



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado de Ciencias Químicas

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química-Instituto de Ciencias (ICUAP)

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE
INHIBIDORES DEL FACTOR INDUCIDO
POR LA HIPOXIA 1 (HIF-1) EN EL
PROCESO DE ANGIOGÉNESIS
TUMORAL**

T E S I S

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA DE FISICOQUÍMICA

P R E S E N T A

OSVALDO JIMENEZ MONTIEL

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Dra. Norma Angélica Caballero

PUEBLA, PUE.

MAYO 2024



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:


Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante, Dr. Thomas Scior, Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas y la Dra. Mari Toña Juárez Méndez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio computacional de inhibidores del Factor Inducido por la Hipoxia 1 (HIF-1) en el proceso de angiogénesis tumoral”**, que presenta el alumno **Oswaldo Jiménez Montiel** para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los trece días del mes de mayo del año dos mil veinticuatro.

ATENTAMENTE



Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante



Dr. Thomas Scior



Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas



Dra. Mari Toña Juárez Méndez

AGRADECIMIENTOS



Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México)** por la beca de Maestría No. 1173751.



A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP)**.



Al **Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP)** de la red CONACYT de laboratorios nacionales por los recursos computacionales y el soporte para la realización de la tesis.



Al **Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I, México)** por los recursos computacionales otorgados para la realización de la tesis.



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

prodep
TIPO SUPERIOR

Al **Cuerpo Académico BUAP-CA-263** “Investigación Experimental-Computacional de Nuevos Materiales y Sistemas Biomoleculares” (**SEP, PRODEP**).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco no solamente a quienes me ayudaron a realizar este trabajo, sino a quienes me ayudaron a quedarme en este mundo cuando estuve pasando por tan mal momento de mi vida, una enfermedad que se cruzó en mi proceso de maestría, que si bien finalicé, fue gracias a las siguientes personas; sin embargo, antes tengo que agradecer al pueblo trabajador de México que hacen posible la existencia de CONAHCYT, la ciencia de México se debe a ustedes. Ahora sí, directo al sentimentalismo, comienzo.

A mi amada esposa Itzel, que por tercera vez ha estado ahí conmigo y que puedo decir que me ha salvado por tercera ocasión, gracias, amor por existir, de verdad que no exagero.

A mis compañeros del extinto Movimiento Estudiantil Espartaco, Camilo, su fundador que me apoyó con cuestiones médicas en mis crisis de pánico y depresión, a Arelee que al primer llamado de auxilio acudió a mi casa a apoyarme ante mis crisis, a Jorge “Coquis” por las pláticas, las convivencias y el “rollo” cuando viví en el entonces “comuna”, al maestro Arturo “coyote” que me enseñó a tocar la jarana y hacer más pasadera mi enfermedad y a mis demás compañeros, Jon, Mara, Mari, Campeche, Paula y Maricruz.

A mis padres que a pesar de que ya estoy en el “tercer piso” siguen estando tan al pendiente de mí, como cuando tenía cinco años, debo decir que también les debo tanto. A mis hermanas que son las únicas que tienen mi humor y podemos decir tantas estupideces sin sentir pena alguna, fueron también muy buena terapia.

Y por último, pero no menos importantes, a la Dra. Norma Angélica y la Dra. Maru; gracias por el trato tan humano que me dieron, no olvido (y no olvidaré) el abrazo de la Dra. Norma y las palabras “te vas a curar”, además de dirigirme con tan buen psiquiatra, sin exagerar, me salvó la vida. De verdad que quedo muy en deuda con ustedes.

Los resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes congresos nacionales:

XXVII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas, “Estudio computacional de inhibidores del Factor Inducido por la Hipoxia-1 (HIF-1) en el proceso de angiogénesis tumoral”. Osvaldo Jimenez Montiel, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero. Puebla, Puebla, del 7 al 10 de noviembre de 2022, modalidad virtual.

