



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio *in silico* del acoplamiento molecular sobre el potencial de la actividad neuroprotectora del ácido gálico al inhibir el receptor NMDA.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Luis Axel Swartwood Montero

DIRECTOR:

Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez

3 de agosto de 2022



Durante la realización de esta tesis se participó en los siguientes programas:

- Participación en el programa “Haciendo Ciencia en la BUAP 2021” de la VIEP, con el proyecto intitulado “Ácido gálico y su efecto bloqueador del receptor NMDA”.
- Participación en el proyecto: 477- Estructura y Reactividad Química de un grupo de Xantonas y su interacción con enzimas involucradas en el desarrollo del cáncer de mama.

Agradecimientos:

Esta tesis va con dedicatoria a mi familia: Mi mamá Sabina, papá Enrique, y mi hermano Milton, quienes siempre me apoyaron para que estudiara lo que yo quería, por permitirme salir de mi estado hogar en busca de un mejor futuro y brindarme siempre su apoyo, en todo momento.

Este trabajo no habría podido ser realizado sin el esfuerzo de mi director de tesis, el Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez, quien me permitió trabajar en el tema que me interesaba, además de enseñarme las bases necesarias para trabajar en bioinformática y a mi codirector de tesis el candidato a doctor Lic. Ricardo Buendía Corona, quien me ayudó a hacer de este trabajo lo que es, explicarme todo lo que necesitaba saber sobre acoplamiento molecular, minimización y modelado de proteínas y demás técnicas avanzadas, siempre con paciencia, al igual que alentarme a conseguir los resultados que pusieran en alto este documento, además de ser un gran maestro, es un buen amigo.

Quiero darle las gracias a mi abuela y mis amigos, por siempre escucharme cuando quería hablarles sobre este trabajo y por nunca dudar que lo terminaría. Lo logramos.

De igual forma quiero agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por permitirme participar en su programa de ciencia y ser parte del proyecto: 477- Estructura y Reactividad Química de un grupo de Xantonas y su interacción con enzimas involucradas en el desarrollo del cancer de mama. Un estudio teórico. También, quiero agradecer al Laboratorio Nacional de Supercómputo del sureste de México (LNS) por facilitar el acceso al clúster que me permitió generar los resultados deseados. Finalmente quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Biológicas, la Facultad de Ciencias Químicas, el Instituto de Ciencias y la Licenciatura en Biotecnología por proveer de materiales, laboratorios, personal, profesores e instalaciones para poder llevar a cabo esta tesis.



Laboratorio Nacional de Supercómputo
del Sureste de México



Facultad de Ciencias Químicas BUAP



Contenido

Abreviaturas:	6
1. Resumen.....	7
2. Introducción:	8
3. Justificación:	9
4. Antecedentes:	10
5. Hipótesis:	15
6. Objetivo general:.....	15
7. Objetivos particulares:	15
10. Marco Teórico	16
10.1 Química computacional	16
10.2 Modelado comparativo o por homología.....	18
10.3 Vina y ADFR.....	20
10.4 MolProbit	23
11. Metodología.....	24
11.1 Capacidad de cómputo y sistemas operativos	24
11.2 Preparación de receptor	24
11.3 Preparación de ligandos.....	26
11.4 Docking	26
11.41 AutoDock Vina	26
11.42 AutoDock FR.....	28
12. Resultados y discusiones.....	29
9.1 Modelado por homología.....	29
9.2 Acoplamiento molecular en Vina.....	30
9.3 Acoplamiento molecular en ADFR	34
13. Discusión:	38
14. Conclusiones.....	41
15. Perspectivas.....	42
16. Bibliografía.....	42
17. Anexos	47

Abreviaturas:

1K	1 knucle (conformación nudillo)
2KA	2 knucle asymmetric (conformación nudillo asimétrica doble)
2KS	2 knucle symetric (conformación nudillo simétrica doble)
ABD o LBD	Dominio de unión a agonistas o ligandos
ADFR	AutoDockFR
AG	Ácido gálico
B3LYP	Becke de tres parámetros, Lee-Yang-Parr
Ca ²⁺	Iones Calcio
CTD	Dominio terminal C
DFT	Teoría funcional de densidades
E	Explayed (conformación extendida)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
LNS	Laboratorio Nacional de Supercómputo del sureste de México
Lp1	Laptop con procesador Intel(R) Core(TM) i5-10300H a 2.50GHz
Lp2	Laptop con procesador Intel(R) Core(TM) i7-8750H a 2.20GHz
Mem	Memantina
Mk-801 o Diz	Dizocilpina
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NTD o ATD	Dominio terminal N o amino
PCP	Fenciclidina
PDB	Proteín Data Bank
PDBQT	Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)
R.S.M.D	Distancia media cuadrática mínima
SO	Splayed Open (conformación con ATD abierto)
SS	Super Splayed (conformación con ATD muy abierto)
SSH	Secure Shell Client
TMD	Dominio Transmembranal
Zn ²⁺	Iones Zinc

1. Resumen

El uso de las herramientas bioinformáticas ha permitido avances impresionantes en la ciencia y en particular en la medicina, gracias a ello, los ensayos *in silico* han cobrado valor en las investigaciones, brindando predicciones cada vez más exactas a medida que avanza la tecnología, permitiendo estudiar fenómenos bioquímicos de forma precisa, los cuales antes solo eran comprobables mediante la experimentación directa. Sin lugar a duda, el uso de métodos computacionales ha abaratado el costo de la investigación y acelerando el proceso de obtención de resultados.

El presente trabajo describe la evaluación teórica mediante ensayos *in silico* del ácido gálico dentro del complejo NMDAR como posible tratamiento de los efectos neurodegenerativos generados por el síndrome metabólico, comparando su afinidad por el receptor NMDA con dos fármacos inhibidores de referencia mediante el uso de dos programas distintos de acoplamiento molecular en dos equipos de cómputo con distintas capacidades de procesamiento. Debido a que el receptor NMDA es una estructura proteica compleja, la cual varía su topología dependiendo de la concentración de iones Zn^{2+} y la presencia de protones en el medio (Jalali-Yazdi et al., 2018); estos cambios conformacionales permiten la apertura y el cierre del canal iónico en el dominio TMD, por lo que se estudió la afinidad del ácido gálico y los ligandos de referencia en 8 conformaciones distintas del receptor, cada una representando condiciones fisiológicas distintas que afectan la afinidad de la proteína por ligandos.

Las afinidades obtenidas del acoplamiento molecular del ácido gálico fueron un poco menores a la de ambos fármacos y se demostró que interacciona en común con varios residuos de aminoácidos tanto de la dizocilpina como de la memantina, lo cual sugiere que la ya reportada (Sarkaki et al., 2014) actividad neuroprotectora del ácido gálico se da por medio de su unión al NMDAR.

2. Introducción:

La bioinformática es la rama de la biología encargada del almacenamiento, la manipulación y el análisis de bases de datos con información biológica (Pool & Esnayra, 2000); esta disciplina ha dado origen a la química computacional, la cual tiene sus raíces en la mecánica cuántica, donde se calculan aproximaciones de la ecuación de Schrödinger para poder predecir la probabilidad de la posición de las partículas subatómicas y con ello establecer la geometría molecular de compuestos químicos no registrados, su energía, su reactividad y las posibles interacciones que generen con otras moléculas; logrando modelar eventos biológicos a escala atómica (Szabo & Ostlund, 2012) (Lewars, 2011). Estos modelos son llamados *in silico* y buscan emular el comportamiento natural de las moléculas, simulando su acción dentro de un sistema biológico mediante el uso de programas computacionales sin necesidad de llevar a cabo experimentación con los organismos vivos a estudiar, logrando extrapolar resultados en menos tiempo reduciendo el uso de recursos. Gracias a estas herramientas, es posible evaluar de forma visual interacciones a nivel molecular, lo que nos permite la comprensión de fenómenos que no han podido explicarse de manera experimental (Colquitt et al., 2011). Esto es especialmente útil en el análisis de moléculas biológicas como fármacos y proteínas blanco (Lee et al., 2014), este es el caso del presente estudio, donde se analizarán las interacciones entre la proteína conocida como Receptor de N-metil-D-aspartato o “NMDA” y sus distintas conformaciones junto con el ácido gálico y distintos fármacos de referencia.

De acuerdo con los datos oficiales publicados por el gobierno de México, el 70% de los mexicanos padecen sobrepeso y casi una tercera sufre de este padecimiento, causando no solo problemas en la salud de los afectados, sino también pérdidas económicas de hasta 26 billones de dólares sólo en México en el 2019, según el World Obesity Atlas, esperando aumentar hasta 160 billones para el 2060, representando un problema mayor para la salud de los mexicanos. El síndrome metabólico o SM es un desorden metabólico resultante del aumento en la prevalencia de la obesidad, al cual se le atribuye resistencia a la insulina con flujo

excesivo de ácidos grasos, estando así fuertemente ligado con la diabetes y enfermedades cardiovasculares (Eckel et al., 2005), las cuales, junto con el COVID-19, fueron las tres principales causas de muerte en México en el 2021 según el INEGI. Si bien el método principal para tratar el síndrome metabólico es el aumento de actividad física y la reducción de peso, buscar nuevos fármacos para tratar con el síndrome metabólico es de vital importancia para la salud en México.

3. Justificación:

Partiendo de la premisa expuesta por investigaciones anteriores (Caporal Hernández & Samuel Treviño Mora, 2018), la presencia de ácido gálico muestra una actividad neuro protectora dentro de modelos murinos con síndrome metabólico. Otras investigaciones sugieren que el rol antineurodegenerativo del ácido gálico se debe a su actividad bloqueadora dentro del receptor NMDA en células cerebrales (Sarkaki et al., 2014), hipótesis que a su vez es apoyada por otras investigaciones relacionadas con la actividad antineurodegenerativa del ácido gálico (Ban et al, 2008).

Sin embargo, la información referente a cómo el ácido gálico interacciona con el receptor son deficientes; por lo que se propone el estudio *in silico* de dichas interacciones, mediante acoplamiento molecular, comparando dichas interacciones con aquellas presentadas por fármacos de referencia como la dizocilpina y la memantina, cuyas interacciones ya han sido reportadas dentro del receptor.

De igual manera, se sabe que la sobreactivación del receptor NMDA trae consigo una gran variedad de patologías derivadas de la muerte neuronal (Rothman & Olney, 1987) y una forma de contrarrestar estos efectos es mediante el uso de fármacos antagonistas, aunque muchos de ellos, como la dizocilpina, causan daño neuronal si la exposición es prolongada y no se usa algún otro compuesto para prevenirla; por lo que si el ácido gálico presenta una actividad neuroprotectora, investigaciones sobre su funcionamiento pueden conducir al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de neuropatías relacionadas con el mal funcionamiento del receptor NMDA.

4. Antecedentes:

El receptor de N-metil-D-aspartato o NMDAR (figura 1) es uno de los tres receptores de glutamato ionotrópicos, los cuales tienen como función mediar la neurotransmisión excitatoria, siendo los NMDAR piezas claves en el funcionamiento del sistema nervioso central (Paoletti et al., 2013). El receptor NMDA se caracteriza por necesitar dos agonistas unidos a la vez para activarse, los cuales son: el glutamato para la subunidad N2 y la glicina para la subunidad N1 (Paoletti et al., 2013). A pesar de que existen distintas conformaciones para los NMDAR, todos poseen una estructura tetramérica similar conformada por los dominios: NTD (dominio N terminal) ABD (Dominio de unión a agonistas), TMD (Dominio transmembranal) y CTD (Dominio C terminal); cada dominio presenta distintos sitios de unión a fármacos agonistas y antagonistas, como se muestra en la figura 2, sin embargo, el TMD contiene el canal iónico y la región de inhibición por los fármacos de referencia (Paoletti et al., 2013).

El mal funcionamiento del receptor NMDA está asociado a diversos desordenes neurológicos y psiquiátricos, entre los que se encuentran: derrame cerebral, dolor patológico, enfermedades neurodegenerativas y esquizofrenia (Paoletti et al., 2013). Es por esto que asegurar un buen funcionamiento del receptor NMDA es indispensable para la salud pública.

El ácido gálico es un polifenol endógeno en plantas, comúnmente encontrado en uvas, moras, té y vino, aunque también se ha demostrado que está presente en algunos árboles como robles y castañas; se trata de un cristal blanco amarillento con una masa molecular de 170.12g/mol, cuyo punto de ebullición es de 250°C y solubilidad en agua de 1.1% a 20°C (Verma et al., 2013). Este compuesto presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anti mutagénicas y anticancerígenas en varias rutas bioquímicas y farmacológicas (Verma et al., 2013), por lo que se cree que pueda estar implicado en la protección contra enfermedades neurodegenerativas.

El fármaco de referencia "MK-801" o dizocilpina, fue descubierta en 1982, describiéndose como una droga con propiedades anticonvulsivas, anestésicas y

neuro protectoras, la cual sirve como un bloqueador del NMDAR mediante unión de tipo no competitiva al sitio de unión PCP, regulando el flujo de iones Ca^{2+} por el canal del NMDAR (Srebro et al., 2019). Aunque la dizocilpina no es usada como fármaco clínico debido a que induce vacuolización neuronal y efectos psicotrópicos, sin embargo, su alta especificidad y eficiencia, hacen que sea muy usada en la investigación de los NMDAR (Srebro et al., 2019) .

