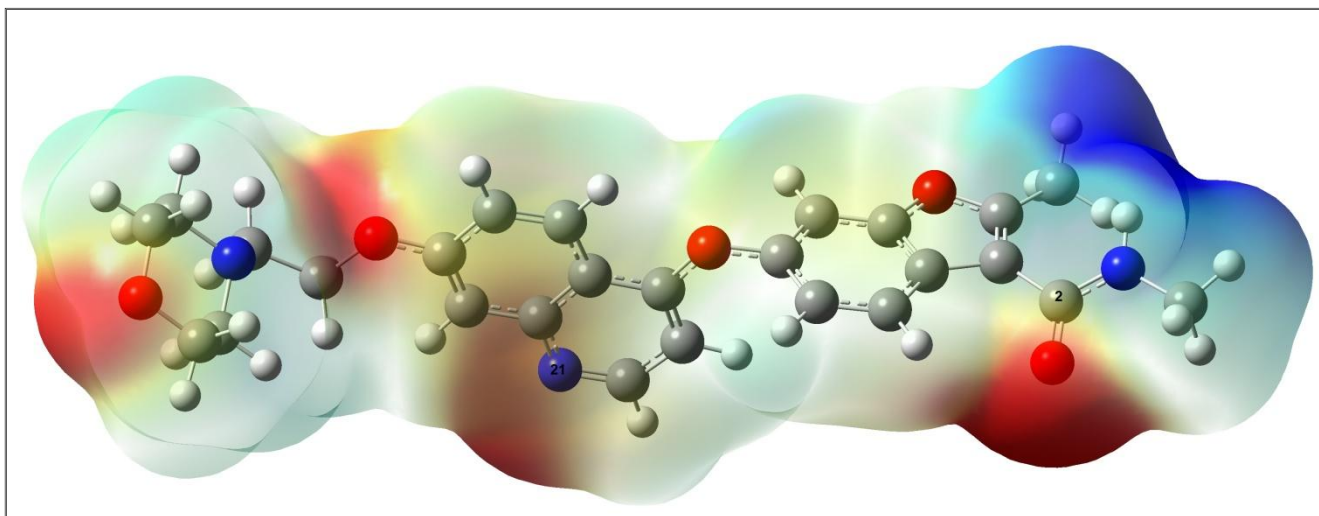


Cargas ESP										
Átomo	29N	26N	24C	19C	30N	25C	23C	27C	16C	46H
Carga	-1.0484	-1.0270	-0.9651	-0.9170	-0.8343	1.2642	1.1905	0.7655	0.7079	0.4916

**Figura 20.** Potencial electrostático de ZM en donde el color rojo representa regiones con mayor densidad electrónica y el azul las regiones deficientes de electrones, además aparecen las cargas ESP en cada átomo. Valor de isosuperficie 0.0004.

La figura 20 muestra que el átomo más susceptible a recibir un ataque electrofílico es el nitrógeno (29N) de ZM debido a que es el átomo con menor carga. Este átomo interacciona con el residuo Glu 915 del receptor VEGFR2 de la estructura cristalina 1Y6A. Asimismo este nitrógeno muestra una interacción con el aminoácido Ser 882 del receptor VEGFR2 de la estructura cristalina 1YWN.

Por otro lado el carbono (25C) de ZM es el átomo más susceptible a recibir un ataque nucleofílico, ya que es el átomo con la mayor carga. Esto se debe a que los dos nitrógenos a los que está unido extraen carga de este átomo. Se puede observar que tanto en el acoplamiento molecular de la figura 12 como en de la figura 13 no existe ninguna interacción con este átomo.