II Coloquio de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, “Estudio computacional de la inhibición del Factor Inducido por la Hipoxia 1 (HIF-1) en el proceso de angiogénesis tumoral. Osvaldo Jimenez Montiel, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Norma A. Caballero, Puebla, Puebla, del 25 al 27 de enero de 2023, modalidad cartel.

XXI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, “Estudio computacional de la inhibición de la dimerización de HIF-1 en cáncer.” Osvaldo Jimenez Montiel, María Eugenia Castro, Francisco J. Meléndez, Norma A. Caballero, Pachuca, Hidalgo, del 9 al 11 de noviembre de 2023, modalidad cartel.

XXVIII Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas “Estudio computacional de inhibidores del Factor Inducido por la Hipoxia-1 (HIF-1) en el proceso de angiogénesis tumoral”. Osvaldo Jimenez Montiel, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero. Puebla, Puebla, del 13 al 16 de noviembre del 2023, modalidad exposición oral.

Artículo enviado para publicación:

Osvaldo Jimenez-Montiel, Norma A. Caballero, Francisco J. Melendez, María Eugenia Castro. Cáncer: Las células que no necesitan oxígeno para sobrevivir. Enviado: Agosto 2023. **Revista RD-ICUAP**. ISSN 2448-5829. <http://www.rdicuap.buap.mx/>

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. Cáncer	3
1.2. Función del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)	7
1.3. Secuencia de la vía de HIF-1	13
1.4. Inhibidores de HIF-1	14
1.5. Simulaciones computacionales	16
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
2.1. Planteamiento del problema	18
2.2. Hipótesis	20
2.3. Objetivos	20
2.3.1. Objetivo general	20
2.3.2. Objetivos específicos	20
CAPÍTULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21

3.1. Teoría del funcional de la densidad (DFT)	21
3.2. Conjunto de funciones base	22
3.3. Modelado de proteínas por homología	23
3.3.1. Alineamiento por pares de secuencias de proteínas	24
3.3.2. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas (ASMs)	25
3.4. Acoplamiento molecular	26
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA	30
4.1. Cálculo de la estructura molecular de los inhibidores de HIF-1	30
4.2. Modelado de HIF-1	30
4.2.1. Alineamiento de secuencias	30
4.2.2. Modelado por homología	31
4.3. Acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1	31
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Estructura molecular de los inhibidores de HIF-1	33
5.2. Modelado de HIF-1	41
5.2.1. Alineamiento de secuencias	41
5.2.2. Modelado por homología	47
5.3. Acoplamiento molecular	51

5.3.1. Acoplamiento molecular con los <i>templates</i> 4ZP4, 4ZPR y 6E3T, y el <i>template</i> mixto de HIF-1 α	51
5.3.2. Acoplamiento molecular con los <i>templates</i> 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y y 5V0L, y el <i>template</i> mixto de HIF-1 β	77
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios fisiológicos que caracterizan a las células cancerígenas [13].	4
Figura 2. Línea temporal del desarrollo de fármacos antitumorales a lo largo de la historia [17].	5
Figura 3. Gráfica de concentración vs respuesta del fármaco. La dosis terapéutica (A) se encuentra cerca de la dosis tóxica (B), por lo que es insegura como dosis terapéutica. Una dosis segura (C) se usa para la administración en pacientes, pero se observa como el daño es mayor en células sanas que en células tumorales [18].	6
Figura 4. Crecimiento de la masa tumoral en donde se observa a las células alejarse de los vasos sanguíneos, disminuyendo la presión y la concentración de oxígeno en las células más internas [30].	8
Figura 5. A) Vaso sanguíneo normal con recubrimiento de células endoteliales que forman la luz vascular de manera uniforme, lo que permite la correcta irrigación sanguínea. B) Vaso sanguíneo con células endoteliales con crecimiento descontrolado, generando proyecciones dentro y fuera del vaso con irrigación sanguínea deficiente [31].	9
Figura 6. Estructura 3D de HIF-2 α y HIF-2 β de <i>Mus musculus</i> . Se muestra el mismo código de color para los sitios de unión PAS-A (amarillo) y PAS-B (verde) necesarios para la dimerización de la subunidad α y β , tal como se presentan en la Tabla 1 . En rojo se muestra la región de unión a ADN, bHLH. En azul se muestra el dominio PAC, presente únicamente en la estructura de HIF-2 α .	11
Figura 7. Estructura de HIF-1 α en condiciones de A. normoxia y B. hipoxia celular. En A. HIF-1 α es hidroxilada por PHD, posteriormente es ubiquitinada por VHL y enviada al proteosoma donde se degrada. En B. HIF-1 α se dimeriza con HIF-1 β , posteriormente el complejo se une a CPB/p300 e interactúa con los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) [36].	12
Figura 8. Se esquematiza las etapas de la vía HIF-1 dentro de una célula representada por un óvalo en color gris [39].	14