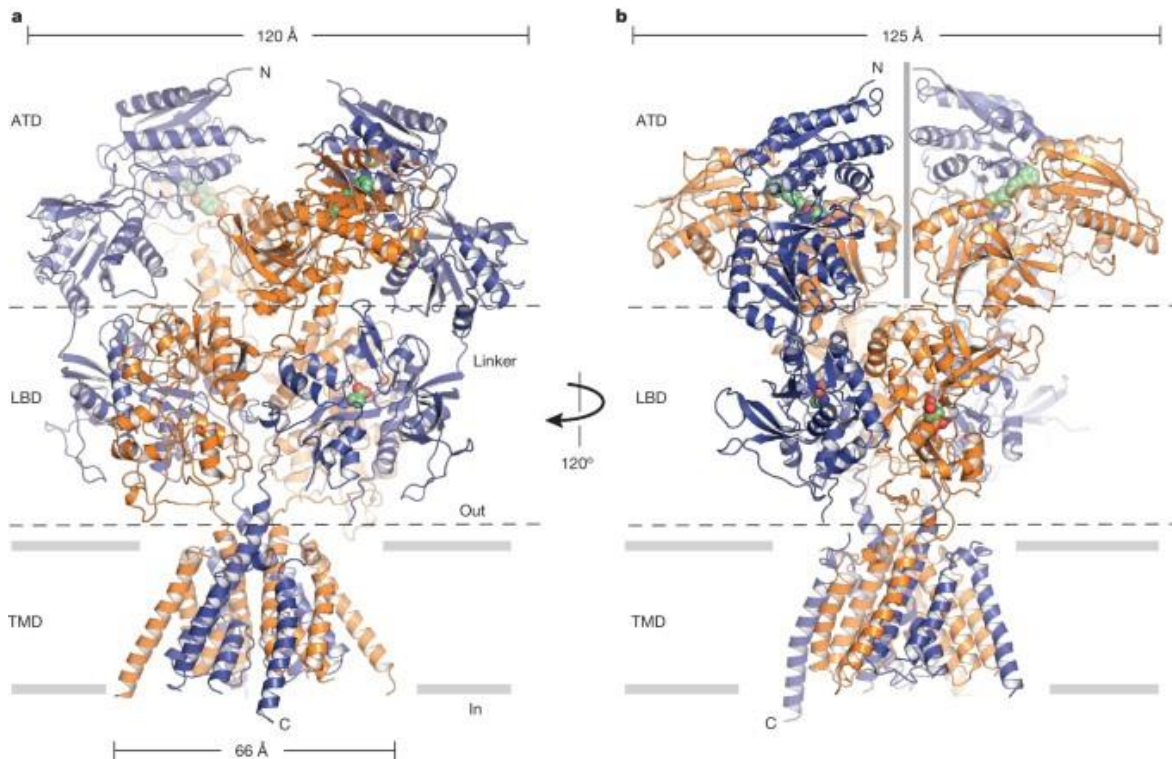
La memantina, al igual que la dizocilpina, es un antagonista del NMDAR, tiene afinidad moderada al mismo, es de unión tipo no competitivo y voltaje dependiente; es utilizado como regulador de entrada de los iones Ca^{2+} por el canal NMDAR, produciendo un efecto neuroprotector (Robinson & Keating, 2006). Es utilizado como medicamento para tratar el Alzheimer moderado y grave, el cual puede provocar dolores de cabeza, constipación, e insomnio como efectos secundarios, pero en raros casos presenta efectos adversos serios (Robinson & Keating, 2006).

Tanto la memantina como el MK-801 presentan actividad bloqueadora del canal del receptor NMDA, dicha función es distinta a la otros tipos de fármacos agonistas del NMDAR, como es el caso del ifenprodil, el cual tiene la función de inhibir la activación del receptor (Paoletti et al., 2013).

El receptor NMDA varía su topología dependiendo de la concentración de iones Zn^{2+} y la presencia de protones en el medio como se muestra en la figura 3 (Jalali-Yazdi et al., 2018); estos cambios conformacionales permiten la apertura y el cierre del canal iónico en el TMD.

Figura 1.

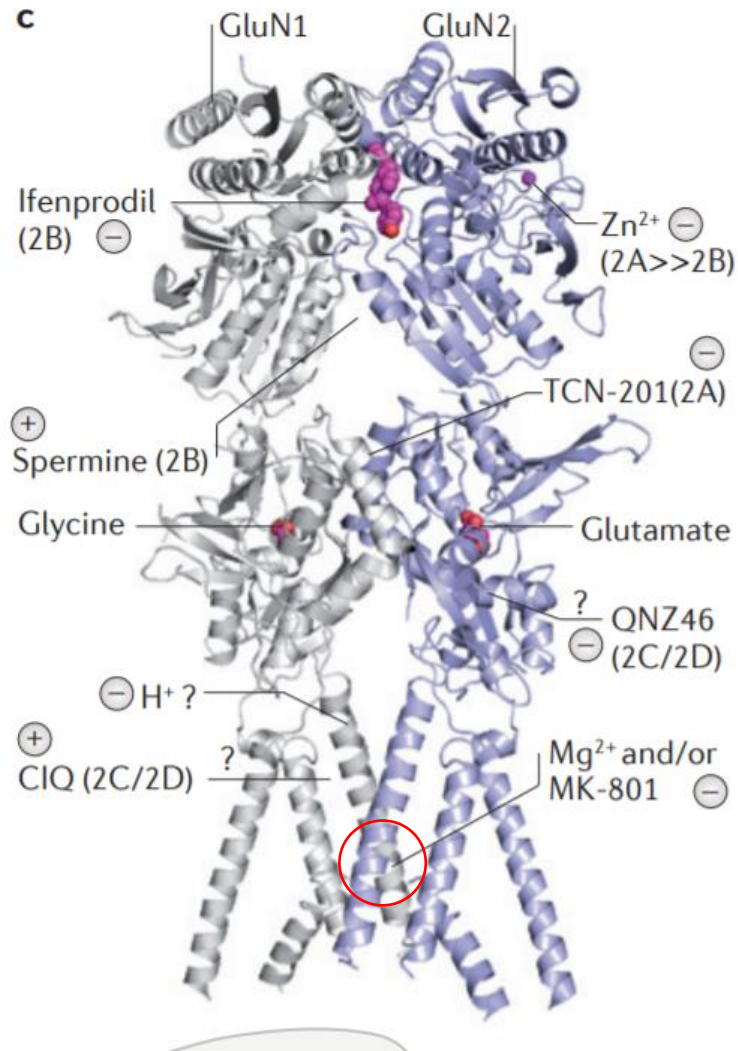
“Receptor NMDA y sus dominios”



El receptor NMDA se puede dividir principalmente en tres dominios: el ATD o dominio terminal amino (también conocido como dominio terminal N o NTD), el LBD o dominio de unión de ligandos (también conocido como dominio terminal de agonistas o ABD) y el TMD o dominio transmembranal. Muchos investigadores incluyen un cuarto dominio justo debajo del TMD conocido como el Dominio terminal C (CTD). Recuperado de “Arquitectura, simetría y organización de los dominios del receptor NMDA GluN1–GluN2B.” Recuperado de Lee et al, 2014.

Figura 2.

“Sitios de unión a agonistas y antagonistas dentro del receptor NMDA”

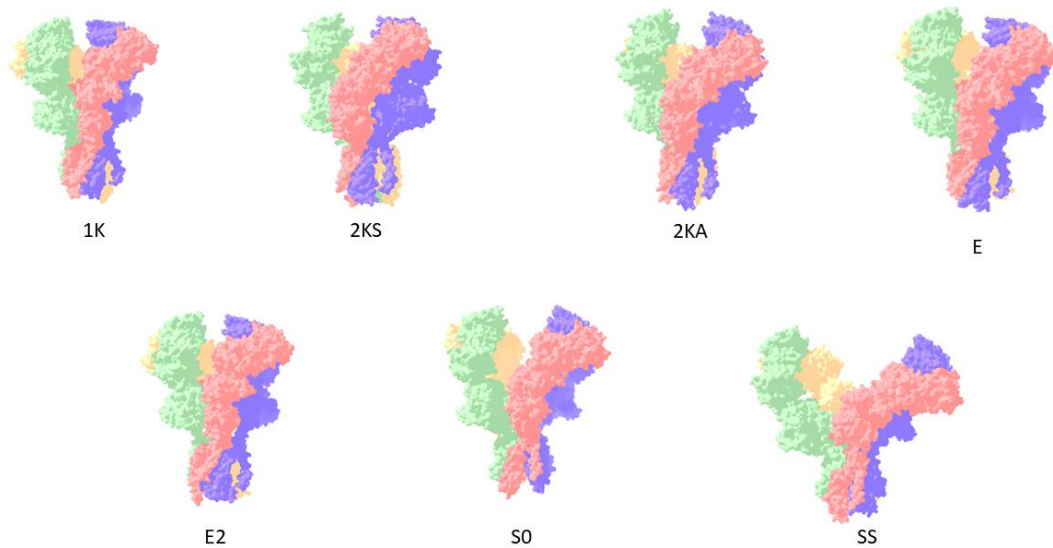


Los símbolos negativos representan represores y los símbolos positivos, activadores; el sitio de unión de interés se encuentra marcado en rojo.

Recuperado de Paoletti et al, 2013.

Figura 3.

“Distintas conformaciones del receptor NMDA”



Cambios en la topología del receptor NMDA según las concentraciones de iones zinc y protones, se puede observar una clara alteración en las 4 cadenas que conforman la proteína, formando así cada una de las conformaciones: nudillo (1K), nudillo simétrico doble (2KS), nudillo asimétrico doble (2KA), extendida (E), extendida 2 (E2), con ATD abierto (SO) y con ATD muy abierto (SS). Figura realizada usando el software UCSF Chimera (Pettersen et al, 2004)

El receptor NMDA presenta sitios de unión a estas moléculas en cada dominio, dentro de las cuales los antagonistas, moléculas que se encargan de frenar o disminuir el efecto de este receptor (Pharmacology guide), son de especial importancia como medicamentos preventivos contra desórdenes neurológicos (Olney et al., 1991).

Se ha probado que los medicamentos antagonistas de referencia, como la dizocilpina, se unen al motivo conservado en los residuos SYTANLAAF de la proteína (Chang & Kuo, 2008), presente en el TMD, bloqueando el canal de forma no competitiva, pues se sabe que el NMDAR es una proteína muy sensible que debe ser regulada correctamente para evitar la incidencia de neuropatías (Paoletti et al., 2013), por lo que un fármaco con una afinidad demasiado alta podría ser perjudicial.

El acoplamiento molecular ha sido una herramienta que se ha vuelto indispensable en el diseño de nuevos fármacos, aumentando mucho la eficiencia y disminuyendo

el costo de este proceso (Fan et al., 2019), al igual que aportando nuevas perspectivas para la selección de fármacos competentes, como lo es la simulación de las distintas conformaciones adoptadas tanto por el ligando como por la proteína durante el acoplamiento, brindándonos una perspectiva mucho más profunda de estas interacciones (Ferreira et al., 2015).

5. Hipótesis:

El ácido gálico presentará una afinidad parecida a la de los fármacos de referencia e interactuará con el receptor NMDA en la misma zona del TMD como un antagonista no competitivo al igual que los fármacos de referencia, bloqueando el canal iónico y demostrando su actividad neuroprotectora.

6. Objetivo general:

Evaluar mediante ensayos *in silico* la interacción del ácido gálico dentro del receptor NMDA para correlacionar su efectividad en el sitio de unión a antagonistas validado mediante docking multiplataforma en 7 conformaciones de apertura.

7. Objetivos particulares:

1. Preparar los ligandos y receptores para lograr un acoplamiento molecular preciso.
2. Minimizar las estructuras proteicas de rata obtenidas del PBD, usándolas como plantilla para el modelado de las proteínas humanas.
3. Obtener los modelos de proteína humana, y minimizarlos.
4. Modificar los tipos de enlaces de los ligandos y adicionar hidrógenos y calcular cargas para las proteínas.
5. Realizar una optimización molecular a los ligandos.
6. Establecer las coordenadas y cajas de puntos para el uso de Vina y seleccionar el pocket donde se encuentra el motivo SYTANLAAF para el software ADFR.
7. Acoplar los ligandos con los receptores mediante dos programas distintos de acoplamiento molecular (Vina y ADFR) y dos equipos de cómputo con capacidades distintas.

8. Interpretar los resultados de los acoplamientos y las interacciones entre estos complejos, comparando los resultados obtenidos dependiendo del software y hardware utilizado.

9. Marco Teórico

10.1 Química computacional

A partir de los múltiples avances que se han logrado en la bioinformática y el desarrollo de equipos y programas computacionales aptos para trabajos más precisos y robustos. Gracias a estos avances, se ha utilizado la computación para comprender procesos a nivel molecular, dando origen a la química computacional basada en la mecánica cuántica, donde es posible calcular aproximaciones de la ecuación de Schrödinger para poder predecir la probabilidad de la posición de las partículas subatómicas y con ello establecer la geometría molecular de compuestos químicos no registrados, su energía, su reactividad y las posibles interacciones que generen con otras moléculas; logrando extrapolar procesos mecánicos a escala atómica que difícilmente pueden ser comprobados mediante ensayos experimentales (Szabo & Ostlund, 2012) (Lewars, 2011). La química computacional ha permitido una gran cantidad de avances en las ciencias de la salud, donde destaca el diseño de fármacos, el cual se ha beneficiado ampliamente de la simulación de interacciones moleculares, el modelado molecular y el estudio de sistemas bioquímicos complejos de manera más rápida y eficiente (Ferreira et al., 2015).