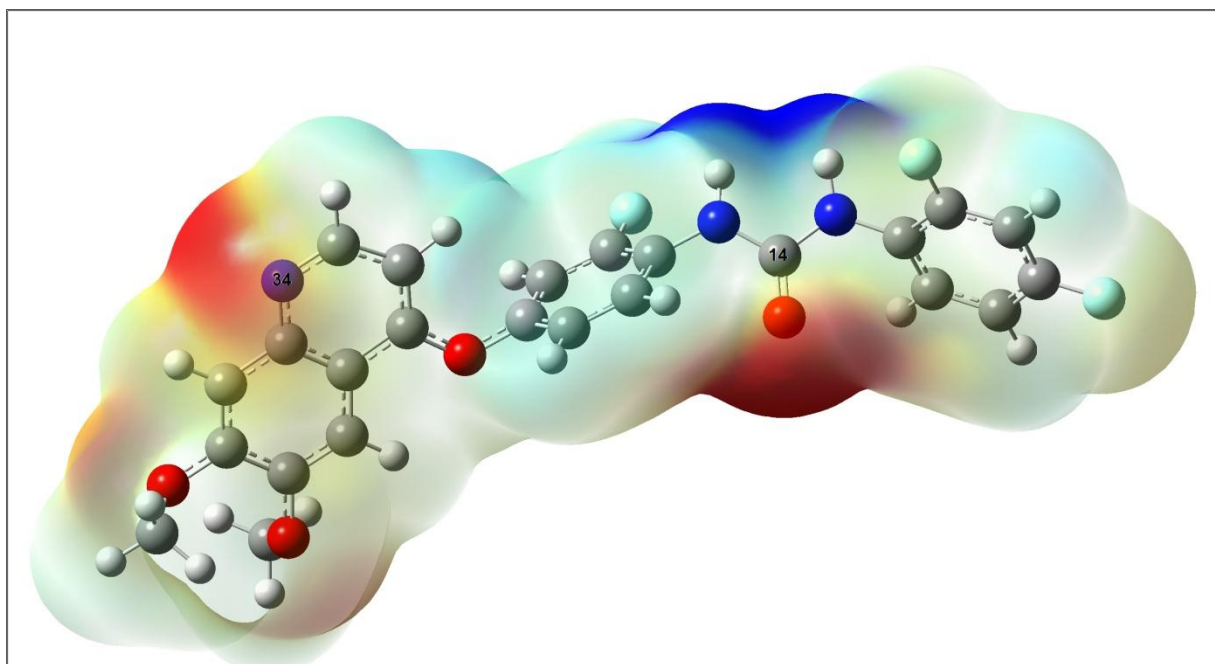


Cargas ESP										
Átomo	21N	1O	17C	23C	5C	2C	20C	16C	24C	10C
Carga	-0.8748	-0.7856	-0.7499	-0.7345	-0.7168	0.9936	0.9204	0.7599	0.6733	0.5679

**Figura 21.** Potencial electrostático de PF en donde el color rojo representa regiones con mayor densidad electrónica y el azul las regiones deficientes de electrones, además aparecen las cargas ESP en cada átomo. Valor de isosuperficie 0.0004.

Acorde con la figura 21, el átomo más propenso a recibir un ataque electrofílico es el nitrógeno (21N) de PF. En el acoplamiento molecular con VEGFR2 (1Y6A) se observa que el 21N se une al aminoácido Leu 338. Caso contrario en el acoplamiento de la figura 15 donde no se muestra interacción del nitrógeno con el receptor VEGFR2.

De acuerdo a la figura 21 el átomo susceptible a realizar un ataque nucleofílico es el carbono (2C) de la amida de PF. Esto se presenta gracias a que tanto el oxígeno como el nitrógeno toman carga del carbono dejándolo con una carga parcialmente positiva. De acuerdo a las figuras 14 y 15, se observa como el carbono no presenta ninguna interacción con el receptor VEGFR2.