Figura 9. Seis puntos definidos de la vía de HIF-1 en donde se han probado compuestos químicos específicos que lleva a su desregulación [44].	15
Figura 10. Estructuras 2D de los compuestos químicos obtenidos por <i>virtual screening</i> para la inhibición de la dimerización de HIF-2 [47].	17
Figura 11. Tasa de defunciones ocasionadas por tumores malignos (defunciones por cada 10 mil habitantes por año de registro) [50].	18
Figura 12. Diagrama general de la metodología para el acoplamiento molecular de los inhibidores con las proteínas HIF-1 α/β modeladas.	32
Figura 13. Estructuras optimizadas de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α/β en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p).	33
Figura 14. Comparación de las estructuras optimizadas de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α/β calculadas en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) (color azul) con las estructuras obtenidas en la base de datos PubChem [73-76] (color rojo).	40
Figura 15. Pasos para realizar el modelado de las estructuras HIF-1 α/β de humano.	41
Figura 16. Alineamiento por pares de la secuencia de aminoácidos de HIF-1 α de humano con la secuencia de aminoácidos de las estructuras de los <i>templates</i> 4ZP4, 4ZPR, 6E3T y el alineamiento múltiple. Se muestra el código de colores para representar a los aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas.	43
Figura 17. Alineamiento por pares de la secuencia de aminoácidos de HIF-1 β de humano con la secuencia de aminoácidos de las estructuras de los <i>templates</i> 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y,	45
Figura 18. Estructuras homólogas de HIF-1 α de humano modeladas a partir de los <i>templates</i> 4ZP4, 4ZPR, 6E3T y con modelado múltiple.	49
Figura 19. Estructuras homólogas de HIF-1 β de humano modeladas a partir de los <i>templates</i> 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y, 5V0L y con modelado múltiple.	50

Figura 20. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el <i>template</i> 4ZP4.	54
Figura 21. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el <i>template</i> 4ZPR.	60
Figura 22. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el <i>template</i> 6E3T.	66
Figura 23. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el <i>template</i> mixto.	72
Figura 24. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el <i>template</i> 4ZP4.	79
Figura 25. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el <i>template</i> 7V7L.	85
Figura 26. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el <i>template</i> 5Y7Y.	91
Figura 27. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el <i>template</i> 5V0L.	98
Figura 28. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el <i>template</i> mixto.	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dominios de las subunidades α y β de HIF-1 de humano.	10
Tabla 2. Parámetros optimizados seleccionados (distancias de enlace en Å y ángulos en grados) y energías absolutas (u.a.) de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α/β calculados en los niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p).	34
Tabla 3. Valores de RMSD (Å) de las estructuras de las moléculas inhibidoras calculadas y reportadas en las bases de datos.	40
Tabla 4. Parámetros de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las estructuras homólogas de HIF-1 α/β de humano obtenidas mediante la herramienta BLAST.	42
Tabla 5. Parámetros de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las estructuras homólogas de HIF-1 α/β de humano obtenidas mediante el programa JalView.	47
Tabla 6. Puntaje estadístico DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) de las estructuras de HIF-1 α/β de humano obtenidas mediante el programa Modeller.	48
Tabla 7. Dominios de las estructuras modeladas de la subunidad HIF-1 α .	51
Tabla 8. Dominios de las estructuras modeladas de la subunidad de HIF-1 β .	51
Tabla 9. Energías de interacción (kcal/mol) entre las moléculas inhibidoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 α de humano usando acoplamiento semiflexible y rígido.	76
Tabla 10. Energías de interacción (kcal/mol) entre las moléculas inhibidoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 β de humano usando acoplamiento semiflexible y rígido.	108
Tabla 11. Resumen del análisis de resultados de acoplamiento molecular de las moléculas de las moléculas inhibidoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 α/β de humano.	110