10.2 Optimización molecular

La ecuación de Schrödinger y sus derivados, se apoyan de una función conocida como Hamiltoniano, el cual, tiene como objetivo describir la energía atómica tomando en cuenta a las energías cinéticas del electrón y el núcleo, las repulsiones entre núcleos, las atracciones núcleo-electrón y las repulsiones entre electrones, representando finalmente la ecuación (1), donde r^{\rightarrow} representa los electrones y R^{\rightarrow} representa los núcleos.

$$(1) \hat{H}\psi(r^{\rightarrow}, R^{\rightarrow}) = E\psi(r^{\rightarrow}, R^{\rightarrow})$$

La resolución completa de la ecuación de Schrödinger solo ha funcionado para describir el comportamiento de los átomos de hidrógeno, pero no para sistemas con átomos con más de un electrón, debido a que no puede hallar soluciones exactas para sistemas que involucren tres o más partículas que interactúan entre sí. Por lo tanto, cualquier solución que podamos encontrar para moléculas o átomos polieletrónicos solo puede ser una aproximación a las verdaderas soluciones reales de la ecuación de Schrödinger (Leach, 2001), como lo es la teoría funcional de densidades (DFT).

La DFT, es un método teórico químico-cuántico que ha sido utilizado ampliamente en la bioinformática para calcular la frecuencia de vibración de las moléculas y utilizarla para la interpretación de resultados experimentales (Andersson & Uvdal, 2005) basándose en la aproximación de la ecuación de Schrödinger mediante la modificación de un Hamiltoniano para describir partículas subatómicas en sistemas polieletrónicos (Hohenberg & Kohn, 1964). Los métodos DFT híbridos son especialmente buenos para los estudios de propiedades de energía basales; la aproximación Becke de tres parámetros Lee-Yang-Parr (B3LYP) es el método DFT híbrido más ampliamente utilizado, el cual normalmente se utilizó con el conjunto base 6-31G(d) a finales del siglo pasado y principios de este, considerándose un cálculo robusto que requiere de buena potencia computacional, dando a cambio una optimización precisa; sin embargo, la capacidad de los sistemas informáticos ha aumentado exponencialmente desde entonces, por lo que se han realizado modificaciones en el conjunto base utilizado por el método B3LYP, obteniendo resultados más precisos en el cálculo de frecuencias vibratorias moleculares (Andersson & Uvdal, 2005). En el presente trabajo, se utilizó el método B3LYP con el conjunto base 6-311+G(d,p), el cual requiere de mucha capacidad computacional pero da resultados mucho más precisos que los conjuntos base estándar como 6-31G(d), ya que su margen de error al calcular las frecuencias teóricas va de un 93.4% con porcentaje de error igual o menor a 2% usando 6-311+G(d,p) contra

57.5% con porcentaje de error igual o menor al 2% usando 6-31G(d) (Andersson & Uvdal, 2005).

Las moléculas utilizadas como ligandos en este trabajo (ácido gálico, memantina y dizocilpina) son relativamente pequeñas y se encuentran formadas por átomos de C, N, H y O fuertemente unidos entre sí, lo cual es requisito para utilizar el método B3LYP (Andersson & Uvdal, 2005). Se consideró necesaria una optimización molecular a estos ligandos para asegurar una correcta interacción con los receptores, puesto que son moléculas pequeñas y, por lo tanto, los equipos de cómputo pueden realizar un modelado mucho más acercado a procesos naturales mediante el uso de ecuaciones que resuelvan estructuras a escala atómica.

10.2 Modelado comparativo o por homología

A principios del nuevo milenio, se tenían alrededor de 850 000 secuencias proteicas descritas, de las cuales se conocía aproximadamente el 1% de sus estructuras tridimensionales (Schwede et al., 2003), esta diferencia sigue siendo algo normal hasta el día de hoy, pues obtener una estructura tridimensional mediante métodos convencionales como la cristalografía de rayos X es bastante costoso y difícil, es por ello que el modelado por homología, el cual utiliza estructuras proteicas ya conocidas para deducir aquellas con una secuencia parecida, es de gran importancia para obtener una estructura tridimensional proteica bastante precisa.

Modeller es un programa para modelamiento comparativo de proteínas el cual funciona mediante la satisfacción de sus restricciones espaciales (<https://salilab.org/modeller/>). El modelamiento comparativo utiliza estructuras proteicas determinadas experimentalmente para predecir la conformación de otras proteínas con secuencias de aminoácidos parecidas, esto se debe a que normalmente un cambio pequeño en la secuencia de aminoácidos genera un cambio pequeño en la estructura tridimensional, siendo que para moléculas muy parecidas, el modelamiento comparativo produce modelos con un R.S.M.D de apenas 1 Armstrong (Šali & Blundell, 1993). Existen distintos métodos de modelamiento comparativo, como pueden ser: por fragmentos de cuerpos rígidos, construcción de modelos con todos los átomos mediante restricción de distancias,

etc. En este caso estamos utilizando el método de satisfacción de restricciones espaciales, el cual se utiliza en el alineamiento de secuencias objetivo con plantillas homólogas de una estructura conocida (Šali & Blundell, 1993). Ejemplificando, el método de satisfacción de restricciones espaciales funciona de la siguiente manera:

Figura 4.

“Modelado proteico comparativo por la satisfacción de restricciones espaciales”

	1	2	3	4	5	6	7
structure A	A	f	<u>s</u>	t	l	N	t
structure B	A	f	<u>s</u>	s	i	N	<u>ĩ</u>
structure C	A	<u>Y</u>	p	s	i	<u>Š</u>	a
sequence X	G	F	D	T	I	T	T
extrapolation				↓			
structure X	G	f	<u>d</u>	t	i	T	<u>ĩ</u>

Método utilizado por Modeller para realizar modelamiento comparativo mediante el método de satisfacción de restricciones espaciales. Recuperado de: “Comparative protein modelling by satisfaction of spacial restraints”. Recuperado de Šali & Blundell, 1993.

Asumamos que se necesita calcular un modelo X a partir de las plantillas A, B y C. Primero, las estructuras tridimensionales son comparadas; para indicar las características espaciales de la estructura conocida, los residuos de aminoácidos son representados utilizando el formato del programa JOY, donde: las letras MAYÚSCULAS representan residuos de aminoácidos inaccesibles, mientras que las letras minúsculas representan a los que sí son accesibles; de igual forma, un subrayado representa un enlace hidrógeno hacia el carbonilo de la cadena central, las **Negritas** representan un enlace hidrógeno hacia el nitrógeno de la cadena central, una tilde (~) representa un enlace de hidrógeno entre cadenas laterales, las *cursivas* representan un ángulo diédrico positivo en la cadena central (Šali & Blundell, 1993). Así, la secuencia desconocida es alineada con las estructuras relacionadas para posteriormente transferir sus características espaciales a la

secuencia desconocida y así obtener las restricciones espaciales de esta estructura (Šali & Blundell, 1993).

El mapeo de puntos nos asegura que el acoplamiento molecular será realizado en el lugar indicado, en este caso no se pudo estandarizar un solo mapeo para cada conformación debido a que las proteínas fueron modeladas y su posicionamiento espacial variaba, aunque sí se utilizó una misma caja de puntos para cada mapeo, invariable en cada conformación, promoviendo que los ligandos interaccionaran en los mismos lugares al presentar las mismas condiciones. Se eligió que el acoplamiento molecular proporcionara 10 resultados para seleccionar el más convincente y descartando los errores.

Swissmodel (Schwede et al., 2003), al igual que Modeller, es un programa que utiliza modelado por homología; este programa se caracteriza por presentar una interfaz amigable con el usuario y trabajar con la menor cantidad de información proporcionada por el usuario, en algunos casos, únicamente una secuencia proteica. Este programa sigue una metodología de cuatro pasos catalogada como “ensamblaje rígido de fragmentos” que repite hasta lograr alcanzar un modelo ideal: selección de plantilla, alineamiento entre objetivo y plantilla, construcción del modelo y evaluación (Schwede et al., 2003).

10.3 Vina y ADFR

La medicina computacional ha cobrado gran importancia en las últimas décadas por su eficiencia en el desarrollo de fármacos de manera más efectiva al llevar a cabo simulaciones *in silico* de las interacciones fármaco-receptor mediante el uso de softwares, dando libertad al diseño y prueba de nuevos o ya conocidos compuestos químicos sin necesidad llevar a cabo experimentos en laboratorios. El proceso de reconocimiento de ligandos y receptores se basa en la coincidencia de formas espaciales y de energía, determinar la conformación de unión correcta de ligandos y receptores en la formación de estructuras complejas es la base para el diseño de fármacos y el estudio de su mecanismo de acción (Lin et al., 2020). Una de las mayores herramientas utilizadas actualmente para llevar a cabo los estudios de

estas interacciones es el docking o acoplamiento molecular, el cual consiste en una serie de procedimientos que buscan predecir el enlace no covalente entre moléculas, normalmente una macromolécula o receptor y una molécula pequeña o ligando (Trott & Olson, 2010). El fundamento general de los softwares de docking molecular recae en combinar algoritmos de búsqueda que evalúen energéticamente cada una de las conformaciones o poses generadas en el ligando dentro de la cavidad del receptor, sumado a un campo de fuerzas, es posible obtener un ordenamiento de los resultados calificado como "ranking" de las afinidades más favorables fisicoquímicamente (Salmaso & Moro, 2018). Dentro de los programas de acoplamiento molecular, la serie de programas de AutoDock Suite destaca por su versatilidad y amplio uso en la investigación. AutoDock Vina es un programa diseñado por el Dr. Oleg Trott, este software es especialmente bueno para realizar acoplamiento molecular (Trott & Olson, 2010); Vina es superior a otros programas de acoplamiento molecular como AutoDock 4 (también de AutoDock Suite) al presentar un RMSD promedio menor y dar resultados mucho más rápido, además de destacar por la facilidad en su uso, convirtiéndose en uno de los programas de acoplamiento molecular más usados de la década pasada. Sin embargo, en el 2015 fue lanzado AutoDock FR (ADFR), un programa de acoplamiento molecular que destaca por la flexibilidad conferida a los receptores, característica no presente en otros programas como Vina, donde si bien el ligando se puede considerar flexible, al receptor se le considera una estructura rígida que no presenta cambios estructurales, limitando la capacidad del programa para demostrar las interacciones entre el ligando y la proteína. ADFR utiliza la función de puntajes de AutoDock 4 implementada en una librería C++ para Python, al igual que su propio algoritmo genético, el cual tiene la capacidad de evolucionar y aprender a medida que va resolviendo lo que se le pide, eficientizando aún más el procedimiento y refinando los resultados; de igual forma, una de sus características más sobresalientes es el *árbol de flexibilidad*, el cual permite el estudio de distintos movimientos moleculares entre el ligando y el receptor (<https://ccsb.scripps.edu/adfr/>).

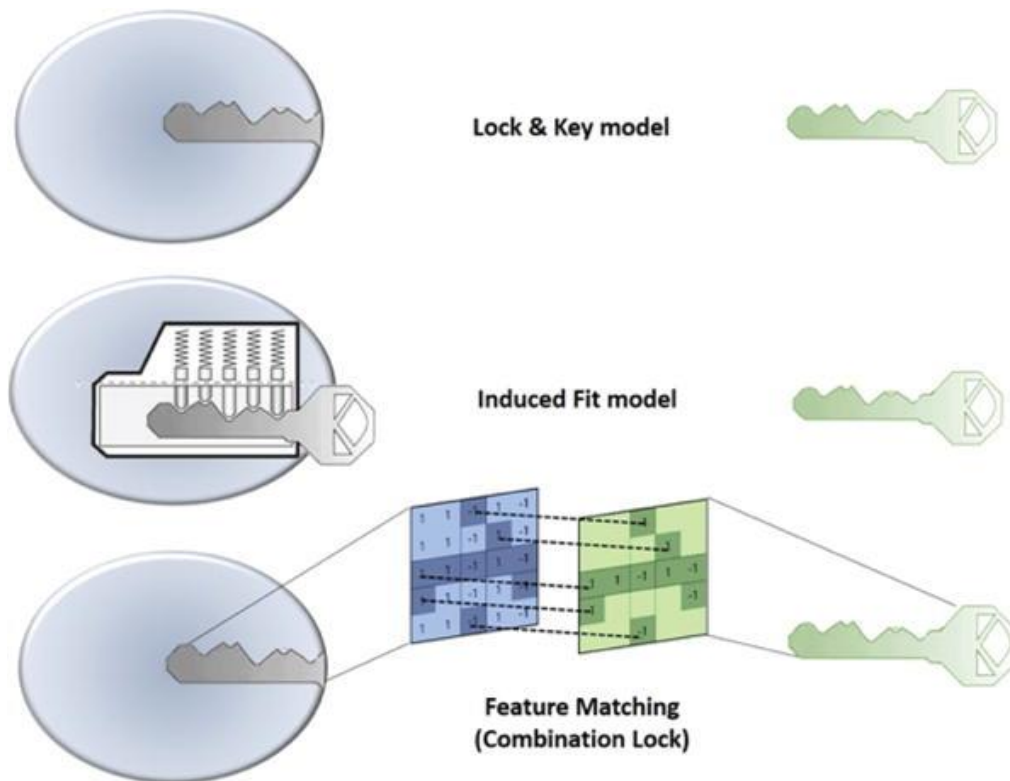
La flexibilidad en el receptor es de suma importancia para el presente estudio debido al recientemente descubierto cambio en la topología de los receptores NMDA según

las condiciones fisiológicas en la que se encuentre (Ravindranath et al., 2015), es por esto que se considera pertinente hacer una comparación entre los resultados de ambos programas, los cuales tienen distintos procesos y metodologías para realizar el acoplamiento molecular.