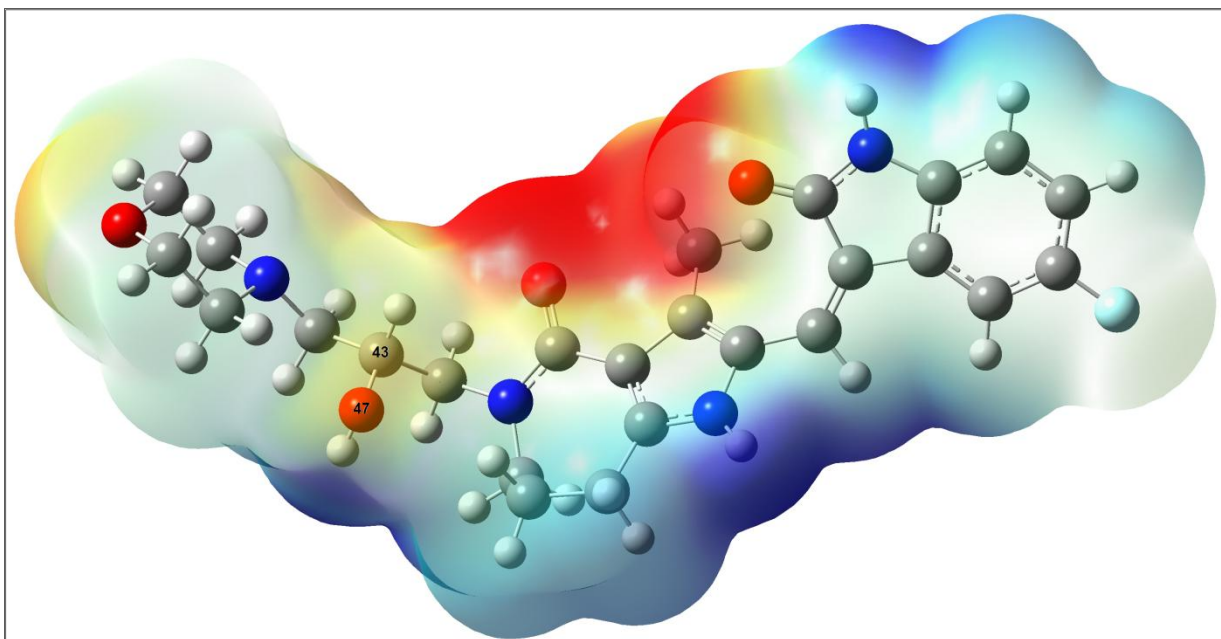


**Figura 22.** Potencial electrostático de KI en donde el color rojo representa regiones con mayor densidad electrónica y el azul las regiones deficientes de electrones, además aparecen las cargas ESP en cada átomo. Valor de isosuperficie 0.0004.

Cargas ESP										
Átomo	34N	31C	16N	15O	12N	14C	35C	29C	33C	19C
Carga	-0.9018	-0.8126	-0.7401	-0.7267	-0.6994	1.0252	0.8124	0.7801	0.5403	0.4648

El átomo más susceptible a recibir un ataque electrofílico es el nitrógeno (N34) de KI. En el acoplamiento molecular de la figura 16 hay interacción de este átomo con el residuo Ile 890 del receptor VEGFR2, mientras que en la figura 17 se muestra interacción con Leu 838.

Por otra parte el carbono (14C) del compuesto KI es el átomo más susceptible a recibir un ataque nucleofílico. Esto se debe a que tanto los dos nitrógenos como el oxígeno toman carga del carbono por lo que éste queda parcialmente positivo. En los acoplamientos moleculares que se generan con KI y el receptor VEGFR2 (figura 16 y figura 17) se observa como el carbono (14C) no presenta interacción con el receptor VEGFR2.



Cargas ESP										
<b>Átomo</b>	47O	38O	14O	44C	21C	43C	37C	13C	48H	17H
<b>Carga</b>	-0.8276	-0.8187	-0.7709	-0.7089	-0.6896	0.9677	0.9439	0.8300	0.4686	0.4278

**Figura 23.** Potencial electrostático de HEN en donde el color rojo representa regiones con mayor densidad electrónica y el azul las regiones deficientes de electrones, además aparecen las cargas ESP en cada átomo. Valor de isosuperficie 0.0004.