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Su agresividad característica se debe al crecimiento descontrolado de las células tumorales, lo que las lleva a una privación de oxígeno. Para el funcionamiento celular en los tejidos de organismos aerobios, es muy importante el oxígeno. La concentración normal de oxígeno en los tejidos es $\leq 2\%$, y cuando llega a valores $\leq 0.02\%$ se conoce como hipoxia celular. La respuesta de los organismos ante la hipoxia es la activación de la familia de transcripción conocida como factor inducido por la hipoxia (HIF, Hypoxia Induces Factor) que da una respuesta fisiológica para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno. La relación que tiene el cáncer con la hipoxia celular es el crecimiento descontrolado de las células, ya que provoca que los vasos sanguíneos queden alejados de las células más internas del tumor, aproximadamente a 100-150 μm , dejándolas desprovistas de perfusión sanguínea y sin oxígeno provocando una condición hipóxica. A lo largo de la historia, se han desarrollado diferentes terapias para poder tratar el cáncer como lo son la quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinámica, etc. Sin embargo, las células tumorales presentan resistencia a estas terapias como consecuencia de la distancia de las células hipóxicas respecto a los vasos sanguíneos, la continua proliferación celular y la baja concentración de oxígeno, pues tanto la quimioterapia, radioterapia y fototerapia son dependientes de las concentraciones de oxígeno en el medio celular para que puedan actuar de forma efectiva. Por lo tanto, el enfoque para tener una nueva terapia se centra en el factor HIF, la vía por la cual las células sobreviven ante bajas concentraciones de oxígeno. El inhibir esta vía resulta conveniente para eliminar células que sobreviven en condiciones hipóxicas y que en consecuencia resisten a las terapias mencionadas.

Por otra parte, existen compuestos que han probado su actividad en la inhibición de la vía de HIF en diferentes niveles. Este trabajo se enfoca en estudiar la actividad de compuestos que bloquean la formación del complejo proteico HIF-1. Se analiza mediante herramientas de la

química computacional, como cálculos basados en la teoría DFT y en acoplamiento molecular, la interacción ligante-proteína HIF-1 y el tipo de interacciones entre ellos.

INTRODUCCIÓN

El oxígeno es un elemento fundamental en el buen funcionamiento de los organismos. La privación de oxígeno en ellos puede tener consecuencias fatales como en la isquemia miocárdica, trombosis, anemia, cáncer, etc., enfermedades en las cuales los tejidos implicados se ven comprometidos por falta de irrigación sanguínea. Por ello, a lo largo de la historia evolutiva los organismos aerobios desarrollaron mecanismos que dan respuesta a las bajas concentraciones de oxígeno. Una de las vías más importantes es la vía del factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1, Hypoxia Induces Factor-1), que regula el metabolismo de los tejidos cuando hay bajas concentraciones de oxígeno, siendo éste un “*switch*” metabólico, que cambia el metabolismo aerobio a uno anaerobio en las células afectadas. Así, padecimientos donde los tejidos se ven comprometidos en suministro de oxígeno tienen una respuesta para superar esta condición, haciendo del factor HIF-1 un elemento importante para la supervivencia del tejido afectado [1-4].