Se han utilizado distintos modelos para ejemplificar el funcionamiento de los acoplamientos moleculares, pero el más sencillo y útil hasta el momento es el de los modelos de “llave y cerradura” (Tripathi & Bankaitis, 2017), los cuales se muestran en la figura 5.

Figura 5.

“Representación de los distintos modelos de interacción ligando-proteína”



En modelo de llave y cerradura, el receptor y el ligando permanecen rígidos; en el modelo de encaje inducido el ligando se alinea con los residuos activos del receptor para inducir los cambios conformacionales que generarán una respuesta; finalmente, en la cerradura de combinación, tanto la proteína como el ligando se adaptan en búsqueda de la conformación que de la unión más estable posible.

Recuperado de: "Illustration of 'Lock and Key' (top), Induced fit (middle) and Combination Lock (bottom) model of protein-ligand binding interaction."

Recuperado de Tripathi & Bankaitis, 2017.

De acuerdo con esta analogía, un acoplamiento molecular rígido es representado por el modelo "llave y cerradura", un acoplamiento molecular en Vina es similar al modelo de "encaje inducido" debido a la flexibilidad concedida al receptor dentro del sitio de unión y un acoplamiento molecular por "cerradura de combinación" es similar al uso de ADFR, pues se le concede flexibilidad tanto al receptor como al ligando, se considera que este último es un modelo más acertado para demostrar las interacciones proteína-ligando (Tripathi & Bankaitis, 2017).

10.4 MolProbity

La construcción de modelos proteicos tridimensionales proveen información vital sobre la disposición atómica de las proteínas y con ello, se vuelve un paso indispensable para poder realizar análisis bioinformáticos sobre su afinidad con ligandos, pero estos modelos no se encuentran exentos de errores que pueden alterar significativamente la naturaleza de la molécula, volviéndola no apta para análisis bioinformáticos y dando lugar a la malinterpretación de resultados obtenidos en procesos delicados como el acoplamiento molecular; es por ello que se necesita evaluar los modelos obtenidos tanto de cristalografía como de modelado por homología (Chen et al., 2010). MolProbity (Williams et al., 2018) es un programa bioinformático que se encarga de calificar los resultados de la estructura tridimensional obtenida del proceso de modelado, mediante cálculos en su estructura, como la validación usando diagrama de Ramachandran y el criterio de rotámeros de aminoácidos de cadena lateral, logrando así un correcto posicionamiento de las partes que conforman la proteína en sus distintos ángulos posibles Phi (Φ) y Psi (ψ), al igual que un análisis de contacto de todos los átomos, incluyendo hidrógenos, dado que su adición en los cálculos nos confiere la seguridad de evitar falsos negativos por colisiones entre átomos, normalmente pasadas por alto al no tomarlos en cuenta.

Al modelar las proteínas humanas a partir de homólogos provenientes de otra especie, a pesar de que la similitud entre la secuencia de ambas proteínas es cercana al 100%, no se puede estar seguro de que la proteína se encuentra en condiciones ideales para un proceso tan delicado como lo es el acoplamiento molecular, tomando en cuenta que uno de los factores considerados por la validación es el espacio entre átomos, el cual afecta directamente la afinidad de los receptores por el ligando; por lo anterior, se decidió validar las proteínas obtenidas en busca de posibles errores críticos que afectaran la calidad de los resultados.

10. Metodología

11.1 Capacidad de cómputo y sistemas operativos

Dentro de las limitaciones del estudio se consiguió un equipo con procesador Intel(R) Core(TM) i5-10300H a 2.50GHz el cual se identificará posteriormente como Lp1 para realizar el acoplamiento molecular en ADFR y otro con procesador Intel(R) Core(TM) i7-8750H a 2.20GHz el cual se identificará posteriormente como Lp2. Además, se contó con acceso remoto a un nodo del Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) mediante un canal cifrado dentro de la aplicación SSH Secure Shell Client; el LNS opera con la distribución RedHat Enterprise Linux versión 6.6 y los paquetes de softwares extras instalados dentro del nodo de operación también pertenecen a GNU. Los softwares utilizados dentro las diferentes etapas metodológicas provienen de una licencia libre y de código abierto GNU/GPL por lo cual se realizó la adaptación del equipo computacional a la distribución Ubuntu 20.04.3 LTS (sistema operativo con kernel en Linux basado en Debian).

11.2 Preparación de receptor

Se seleccionaron los receptores de rata de acuerdo a sus conformaciones, las cuales se muestran en la tabla 1, al igual que la proteína de humano obtenida de la base de datos Protein Data Bank (PDB) con el ID: 6IRA, la cual funcionará como objetivo para el modelado molecular. Primero, se minimizaron las proteínas obtenidas de la rata, usando los parámetros de la librería dunbrack con el programa Modeller (Šali & Blundell, 1993), para lograr una mejor aproximación en el estado

fisicoquímico de las estructuras se utilizó de Modeller debido a que las proteínas de rata no presentaban una estructura cristalográfica completa, dejando huecos en zonas importantes para las interacciones entre receptor y ligando. Las moléculas descargadas de PDB carecen de los datos necesarios para llevar a cabo el acoplamiento molecular, por lo que es necesario agregarle hidrógenos, ocultarle los hidrógenos no polares, ya que, si bien debe reconocer los impedimentos estéricos por la ocupación de todos los átomos, son solo los hidrógenos polares aquellos que generan interacciones de tipo puente de hidrógeno dentro de la cavidad; y modelar las secuencias faltantes para un correcto acoplamiento molecular. Una vez se obtuvieron las moléculas minimizadas, solicitamos al programa Swissmodel (Schwede et al., 2003) modelar los receptores de *homo sapiens*, basándose en su secuencia nucleotídica, a partir de los modelos tridimensionales de los receptores de *rattus norvegicus*. Puesto que los receptores NMDA están conformados por un tetrámero de dos pares de cadenas idénticas, se requirió modelar cada par de secuencias por separado. Una vez se obtuvieron todas las cadenas de cada proteína, se volvieron a minimizar utilizando Modeller. Se unieron las cadenas minimizadas utilizando su secuencia proteica en un archivo de texto. Se visualizó el resultado de la molécula completa en UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004), comprobando que cada cadena minimizada correspondiera a la proteína completa. Para comprobar la mejora en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos y la disminución de solapamiento entre ellos se validaron las estructuras proteicas en MolProbity (Williams et al., 2018). Finalmente, se convirtieron las proteínas al formato .pdbqt requerido por AutoDockTools y ADFR (Morris et al., 2009).

Tabla 1.

“Distintas conformaciones de los receptores NMDA y su respectivo PDB ID”

Receptor	PDB ID	Resolución
NMDAR_2KS	6MMR	5.13 Å
NMDAR_2KA	6MML	7.14 Å

NMDAR_1K	6MMK	6.08 Å
NMDAR_E	6MMM	6.84 Å
NMDAR_E2	6MMH	8.21 Å
NMDAR_SO	6MMI	8.93 Å
NMDAR_SS	6MMJ	16.5 Å

Distintas conformaciones del receptor NMDAR pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus*, con sus respectivos IDs y resoluciones. Todas las proteínas provienen de (Jalali-Yazdi et al., 2018).

11.3 Preparación de ligandos

Se creó el ácido gálico a partir de su matriz Z en el software GaussView (Gaussian 09), utilizando como andamio la estructura PubChem CID: 370. Los fármacos de referencia dizocilpina (mk-801) y memantina fueron obtenidos directamente del PDB, con los ID: BMK y 377, respectivamente. Posteriormente, se le agregaron hidrógenos y se calculó la carga de los ligandos utilizando el Software AutoDockTools, acto seguido, se utilizó el clúster del LNS para realizar las optimizaciones moleculares de todos los ligandos con la metodología B3LYP con el conjunto base 6-31+G(d,p). Finalmente, se convirtieron los ligandos al formato .pdbqt, el cual incluye torsiones, cargas e hidrógenos polares explícitos, usando AutoDockTools; este formato es utilizado por los dos softwares de acoplamiento molecular.

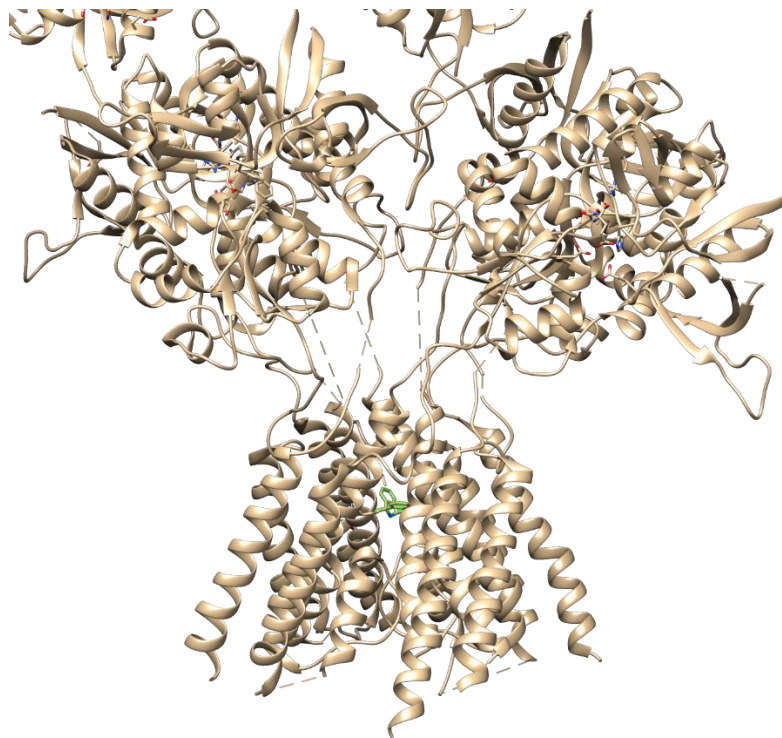
11.4 Docking

11.41 AutoDock Vina

Para realizar los acoplamientos moleculares en AutoDock Vina nos apoyamos de un receptor NMDA con los fármacos antagonistas de referencia unidos al motivo SYTANLAAF, el cual fue obtenido del PDB con el ID: 5UN1 (Song et al., 2018). El archivo de referencia fue descargado y visualizado en UCSF Chimera, como se muestra en la figura 6.

Figura 6.

“Receptor NMDA con Dizocilpina interaccionando con el motivo SYTANLAAF”

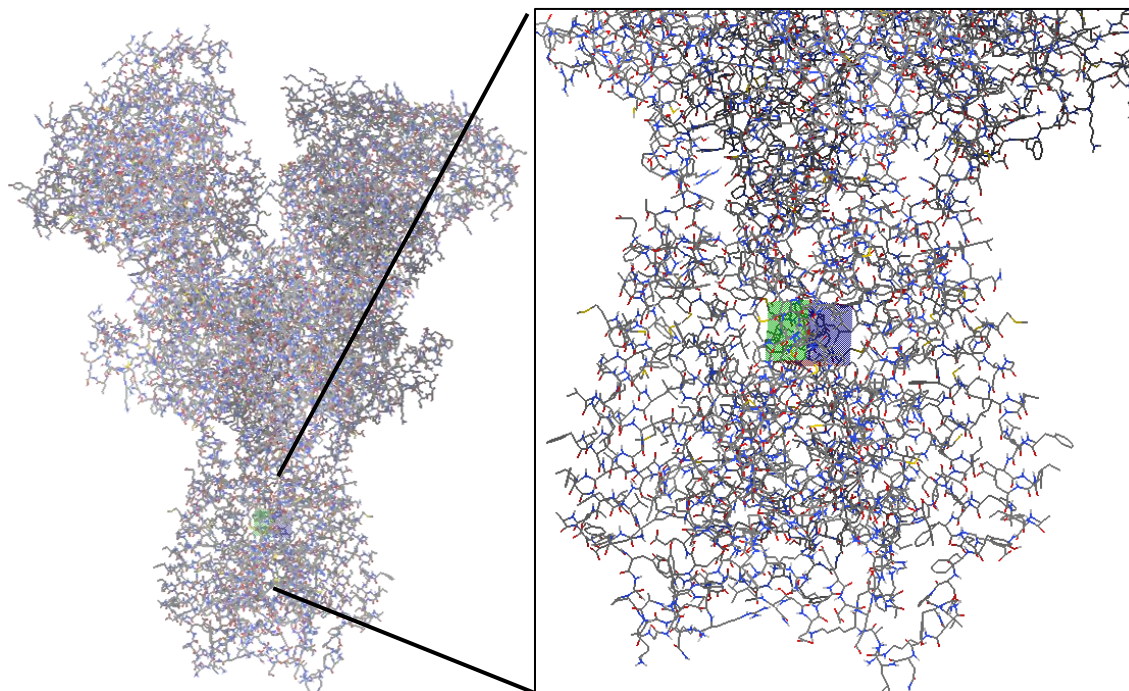


Se recortó la imagen y se eliminaron residuos innecesarios dentro del archivo para una mejor visualización de la zona de interés. La dizocilpina se encuentra remarcada en verde. Recuperado de Song et al., 2018.