El átomo más dispuesto a recibir un ataque electrofílico es el oxígeno (47O) del OH de HEN. En el Acoplamiento molecular de la figura 18 el oxígeno muestra interacción con Gly 920, mientras que en el acoplamiento de la figura 19 no existe interacción con el oxígeno.

Finalmente el carbono (43C) de HEN es el más propenso a recibir un ataque nucleofílico esto se debe a que el átomo queda con carga parcial positiva, ya que el oxígeno toma carga del mismo. Tanto en la figura 18 como en la 19 no se muestra interacción de éste átomo con el VEGFR2.

## 8. CONCLUSIONES

Se realizó el acoplamiento molecular con las estructuras moleculares de interés (HEN, KI, PF y ZM) con el receptor VEGFR2 obtenido de la estructura cristalina 1Y6A. Los resultados indicaron el modo y el sitio de unión, así como los aminoácidos en los que se une el ligando en el receptor.

Por otro lado, se obtuvo el sitio y modo de unión de las moléculas farmacológicas de estudio con el receptor VEGFR2 obtenido de la estructura cristalina 1YWN, donde se reportaron los residuos aminoacídicos en los que hay interacción con el receptor.

De los resultados anteriores se obtiene que ZM, PF y HEN son inhibidores tipo I mientras que KI se considera un inhibidor tanto tipo I y tipo II.

De acuerdo al valor de momento dipolar teórico y a la concentración media máxima inhibitoria (IC50) se observa una correlación que indica que a mayor momento dipolar se obtiene mayor eficacia del inhibidor.

A través de un análisis de las cargas basadas en el potencial electrostático, se obtuvo el átomo más propenso a recibir un ataque electrofílico y nucleofílico en cada estructura farmacológica.

Como perspectivas del trabajo se propone realizar el acoplamiento molecular con el receptor VEGFR2 en su conformación DFG in y conformación intermedia (aunque por el momento solo se reporta en la base de datos PDB una estructura cristalina del receptor en DFG in y ninguna se encuentra reportada en estado intermedio) con la finalidad de saber si dichas estructuras farmacológicas inhiben también dichas conformaciones.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

[1] Hertig, A.T. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contributions to Embryology*. 1935, 25, 37-91.

[2] Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000, 2, 505-515.

[3] Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005, 438, 932-936.

[4] Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000, 100, 57-70.

[5] Alberts y col. *Biología Molecular de la célula*. 4ª ed., Ed. Omega, Barcelona. 2004.

[6] Ide, A.G., Baker, N.H., et al. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *American Journal of Roentgenol*. 1939, 32, 891-899.

[7] Algire, G.H., Chalkley, H.W. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. *Journal of the National Cancer Institute*. 1945, 6, 73-85.

[8] Greenblatt, M., Shubi, P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *Journal of the National Cancer Institute*. 1968, 41, 111-24.

[9] Ehrmann, R.L., Knoth, M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *Journal of the National Cancer Institute*. 1968, 41, 1329-1341.

[10] Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*. 1971, 285, 1182–1186.

[11] Taylor, S., Folkman, J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*. 1982, 297, 307–312

[12] Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. *Nature Review*. 2007, 6, 273-286.

[13] Hanahan, D. Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996, 86, 353-64.

- [14] Brouck, N. P53 and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1996, 1287, 63-66.
- [15] Hanahan, D. Angiogenesis: update 2005. *Journal of Thrombosis and Hemostasis*. 2005, 3, 1835-1842.
- [16] Vakkila, J., Lotze, M.T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature Reviews Immunology*. 2004, 4, 641–648.
- [17] Musumeci, F., Radi, M., Chiara, B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, 55, 10707-10822.
- [18] Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989, 246, 1306-1309.
- [19] Connolly, D. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1991, 47, 219-23.
- [20] Marné, D., Fusening N. Tumor angiogenesis. *Basic Mechanisms and Cancer therapy*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 2008
- [21] Olsson, A., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson, Lena. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nature reviews*. 2006, 7, 359-371
- [22] Roskoski, J. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, 375, 287-291.
- [23] Liu, Y., Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature chemical biology*. 2006, 2, 358-364.
- [24] Mai, S., Dalal, A., Abou, E., Nasser, S., Khaled, A. Design, Synthesis and biological evaluation of type-II VEGFR2 inhibitors based on quinoxaline scaffold. *Bioorganic Chemistry*. 2014, 56, 16-26.
- [25] Levine, Ira N. *Química Cuántica*, Primera Edición; Brooklyn College City University of New York. Editorial AC. Madrid España, 1997.
- [26] Born, M., Oppenheimer, J. Zur Quantentheorie. *Annalen der Physik*. 1927, 389, 20, 457-484.