El cáncer es un padecimiento donde el crecimiento descontrolado de las células es una de sus principales características, lo que provoca masas densas de células, dejando a las más internas desprovistas de irrigación sanguínea y por consecuencia con muy baja concentración de oxígeno. Por la agresividad característica del cáncer, su crecimiento descontrolado y gran proliferación, se han desarrollado distintas terapias para poder combatir este padecimiento, sin embargo; la resistencia del cáncer hacia los distintos tipos de terapia es una realidad en la actualidad. Los tratamientos de quimioterapia y de radioterapia están limitados por la baja oxigenación que tienen las células en los tumores sólidos humanos, incluso terapias más novedosas como la terapia fotodinámica también está condicionada por la baja concentración de oxígeno, ya que depende de él para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) y generar estrés mitocondrial, su lisis y la liberación de citocromos que llevan a la célula a un proceso apoptótico. Por ello, la proteína HIF-1 es un blanco terapéutico ante las células tumorales que presentan resistencia a los tratamientos anticancerígenos [5-7].

HIF-1 es un heterodímero formado por los monómeros HIF-1 α y HIF-1 β . La unidad α cuenta con dominios como C-TAD, ODD, PAS-A y PAS-B. Los dominios PAS-A y PAS-B son de crucial importancia, ya que en ellos se lleva a cabo el proceso de dimerización entre las dos

subunidades. El motivo estructural bHLH es la región en contacto con ADN para activar los genes objetivo del dímero. La unidad β se compone por los mismos dominios que la unidad α , a excepción del dominio ODD de degradación por hidroxilación y ubiquitinación.

La unidad α de HIF-1 se expresa de manera constitutiva, siendo regulada por la presencia de oxígeno que es la molécula que determina su destino. En la presencia de oxígeno, la unidad α es hidroxilada, ubiquitinada y posteriormente es llevada al proteosoma donde se degrada. Por otro lado, cuando las concentraciones de oxígeno se encuentran por debajo de lo normal, el proceso de degradación se evita y el dímero de HIF-1 se forma mediante la unión de los dominios PAS-A y PAS-B. Una vez formado complejo HIF-1, se une a las proteínas p300/CBP, entra al núcleo y el motivo bHLH activa los genes de elemento de respuesta a hipoxia (HRE, Hypoxia Response Element) del ADN, que regulan la expresión de los genes VEGF, GLUT1, EPO, etc. [8, 9].

El bloqueo de la vía de HIF-1 se puede abordar en diferentes etapas: 1) expresión de mRNA de HIF-1 α , 2) síntesis de proteínas de HIF-1 α , 3) estabilización de HIF-1 α , 4) dimerización de HIF-1 α/β , 5) formación de complejo de transcripción y 6) genes objetivo de HIF-1.

En este proyecto de tesis se estudia, mediante métodos computacionales, el bloqueo de la dimerización de HIF-1 α/β con diferentes moléculas reportadas como inhibidores de la vía de HIF-1. Se realizan cálculos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, Density Functional Theory) y acoplamiento molecular (molecular docking).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

El cáncer es la primera causa de muerte prematura. La incidencia de este tipo de desórdenes malignos aumenta con la edad [10]. El cáncer es un problema que involucra múltiples cambios fisiológicos que decantan en la formación de células cancerígenas llegando a la fase final del padecimiento que es la formación de neoplasia (tejido nuevo).

Otra característica de las células cancerígenas es la invasión de tejido sano circundante y en otras etapas de la enfermedad la invasión de tejido sano distante mediante procesos de angiogénesis en el tumor.

Los mecanismos por los que las células sanas se llegan a convertir en células malignas son aún desconocidos, sin embargo, se conocen agentes que pueden hacer que las células sanas se conviertan en células malignas, como la exposición a altas dosis de radiaciones ionizantes como rayos ultravioleta o rayos X, exposición a agentes químicos, infección por ciertos tipos de virus, como por ejemplo el virus del papiloma humano y el virus de hepatitis C; por otro lado, también se ha ligado el proceso de neoplasia por tejido inflamado durante tiempos prolongados [11, 12].