Debido a que las proteínas utilizadas fueron modeladas y minimizadas, no conservaron las coordenadas espaciales de las proteínas descargadas, por lo que para construir las cajas de unión o “gridbox” se utilizó el apoyo de la interfaz de AutoDockTools, como se muestra en la figura 7.

Figura 7.

“Construcción de las gridbox utilizando AutoDockTools”



Debido a que cada proteína presenta posiciones distintas dentro del sistema de coordenadas de AutoDockTools, se determinó la posición de cada caja de unión de forma manual. Cada caja de unión fue formada con dimensiones de 20x20x20 puntos con un espacio de 1 armstrong. (Morris et al., 2009)

Una vez definidas las cajas de unión de cada conformación se realizó el acoplamiento molecular mediante Autodock Vina vía Linux y se visualizaron los resultados en UCSF Chimera.

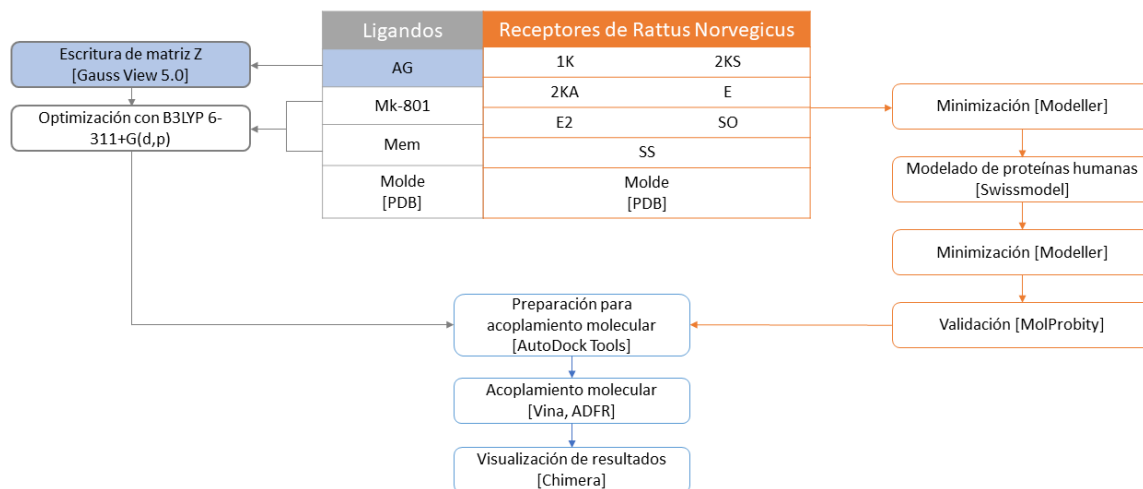
11.42 AutoDock FR

Se utilizó la herramienta AGFRgui para asignar los bolsillos o “pockets” dentro del receptor, cada bolsillo representa un área de posible acoplamiento molecular, se seleccionó el bolsillo que correspondiera al área de acoplamiento de los fármacos de referencia, por lo que fue un proceso automático a diferencia de la construcción de las cajas de unión en Vina, las cuales se definieron de forma manual; se utilizó un relleno o “padding” de 8.00 Å. para establecer la gridbox alrededor del bolsillo, lo que nos generó un archivo target o .trg, el cual fue reconocido por ADFR para correr el acoplamiento molecular. El acoplamiento en LP1 se corrió a 50 repeticiones de

2.5 millones de evaluaciones de algoritmo genético cada una, mientras que en LNS fueron 100 repeticiones de 2.5 millones de evaluaciones de algoritmo genético.

Figura 8.

“Diagrama general de la metodología”



Entre corchetes se muestran los programas utilizados para llevar a cabo el proceso, en gris se muestran los procesos de preparación de ligandos, en naranja se muestran los procesos de preparación de receptores y en azul se muestran los procesos referentes al acoplamiento molecular y el análisis de resultados.

11. Resultados y discusiones

9.1 Modelado por homología

Después de modelar y minimizar a los receptores, se validaron sus estructuras tridimensionales usando el software MolProbity (Williams et al., 2018), el cual “puntuó” los resultados de cada uno de los receptores tras la minimización de los mismos, mostrando una mejora en la organización espacial de los residuos disminuyendo el contacto entre ellos, corrigiendo los ángulos, las torsiones, las distancias de enlace con lo que se obtuvo una puntuación favorable para todos ellos (ver anexos).

9.2 Acoplamiento molecular en Vina

Los resultados obtenidos mediante AutoDock Vina utilizando Lp2 se muestran en la tabla 2 y la figura 9.

Tabla 2.

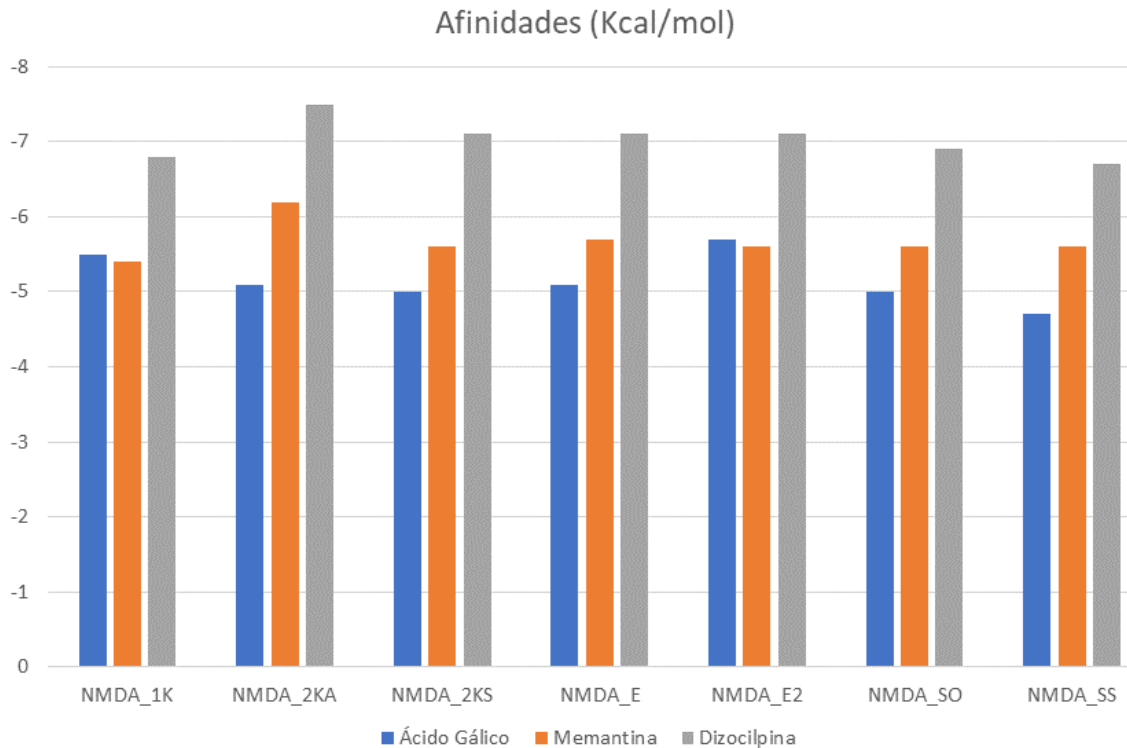
“Afinidades obtenidas del acoplamiento molecular de los ligandos con los receptores utilizando AutoDock Vina en laptop.”

Conformación proteica del receptor NMDA	Ligandos y afinidades (Kcal/mol)		
	Dizocilpina	Memantina	Ácido gálico
2KS	-7.1	-5.6	-5.0
2KA	-7.5	-6.2	-5.1
1K	-6.8	-5.4	-5.5
E1	-7.1	-5.7	-5.1
E2	-7.1	-5.6	-5.7
SO	-6.9	-5.6	-5.0
SS	-6.7	-5.6	-4.7

Cada acoplamiento molecular en AutoDock Vina arrojó 10 resultados, de entre los que se eligió el mejor, tomando en cuenta afinidad y posición.

Figura 9.

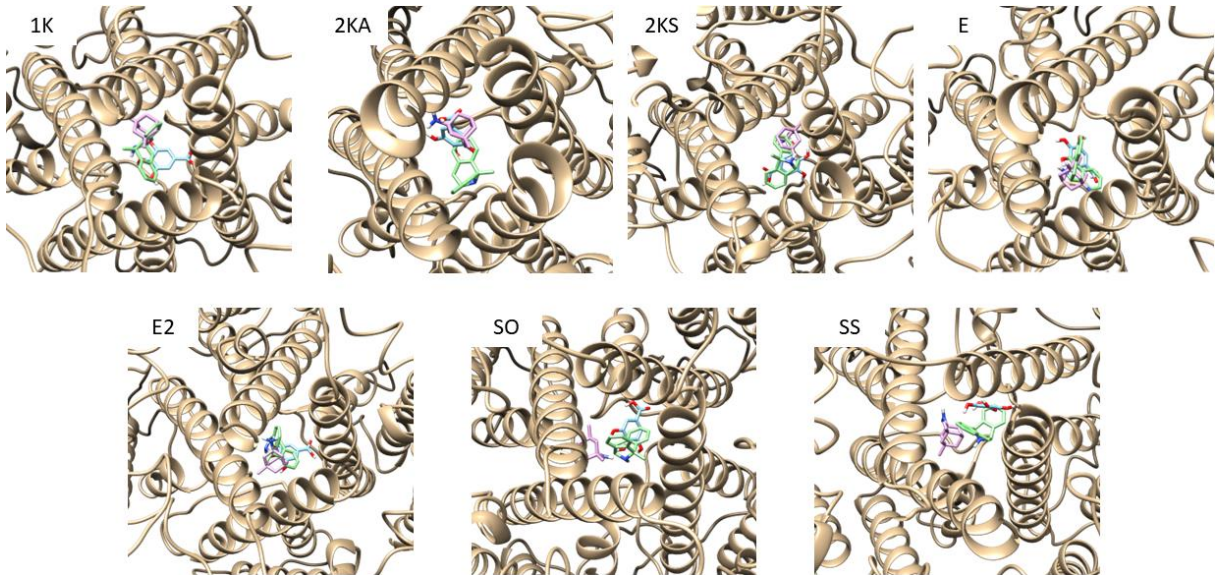
“Afinidades obtenidas del acoplamiento molecular de los ligandos con los receptores utilizando AutoDock Vina en laptop.”



Los resultados del acoplamiento molecular en Vina mostraron una clara tendencia de afinidades: la dizocilpina es el fármaco más afín al receptor NMDA, seguido por la memantina y finalmente el ácido gálico; las varianzas entre los valores obtenidos por cada conformación no son muy grandes, obteniendo los valores más altos para la dizocilpina en la conformación 2KA, los cuales son muy cercanos a los resultados reportados en otro artículo (Espadinha et al., 2020), donde utilizando el NMDAR GluN1/GluN2B, se obtuvieron valores de afinidad de -7.4kcal/mol para MK-801 (Dizocilpina) y -6.1kcal/mol para Memantina, esto tiene sentido pues se ha demostrado que la afinidad de algunos medicamentos varía según el tipo de receptor NMDA utilizado (Paoletti & Neyton, 2007), pero en el caso específico de Dizocilpina y Memantina, la afinidad no cambia entre los receptores NMDA GluN1/GluN2B y NMDA GluN1/GluN2A.

Figura 10.

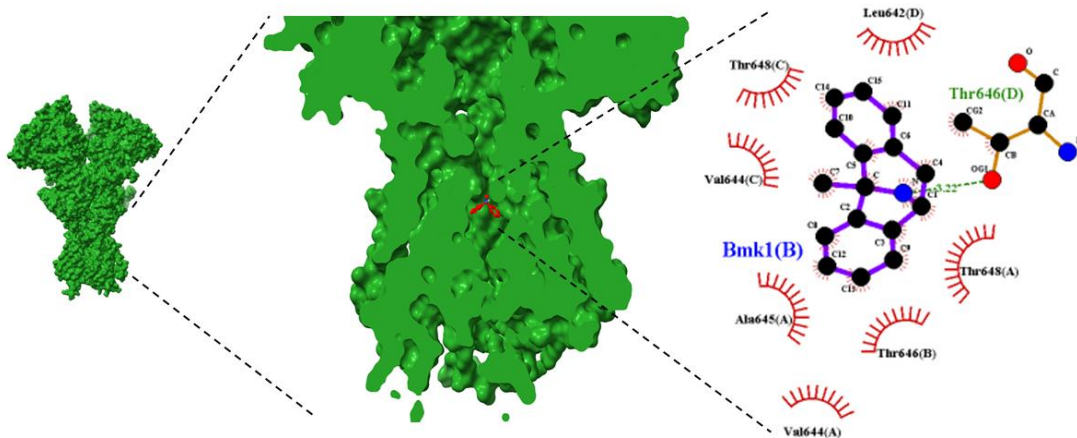
“Resultados del acoplamiento molecular usando AutoDock Vina”



En cada imagen el ácido gálico se muestra en azul, la memantina en rosa y la dizocilpina en verde. Los resultados en Vina demuestran que los tres ligandos están interaccionando en el mismo hueco dentro del dominio TMD. De igual manera, se puede apreciar que en las conformaciones E, E2, SO y SS el canal se ve menos simétrico que en las conformaciones 1K, 2KA y 2KS, lo cual se fundamenta en su cambio conformacional mostrado en la figura 3, el cual es reportado en el artículo propuesto por (Jalali-Yazdi et al., 2018); este cambio en el canal afecta la probabilidad apertura o cierre del canal y, por lo tanto, puede afectar la afinidad de la proteína por los ligandos.