[27] Hartree, D. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. 1928, 24, 89-110.

[28] Hartree, D. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part III. Term Values and Intensities in Series in Optical Spectra. Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. 1928, 24, 426-437.

[29] Ewing, T., Makino, S., Skillman, A., Kuntz, I. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2001,15, 411–428.

[30] Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R., Olson, A. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry.1998, 19, 1639–1662.

[31] Goodsell, S., Morris, G., Olson, A. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. Journal of Molecular Recognition. 1996, 9, 1–5.

[32] Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., Klebe, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. Journal of Molecular Biology. 1996, 261, 470–489.

[33] Kramer, B., Rarey, M., Lengauer, T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. Proteins-Structure, Function, and Genetics. 1999,37, 228–241.

[34] Claussen, H., Buning, C., Rarey, M., Lengauer, T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. Journal of Molecular of Biology. 2001, 308, 377–395.

[35] Yang, J., Chen, C. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking. Proteins-Structure, Function and Bioinformatics. 2004, 55, 288–304.

[36] Chang, D., Oyang, Y., Lin, J. MEdock: a web server for efficient prediction of ligand binding sites based on a novel optimization algorithm. Nucleic Acids Research. 2005, 33, 233–238.

[37] Thomsen, R., Christensen, M. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. Journal of Medical Chemistry. 2006, 49, 3315–3321.

[38] Chen, K., Li, T., Cao, T. Tribe-PSO: a novel global optimization algorithm and its application in molecular docking. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2006, 82, 248–259.

- [39] Chen, H., Liu, B., Huang, H., Hwang, S., Ho, S. SODOCK: swarm optimization for highly flexible protein-ligand docking. *Journal of Computational Chemistry*. 2007, 28, 612–623.
- [40] Jain, A. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *Journal of Computational Chemistry*. 2003, 46, 499–511.
- [41] Jones, G., Willett, P., Glen, R., Leach, A., Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*. 1997, 267, 727–748.
- [42] Verdonk, M., Cole, J., Hartshorn, M., Murray, C., Taylor, R. Improved proteinligand docking using GOLD. *Proteins-Structures, Function and Genetics*. 2003, 52, 609–623.
- [43] Jones, G., Willett, P., Glen, R. Molecular recognition of receptor-sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology*. 1995, 245, 43–53.
- [44] Abagyan, R., Totrov, M., Kuznetsov, D. ICM—a new method for protein modeling and design—applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*. 1994, 15, 488–506.
- [45] Totrov, M., Abagyan, R. Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins Structure Function and Bioinformatic*. 1997, 1, 215–220.
- [46] Friesner, R., Banks, J., Murphy, R., Halgren, T., Klicic, J., Mainz, D., Repasky, M., Knoll, E., Shelley, M., Perry, J., Shaw, D., Francis, P., Shenkin, P. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, 47, 1739–1749.
- [47] Wu, G., Robertson, D., Brooks, C., Vieth, M. Detailed analysis of grid-based molecular docking: a case study of CDOCKER—a CHARMM-based MD docking algorithm. *Journal of Computational Chemistry*. 2003, 24, 1549–1562.
- [48] Venkatachalam, C., Jiang, X., Oldfield, T., Waldman, M. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2003, 21, 289–307.
- [49] Liu, M., Wang, S. MCDOCK: a Monte Carlo simulation approach to the molecular docking problem. *Journal of Computer- Aided Molecular Design*. 1999, 13, 435–451.