Hanahan y Weinberg [13] plantearon seis cambios fisiológicos que llevan a las células sanas a hacerse cancerígenas (**Figura 1**):

1. Autosuficiencia en señales de crecimiento
2. Insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento
3. Invasión a tejidos sanos y metástasis
4. Potencial replicativo ilimitado
5. Angiogénesis sostenida
6. Resistencia a apoptosis

Estas características aparecen en los distintos tipos de cáncer, fenotipos que si bien caracterizan a las células cancerígenas, también son elementos que dificultan las terapias anticancerígenas.

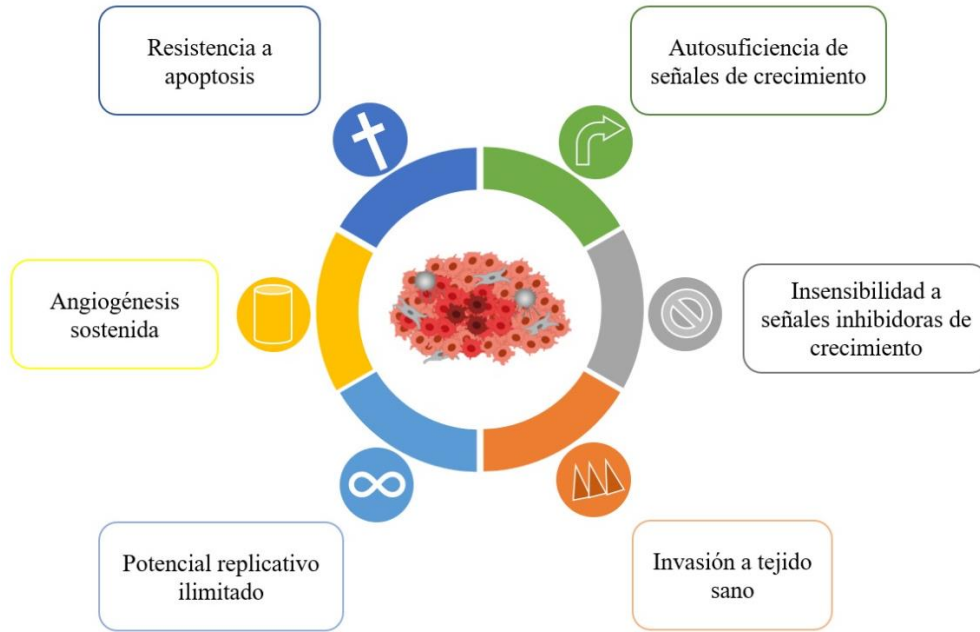


Figura 1. Cambios fisiológicos que caracterizan a las células cancerígenas [13].

El oxígeno es una molécula muy importante para el correcto funcionamiento de los organismos aerobios. Es el responsable de ser la molécula aceptora de electrones en el proceso de respiración celular y es importante para mantener la homeostasis de los organismos.

En los tejidos humanos la concentración normal de oxígeno corresponde a $\leq 2\%$ de oxígeno, mientras que en condición de anoxia o hipoxia la concentración de oxígeno es $\leq 0.02\%$. [14, 15]. La condición de hipoxia está ligada a distintos padecimientos. La alternativa que tienen los organismos cuando la concentración de oxígeno es $\leq 2\%$ es la activación de la familia de transcripción del factor inducido por la hipoxia (HIF, Hypoxia Induces Factor), que tiene el papel de dar respuesta a la condición de hipoxia celular mediante la activación de distintos genes [16].

La historia sobre el tratamiento contra el cáncer ha existido desde el comienzo del siglo XX (**Figura 2**), teniendo mayor avance a mediados de la Segunda Guerra Mundial y en el año de 1955 se fundó el Centro de Servicios Nacionales de Quimioterapia contra el Cáncer (CCNSC, Cancer Chemotherapy National Service Center) en los Estados Unidos de América.