Figura 11.

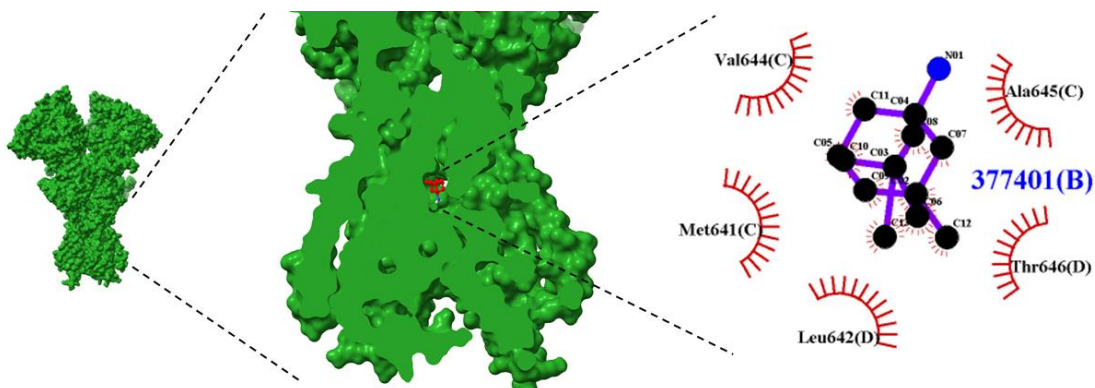
“Acoplamiento molecular de la dizocilpina en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interacciona, utilizando el software AutoDock Vina.”



Se puede observar que la dizocilpina interactúa con la treonina 646 mediante puentes de hidrógeno y mediante fuerzas de Van der Waals con la misma treonina 646 (aunque en otra parte de la molécula), y 648 (en dos partes de la misma molécula), con la valina 644 (en dos partes de la misma molécula), con la alanina 645 y con la leucina 642.

Figura 12.

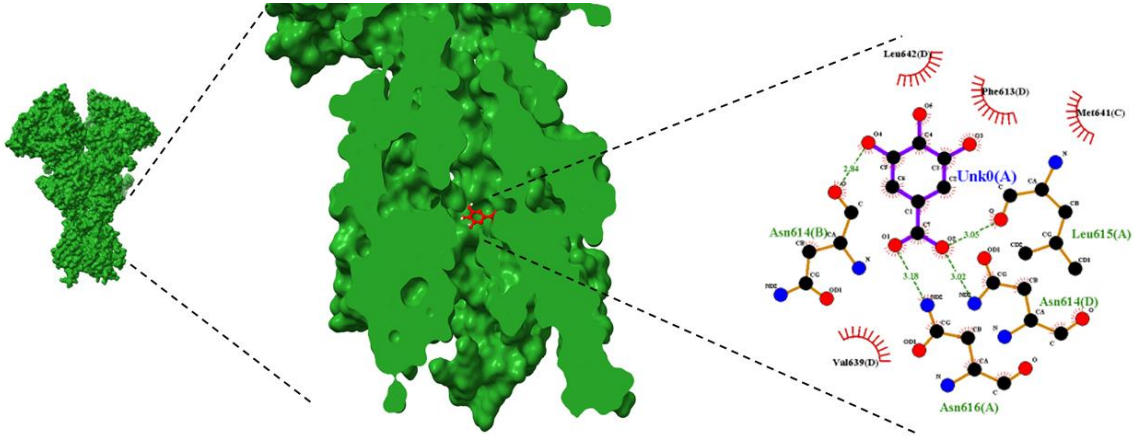
“Acoplamiento molecular de la memantina en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interactúa, utilizando el software AutoDock Vina.”



La memantina interactuó únicamente mediante fuerzas de Van der Waals, y lo hizo con los residuos: Valina 644, Metionina 641, leucina 642, treonina 646 y alanina 645.

Figura 13.

“Acoplamiento molecular del ácido gálico en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interacciona, utilizando el software AutoDock Vina.”

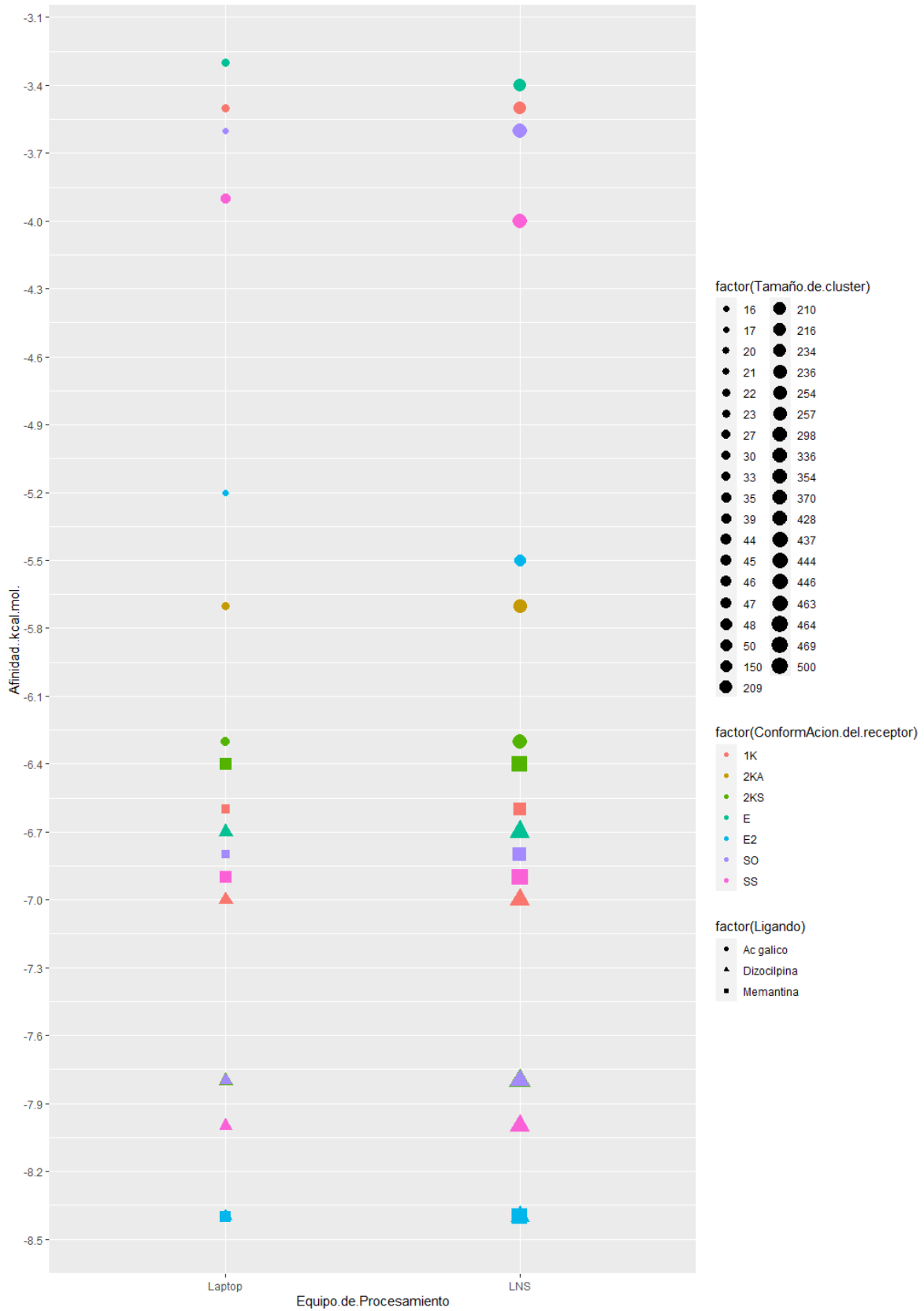


El ácido gálico interactuó mediante puentes de hidrógeno con los residuos: leucina 615, asparagina 614 (en dos partes diferentes) y 616; además, se presentaron interacciones de Van der Waals con la leucina 642, la fenilalanina 613, la metionina 641 y la valina 639.

9.3 Acoplamiento molecular en ADFR

Figura 14.

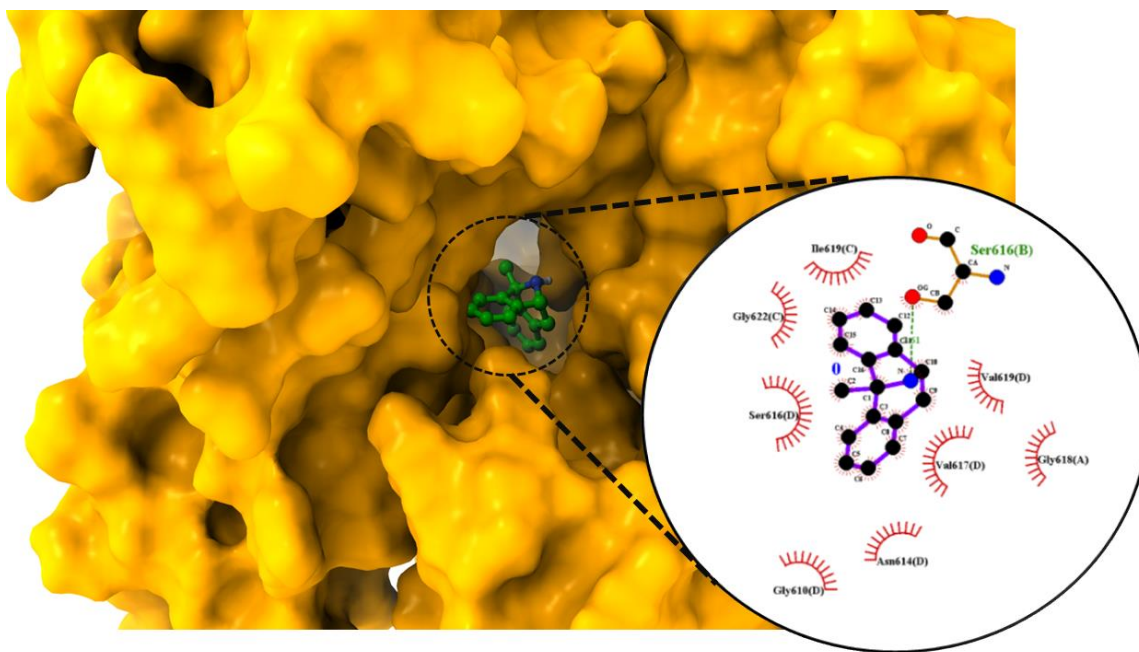
“Resultados obtenidos de los acoplamientos moleculares usando ADFR”



Dentro de cada acoplamiento molecular, se eligieron los resultados con el tamaño de clúster más grande, lo cual hace referencia a la cantidad de veces que un acoplamiento presentó la misma posición y afinidad, es por esto que los resultados en el LNS presentan figuras más grandes, al haber realizado más repeticiones, se presentaron clústeres más grandes. Se puede observar que los resultados entre equipos de cómputo fueron muy similares, lo cual sirve de prueba para demostrar la exactitud de los acoplamientos. De igual manera, se puede observar una clara tendencia en afinidad: Dizocilpina>Memantina>Ácido gálico.

Figura 15.