[50] Li, L., Chen, R., Weng, Z. RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions. *Proteins-Structure, Function and Genetics*. 2003, 53, 693–707.

[51] Chen, R., Li, L., Weng, Z. ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins-Structure, Function and Genetics*. 2003, 52, 80–87.

[52] Pierce, B., Tong, W., Weng, Z. M-ZDOCK: a grid-based approach for C-n symmetric multimer docking. *Bioinformatics*. 2005, 21. 1472–1478.

[53] Sauton, N., Lagorce, D., Villoutreix, B., Miteva, M. MS-DOCK: accurate multiple conformation generator and rigid docking protocol for multi-step virtual ligand screening, *BMC Bioinformatics* . 2008, 9, 181-184.

[54] Hocker, H., Cho, K., Chen, C., Rambahal, N., Sagineedu, S., Shaari, K., Stanslas, J., Hancock, J., Gorfe, A. Andrographolide derivatives inhibit guanine nucleotide exchange and abrogate oncogenic Ras function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013, 110, 10201–10206.

[55] Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J., Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. 2004,3, 935-949.

[56] Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H., Izmaylov, A., Bloino, J., Zheng, G., Zheng, G., Sonnenberg, J., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J., Peralta, J., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J., Brothers, E., Kudin, K., Staroverov, V., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachar, K., Rendell, A., Burant, J., Iyengar, S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J., Klene, M., Knox, J., Cross, J., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R., Yazyev, O., Austin, A., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J., Martin, R., Morokuma, K., Zakrzewski, V., Voth, G., Salvador, P., Dannenberg, J., Dapprich, S., Daniels, A., Farkas, O., Foresman, J., Ortiz, J., Cioslowski, J., Fox, D. *Gaussian 09*, Wallingford CT, 2009.

[57] Roothaan, C. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Reviewa of Modern Physics*. 1951, 23, 69-89.

[58] Dunning, T. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal Chemical Physics*. 1989, 90, 1007-1023.

[59] Marenich, A., Cramer, C., Truhlar D., Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric

constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry. B.* 2009,113, 6378-96.

[60] Qian, J., Yixuan, W., Lunning, C., Li Jin, J. Determination of henatinib in human plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2013, 80. 173-179.

[61] Kong, S. Synthesis of henatinib. *Fine and specialty.* 2013, 9, 18-20.

[62] Bharatk, M., Lee J., Breet, S., Farbod, S. VEGF is an important mediator of tumor angiogenesis in malignant lesions in a genetically engineered mouse model of lung adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2013, 13, 1-7.

[63] Whittles, C., Pocock, T., Wedge, S., et al. Zm323881, a novel inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine kinase activity. *Microcirculation.* 2002, 9, 513–522.

[64] Kubo, K., Shimizu, T., Ohyama, S. Novel potent orally active selective VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors: Synthesis, structure-activity relationships, and antitumor activities of N-phenyl-N'-(4-[4-quinolyloxy)phenyl]ureas. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2005, 48 5, 1359-1366.

[65] Wolinski, K., Hilton, J., Pulay, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. *Journal of the American Chemical Society.* 1990,112, 8251-8260.

[66] Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology.* 2003, 10 (12): 980.

[67] Harris, P., Cheung, M., Hunter, R., Brown, M., Veal, J., Nolte, R., Wang, L., Liu, W., Crosby, R., Johnson, J., Epperly, A., Kumar, R., Luttrell, D., Stafford, J. Discovery and evaluation of 2-anilino-5-aryloxazoles as a novel class of VEGFR2 kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2005, 48, 1610-1619.

[68] Miyazaki, Y., Matsunaga, S., Tang, J., Maeda, Y., Nakano, M., Philippe, R., Shibahara, M., Liu, W., Sato, H., Wang, L., Nolte, R. Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2005, 15, 2203-2207.