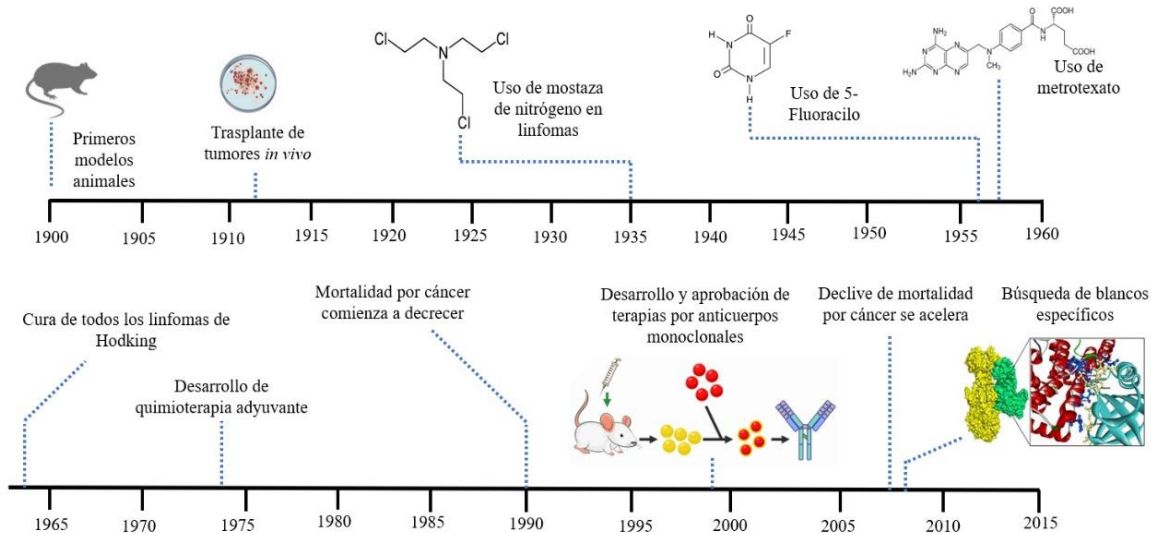


Figura 2. Línea temporal del desarrollo de fármacos antitumorales a lo largo de la historia [17].

El esfuerzo de la lucha contra el cáncer ha generado el desarrollo de fármacos para distintos tipos de cáncer, desde cáncer no sólido, como los linfomas y las leucemias, hasta tumores sólidos, donde las complicaciones son la expansión de las células malignas a otros tejidos o metástasis, y cuya única manera de hacerles frente es la administración de terapia citotóxica. Por otro lado, mientras que el tumor se encuentre localizado lo más adecuado es la cirugía y el tratamiento con radioterapia.

Las limitantes que llega a tener la quimioterapia son diversas, como el daño colateral a células sanas debido a que los tratamientos no son selectivos a células cancerígenas (**Figura 3**). La concentración de citotóxicos durante las quimioterapias en células cancerígenas es menor que en las células sanas. Además, tiene la limitación de llegar a las células cancerígenas que se encuentran en condiciones de hipoxia.

Por otro lado, los efectos secundarios que deja el tratamiento de quimioterapia también son un problema, como infertilidad por el daño a las células de las gónadas, daños al corazón y desarrollo de cardiopatías, en este caso por el uso de doxorubicina.