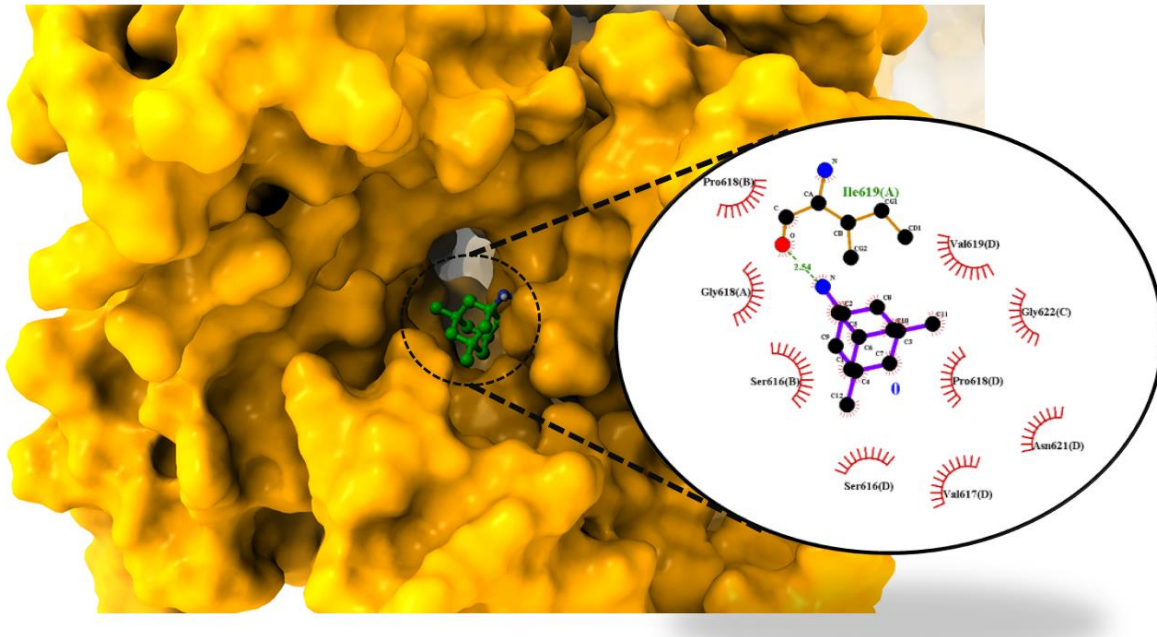
“Acoplamiento molecular de la dizocilpina en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interacciona, mediante el software ADFR.”



Se puede observar que el grupo amino de la dizocilpina interacciona mediante puentes de hidrógeno con un grupo hidroxilo de una serina, mencionada como Serina 616. De igual manera, se pueden observar interacciones de Van der Waals con varios otros aminoácidos como la isoleucina 619, valina 619 y 617, la glicina 610, 618 y 622 y asparagina 614.

Figura 16.

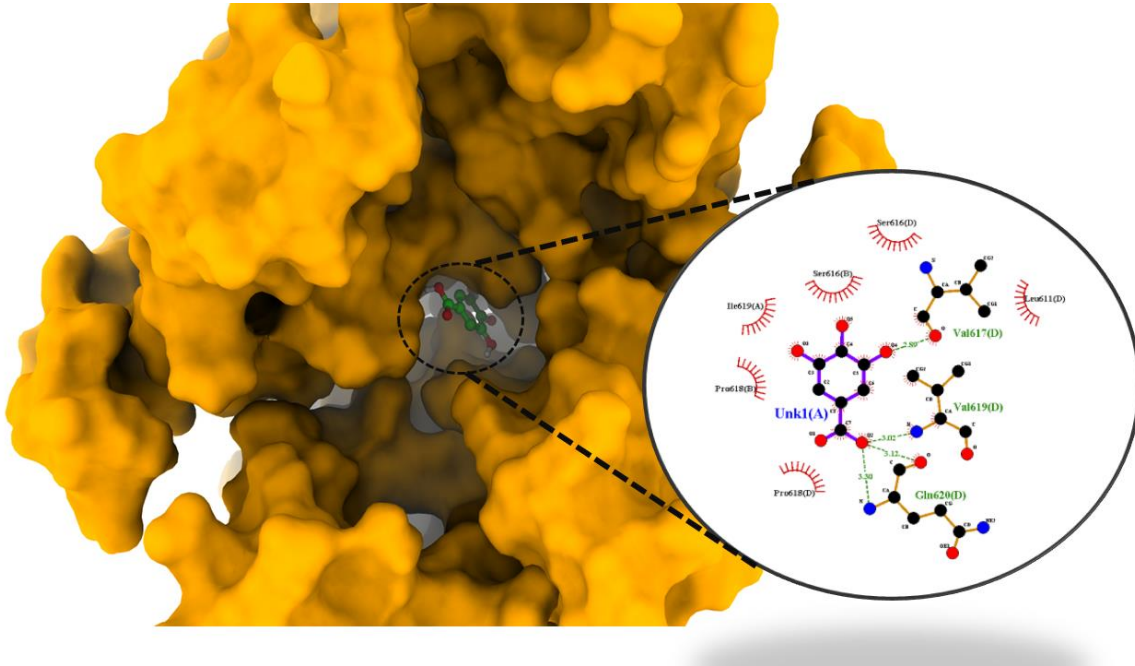
“Acoplamiento molecular de la memantina en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interacciona.”



El grupo amino de la memantina interaccionó eficientemente con el grupo hidroxilo de la isoleucina 619 mediante un puente de hidrógeno, al igual que presentó interacciones de van der Waals con la prolina 618, la glicina 618 y 622, la valina 617 y 619, la serina 616 y la asparagina 621.

Figura 17.

“Acoplamiento molecular del ácido gálico en el receptor 2KS junto con los residuos con los que interacciona.”



El ácido gálico interaccionó mediante puentes de hidrógeno con la valina 617 (hidroxilo-hidroxilo), la valina 619 (hidroxilo-amino) y la glutamina 620 (hidroxilo-hidroxilo, hidroxilo-amino), además de presentar interacciones de van der Waals con la serina 616, la leucina 611, la isoleucina 619 y la prolina 618.

12. Discusión:

De acuerdo con lo propuesto en otros artículos (Jalali-Yazdi et al., 2018), se nos menciona que las conformaciones 2KA, 2KS presentan una mayor probabilidad de tener el canal iónico abierto, estado en el que interaccionan los fármacos antagonistas para bloquear el canal (Lipton, 2006); seguidos de las conformaciones E y E2 y, finalmente, las conformaciones 1K, SO y SS, en las cuales el canal iónico tiene más probabilidades de encontrarse cerrado. Sin embargo, dentro los resultados obtenidos utilizando AutoDock Vina no se encuentra una tendencia clara en cuanto a los valores de afinidad, pues si bien parece haber una tendencia de mayor afinidad hacia las conformaciones con el canal iónico abierto, el ácido gálico no la sigue y la memantina no cambia mucho sus valores de afinidad de acuerdo con las conformaciones, siendo la conformación 2KA el resultado más representativo y cercano a lo reportado por (Espadinha et al., 2020). Estos resultados pueden deberse a varias razones: la naturaleza del acoplamiento, ya que

la construcción de la caja de puntos fue manual; el que Vina no toma en cuenta la flexibilidad de los residuos dentro de la proteína; el enorme tamaño de la proteína y su gran cantidad de espacios para la interacción de ligandos; el que el equipo de cómputo (Lp2) no fue tan potente como el LNS y no se muestra el tamaño de los clústeres para cada resultado, debido a que se tuvo que elegir arbitrariamente entre los resultados obtenidos de cada acoplamiento, como se mencionó anteriormente. Es por esto que se consideró importante utilizar ADFR para obtener más resultados, ya que la construcción de los sitios de unión a ligandos es más precisa y los receptores son flexibles, resultando en datos más exactos.

Los resultados de afinidad obtenidos utilizando ADFR varían considerablemente en comparación con los obtenidos en AutoDock Vina, donde ahora el ácido gálico interacciona más fuertemente con las conformaciones abiertas (2KS y 2KA) pero la dizocilpina y la memantina presentan interacciones fuertes con las conformaciones con el canal cerrado, pues en la conformación E2 se obtuvo el valor de afinidad más alto para ambas biomoléculas, sin embargo, estos resultados son normales debido a que (Jalali-Yazdi et al., 2018) prueba en su artículo que la dizocilpina se mantiene más tiempo ligada al receptor en concentraciones altas de zinc, y son justamente estas conformaciones (E2, SO, SS) las que presentan concentraciones altas de zinc (ver figura 25 en anexos), siendo la conformación E2 aquella que tiene mayor probabilidad de presentar el canal abierto, además de ser la más parecida a las conformaciones 2KS y 2KA. En cuanto a los valores de afinidad, se puede notar que los valores reportados distan de otras investigaciones (Espadinha et al., 2020), sin embargo, esto también es normal debido a que estas investigaciones reportaron una única conformación, la cual se puede notar tiene la zona ATD cerrada, como en las figuras 1 y 2, por lo que puede ser alguna de las conformaciones tipo “knucle” (1K, 2KS o 2KA), por consiguiente, el resultado de la conformación 2KA en AutoDock Vina es el más parecido a lo reportado en dichas investigaciones, sin embargo, (Jalali-Yazdi et al., 2018) menciona que los cambios conformacionales entre 2KS y 2KA son mínimos, por lo que su afinidad por los ligandos debería ser igual, como se ve en los resultados de ADFR, donde la conformación 2KS fue la que más se acercó a lo reportado por (Espadinha et al., 2020).

En cuanto a los resultados de las interacciones en Vina, podemos observar que en las figuras 11, 12 y 13 se presentan interacciones con residuos en común entre los ligandos: la treonina 646 reacciona mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals con la dizocilpina y mediante fuerzas de Van der Waals con la memantina; de igual manera, la dizocilpina y la memantina comparten interacciones de Van der Waals con la valina 644 y la alanina 645; por su parte, la memantina y el ácido gálico interactúan con la metionina 641 mediante fuerzas de Van der Waals; finalmente los tres ligandos comparten interacciones de Van der Waals con la leucina 642, lo cual nos demuestra que se posicionaron en la misma parte del canal iónico, como se puede apreciar en la figura 10.

Por su parte, en los resultados obtenidos en ADFR (figuras 15, 16 y 17) se puede observar que los tres ligandos interactúan con residuos en común: el AG presenta puentes de hidrógeno con la valina 617 y 619, mientras que la dizocilpina y la memantina interactúan con el mismo residuo mediante fuerzas de van der Waals; la mem y el AG presentan interacciones de van der Waals con la prolina 618; la mem presenta puentes de hidrógeno con la isoleucina 619 mientras el AG y la diz presentan interacciones de van der Waals; la diz presenta un puente de hidrógeno con la serina 616 y el AG y la mem interactúan mediante fuerzas de van der Waals; la mem y la diz presentan interacciones de Van der Waals con las glicinas 618 y 622.

En lo que respecta a las interacciones en común entre Vina y ADFR, tenemos únicamente la asparagina 614 del AG en Vina y la dizocilpina en ADFR, lo cual nos indica que el sitio de interacción proteína-ligando del software Vina y ADFR fue muy cercano entre sí, sin embargo, no fue exactamente el mismo, pues no hubo ninguna otra coincidencia, a pesar de tratarse de los mismos ligandos interactuando con la misma proteína; esto a su vez se explica las diferencias obtenidas para las afinidades de cada interacción (tabla 2 y figura 9 para Vina y figura 14 para ADFR). Sin embargo, existieron muchas coincidencias entre los ligandos al usar el mismo programa de acoplamiento, demostrándonos que en cada caso (Vina y ADFR) los ligandos sí se encuentran interactuando en el mismo sitio dentro de la proteína.

Algo que cabe resaltar es que tanto la dizocilpina como la memantina presentan grupos amino, los cuales facilitan y fortalecen interacciones con grupos hidroxilo de los residuos proteicos, como se ve en las figuras 15 y 16, pero son los grupos hidroxilo del ácido gálico los que le permiten interactuar con otros grupos hidroxilo y con grupos amino, sin embargo, estas interacciones pueden no ser tan fuertes como las de los fármacos de referencia, resultando en una afinidad general menor, sin embargo, cabe resaltar que una afinidad menor no significa que el ácido gálico sea una peor opción para el tratamiento de neuropatías relacionadas con el mal funcionamiento del receptor NMDA, ya que son los agonistas no competitivos los que regulan el mal funcionamiento del canal, bloqueando a los agonistas de forma no permanente, ya que, debido a la alta sensibilidad del receptor, si el ligando se uniera de forma definitiva, se producirían otras neuropatías (Rothman & Olney, 1987).

Así, estos resultados demuestran la eficiencia de ambos programas para obtener acoplamiento molecular con las distintas conformaciones del receptor NMDA, obteniendo resultados distintos para cada conformación, lo cual tiene su base tanto en la construcción de los sitios de unión a ligandos (manual para Vina y automática para ADFR) como en la naturaleza del software de acoplamiento; sin embargo, utilizando ambos softwares de acoplamiento, la tendencia de mayor afinidad para la dizocilpina y menor afinidad para el ácido gálico se mantuvo de forma general y la unión al mismo sitio dentro del canal en todas las conformaciones se puede observar de forma superficial en Vina (figura 10) y de forma específica tanto en Vina (figuras 11, 12 y 13) como en ADFR (figuras 15, 16 y 17).

13. Conclusiones

Se modelaron los receptores de humano a partir de los de rata, validando los resultados y obteniendo calificaciones aceptables (arriba de 0.91) para todos los modelos.

Se realizaron acoplamiento molecular con resultados satisfactorios con el ácido gálico al presentar interacciones con residuos en común con los fármacos de

referencia, al igual que afinidades menores pero similares a los mismos, las cuales variaron muy poco entre programas y equipos de cómputo.

Se logró demostrar que el ácido gálico puede tener una actividad reguladora del canal mediante su unión a la misma zona del dominio TMD que los fármacos de referencia, demostrando la tesis propuesta por Karen Caporal (Caporal Hernández & Samuel Treviño Mora, 2018).

14. Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se espera que se lleven a cabo más investigaciones con respecto a las propiedades neuroprotectoras del ácido gálico, ya que su uso presenta una alternativa prometedora al uso de fármacos.

De igual forma, se espera que los posteriores estudios *in silico* con el receptor NMDA tomen en cuenta las distintas conformaciones que puede tomar dependiendo de las condiciones en las que se encuentre, ya que estos cambios afectan claramente la afinidad de los ligandos por el receptor.

15. Bibliografía

1. "Pharmacology Guide: In vitro pharmacology: concentration-response curves." *GlaxoWellcome*. Recuperado el 6 de mayo de 2022.
2. Andersson, M. P., & Uvdal, P. (2005). New scale factors for harmonic vibrational frequencies using the B3LYP density functional method with the triple- ζ basis set 6-311+ G (d, p). *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(12), 2937-2941. <https://doi.org/10.1021/jp045733a>
3. Ban, J. Y., Nguyen, H. T. T., Lee, H. J., Cho, S. O., Ju, H. S., Kim, J. Y., ... & Seong, Y. H. (2008). Neuroprotective properties of gallic acid from *Sanguisorbae Radix* on amyloid β protein (25—35)-Induced toxicity in cultured rat cortical neurons. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 31(1), 149-153.
4. Biology NRC (US). Bioinformatics. Pool R, Esnayra J, editors. *Bioinformatics: Converting Data to Knowledge: Workshop Summary*. Washington, D.C.: National Academies Press (US); 2000. 54 p.
5. Caporal Hernández, K., & Samuel Treviño Mora, D. (2018). *Efecto de la administración del ácido gálico sobre la estructura y función de neuronas del hipocampo en ratas con síndrome metabólico y sus consecuencias sobre la memoria de reconocimiento*. [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/9142>
6. Chang, H. R., & Kuo, C. C. (2008). The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, 28(7), 1546-1556.
7. Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... & Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1), 12-21.
8. Colquitt RB, Colquhoun DA, Thiele RH. In silico modelling of physiologic systems. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2011;25(4):499–510.
9. Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The lancet*, 365(9468), 1415-1428.
10. Espadinha, M., Viejo, L., Lopes, R. M. R. M., Herrera-Arozamena, C., Molins, E., dos Santos, D. J. V. A., Gonçalves, L., Rodríguez-Franco, M. I., Ríos, C.

- de los, & Santos, M. M. M. (2020). Identification of tetracyclic lactams as NMDA receptor antagonists with potential application in neurological disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *194*, 112242.
11. Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, *7*(2), 83-89.
 12. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, *20*(7), 13384-13421.
 13. Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
 14. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev.* 1964 Nov;136(3B):B864--B871.
 15. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (2016). La obesidad en México.
 16. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE ENERO A AGOSTO DE 2020.
 17. Jalali-Yazdi, F., Chowdhury, S., Yoshioka, C., & Gouaux, E. (2018). Mechanisms for Zinc and Proton Inhibition of the GluN1/GluN2A NMDA

Receptor. *Cell*, 175(6), 1520-1532.e15.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.043>

18. Leach A. R. *Molecular Modelling Principles and Applications*. 2nd Ed. Prentice Hall; 2001. 773 p.
19. Lee, C. H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., & Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*, 511(7508), 191-197.
20. Lewars E. *Computational Chemistry. Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*. Ontario: Kluwer Academic Publishers; 2003. 482 p.
21. Lin, X., Li, X., & Lin, X. (2020). A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061375>
22. Lipton, S. A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 5, Issue 2, pp. 160–170). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1958>
23. Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
24. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
25. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461
26. Olney, J. W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D. F., Price, M. T., & Sesma, M. A. (1991). NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*, 254(5037), 1515-1518.

27. Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 39–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
28. Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 6, pp. 383–400). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
29. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
30. Ravindranath, P. A., Forli, S., Goodsell, D. S., Olson, A. J., & Sanner, M. F. (2015). AutoDockFR: advances in protein-ligand docking with explicitly specified binding site flexibility. *PLoS computational biology*, 11(12), e1004586.
31. Robinson, D. M., & Keating, G. M. (2006). Memantine: A review of its use in Alzheimer's disease. In *Drugs* (Vol. 66, Issue 11, pp. 1515–1534). Springer. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666110-00015>
32. Rothman, S. M., & Olney, J. W. (1987). Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends in neurosciences*, 10(7), 299-302.
33. Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
34. Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
35. Sarkaki, A., Fathimoghaddam, H., Mansouri, S. M. T., Shahram Korram, M., Saki, G., & Farbood, Y. (2014). *Gallic acid improves cognitive, hippocampal long-term potentiation deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats*. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

84897139574&doi=10.3923%2Fpjbs.2014.978.990&partnerID=40&md5=03e9e7b2fa85922a5c8d712775b520b8

36. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research*, 31(13), 3381-3385.
37. Song, X., Jensen, M. Ø., Jogini, V., Stein, R. A., Lee, C. H., Mchaourab, H. S., ... & Gouaux, E. (2018). Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. *Nature*, 556(7702), 515-519.
38. Srebro, D. P., Vučković, S., Milovanović, A., Vujović, K. S., Vučetić, Č., & Prostran, M. (2019). Preventive treatment with dizocilpine attenuates oedema in a carrageenan model of inflammation: the interaction of glutamatergic and nitrenergic signaling.
39. Szabo A, Ostlund NS. *Modern Quantum Chemistry*. First ed. Vol. 35, American Journal of Physics. Mineola, N.Y.: DOVER Publications; 1996. 1097 p.
40. Tripathi, A., & Bankaitis, V. A. (2017). Molecular docking: From lock and key to combination lock. *Journal of molecular medicine and clinical applications*, 2(1).
41. Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 473–485. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>
42. Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., ... & Richardson, D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science*, 27(1), 293-315.
43. World Obesity Federation. (2022). *World Obesity Atlas 2022*

16. Anexos

Figura 18.

“Resultados de la validación del receptor NMDA 2KS”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0	100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	25	0.89% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2707	96.33% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	24	0.74% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3002	93.00% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.11 ± 0.13	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.95	100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	6	0.20% Goal: 0
	Bad bonds:	9 / 26174	0.03% Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	160 / 35508	0.45% Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	Twisted Peptides:	4 / 3232	0.12% Goal: 0
	CaBLAM outliers	115	3.6% Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	43	1.34% Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

Figura 19.

“Resultados de la validación del receptor NMDA 2KA”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0	100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	22	0.78% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2704	96.23% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	23	0.71% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3024	93.68% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.06 ± 0.13	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.92	100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	14	0.46% Goal: 0
	Bad bonds:	5 / 26174	0.02% Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	199 / 35508	0.56% Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	Cis nonProlines:	1 / 3096	0.03% Goal: <0.05%
	CaBLAM outliers	129	4.0% Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	52	1.61% Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

Figura 20.

“Resultados de la validación del receptor NMDA 1K”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0	100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	22	0.78% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2695	95.91% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	20	0.62% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3000	92.94% Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.19 ± 0.13	Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.95	100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	10	0.33% Goal: 0
	Bad bonds:	2 / 26174	0.01% Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	163 / 35508	0.46% Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	Twisted Peptides:	3 / 3232	0.09% Goal: 0
	CaBLAM outliers	122	3.8% Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	44	1.37% Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972	
	Waters with clashes	0/0	0.00% See UnDowser table for details

Figura 21.

“Resultados de la validación del receptor NMDA E1”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0		100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	19	0.68%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2716	96.65%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	11	0.34%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3027	93.77%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.30 ± 0.13		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.91		100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	13	0.43%	Goal: 0
	Bad bonds:	8 / 26174	0.03%	Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	170 / 35508	0.48%	Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	1 / 3096	0.03%	Goal: <0.05%
Low-resolution Criteria	Twisted Peptides:	1 / 3232	0.03%	Goal: 0
	CaBLAM outliers	128	4.0%	Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	47	1.46%	Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972		
	Waters with clashes	0/0	0.00%	See UnDowser table for details

Figura 22.

“Resultados de la validación del receptor NMDA E2”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0		100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	20	0.71%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2706	96.30%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	19	0.59%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3014	93.37%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.34 ± 0.13		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.93		100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	14	0.46%	Goal: 0
	Bad bonds:	6 / 26174	0.02%	Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	181 / 35508	0.51%	Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	2 / 3232	0.06%	Goal: 0
Low-resolution Criteria	Twisted Peptides:	2 / 3232	0.06%	Goal: 0
	CaBLAM outliers	119	3.7%	Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	40	1.24%	Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972		
	Waters with clashes	0/0	0.00%	See UnDowser table for details

Figura 23.

“Resultados de la validación del receptor NMDA SO”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0		100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	16	0.57%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	2710	96.44%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	17	0.53%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	3028	93.80%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.10 ± 0.13		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	0.91		100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	17	0.56%	Goal: 0
	Bad bonds:	4 / 26174	0.02%	Goal: 0%
Peptide Omegas	Bad angles:	171 / 35508	0.48%	Goal: <0.1%
	Cis Prolines:	0 / 136	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	1 / 3096	0.03%	Goal: <0.05%
Low-resolution Criteria	Twisted Peptides:	1 / 3232	0.03%	Goal: 0
	CaBLAM outliers	124	3.9%	Goal: <1.0%
Additional validations	CA Geometry outliers	44	1.37%	Goal: <0.5%
	Chiral volume outliers	0/3972		
	Waters with clashes	0/0	0.00%	See UnDowser table for details

Figura 24.

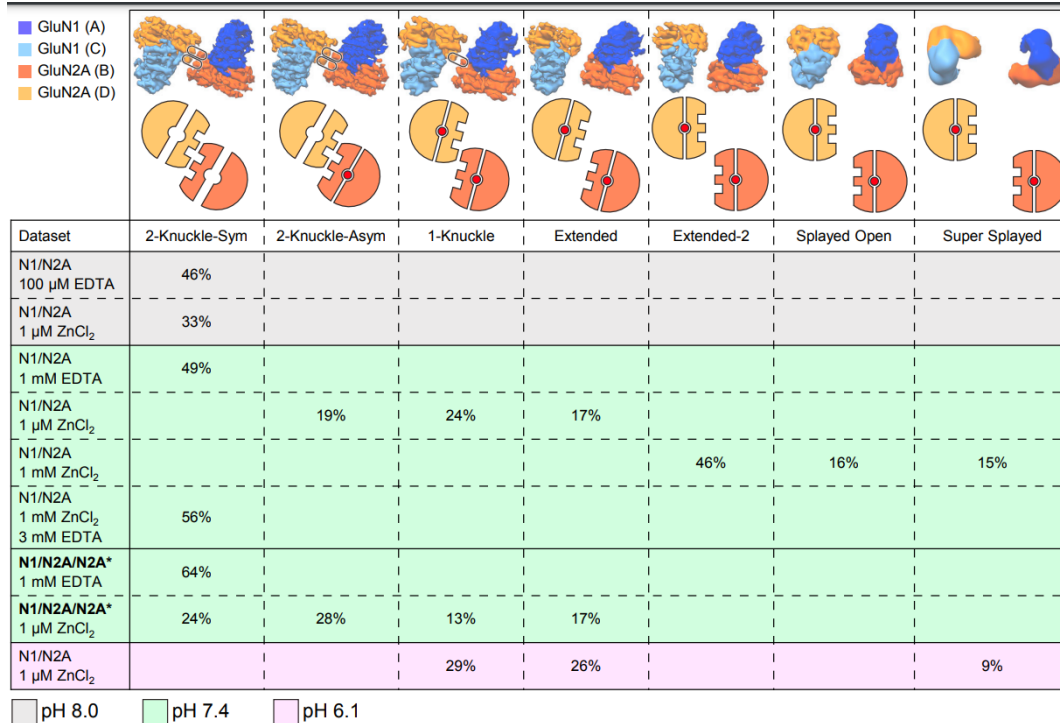
“Resultados de la validación del receptor NMDA SS”

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	0		100 th percentile* (N=1784, all resolutions)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	13	0.46%	Goal: <-0.3%
	Favored rotamers	2718	96.73%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	15	0.46%	Goal: <-0.05%
	Ramachandran favored	3020	93.56%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-2.22 ± 0.13		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score ^b	0.92		100 th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
	Cβ deviations >0.25Å	12	0.40%	Goal: 0
	Bad bonds:	3 / 26174	0.01%	Goal: 0%
Bad angles:	154 / 35508	0.43%	Goal: <-0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 136	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Cis nonProlines:	2 / 3096	0.06%	Goal: <-0.05%
	Twisted Peptides:	2 / 3232	0.06%	Goal: 0
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	133	4.1%	Goal: <-1.0%
	CA Geometry outliers	46	1.43%	Goal: <-0.5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/3972		
	Waters with clashes	0/0	0.00%	See UnDowser table for details

Se puede observar que la validación marcó que no hubo ningún choque o “Clash” entre los átomos, los choques harían inviable el uso de los receptores, debido a que en la naturaleza no se pueden dar colisiones entre átomos, es por esto que es importante realizar una validación al modelar una molécula, en especial si es grande. Se puede concluir que los resultados son favorables y por lo tanto las proteínas modeladas son aptas para su uso, pues ninguna obtuvo una puntuación menor a 0.91, por lo que el programa las marca en color verde en cada imagen.

Figura 25.

“Distribución de la población del receptor entre varias conformaciones”



Distribución de las distintas conformaciones del receptor NMDA variando la concentración de protones, la concentración de iones Zinc y la concentración de

EDTA agregado (para contrarrestar el efecto antagonista del Zinc). Figura recuperada de (Jalali-Yazdi et al., 2018).