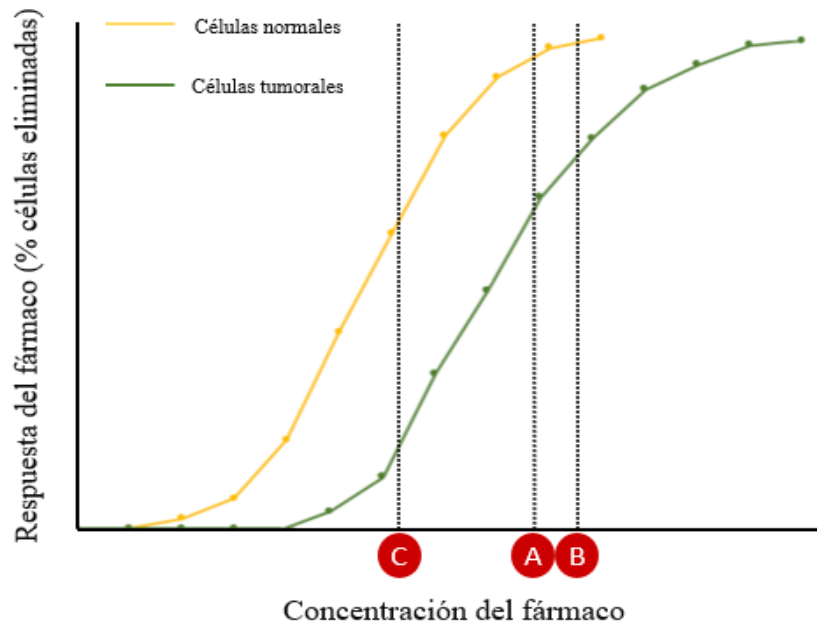


Figura 3. Gráfica de concentración vs respuesta del fármaco, en donde se representa con un círculo rojo tres diferentes dosis. La dosis (A) se encuentra cerca de la dosis tóxica (B), por lo que es insegura como dosis terapéutica. La dosis (C) es segura y se usa para la administración en pacientes, pero se observa como el daño es mayor en células sanas que en células tumorales [18].

Las cinco características fundamentales por lo que las células son resistentes a la quimioterapia son las siguientes [19-21]:

1. Las células hipóxicas están distantes de los vasos sanguíneos y el fármaco llega a las células más internas del tumor de forma limitada.
2. La proliferación celular decrece como una función de la distancia de los vasos sanguíneos como consecuencia de la hipoxia.
3. La condición de hipoxia se desarrolla de mejor manera en células que han perdido la sensibilidad a p53, el cual media el proceso de apoptosis y se pierde la sensibilidad de las células hacia agentes anticancerígenos.
4. La acción que tienen los fármacos anticancerígenos (por ejemplo, la bleomicina, un tipo de antibiótico que se utiliza en el tratamiento de quimioterapia contra cáncer) depende

de la concentración de oxígeno al igual que la radioterapia, genera citotoxicidad y daña el ADN.

5. La hipoxia en las células tumorales sobre expresa genes involucrados en resistencia a los fármacos anticancerígenos, incluyendo genes que codifican p-glicoproteínas.

En cuanto a la radioterapia tiene dos inconvenientes, el primero reside en la dosis de radiación que puede soportar el paciente, ya que esta varía de un paciente a otro y se define por el genotipo de cada individuo. Esto resulta contraproducente ya que la eficacia reside en el total de radiación que recibe el tejido tumoral [22]. El segundo inconveniente, al igual que en la quimioterapia, la radioterapia está limitada por la ausencia de oxígeno en el tejido tumoral.

En los inicios de la década de 1950, ya se había dilucidado la importancia de la concentración de oxígeno en células normales y células tumorales para que la acción de la radiación de rayos X y rayos gamma tuviera efecto [23]. Por un lado, la baja concentración de oxígeno limitaba la efectividad de la radiación, mientras que con una concentración normal de oxígeno la radiación generaba más daño a ambos tejidos, al normal y al tumoral. Este daño se efectúa sobre el ADN por la incorporación de radicales libres, que resultan de los efectos directos e indirectos de la radiación ionizante.

La radioterapia se ve limitada en condiciones de hipoxia y anoxia [23], debido a que la distancia que hay entre las vascularizaciones y las células tumorales se hace cada vez mayor. El tumor tiende a crecer sin control, pasando de una tensión de oxígeno de 40 mmHg (correspondiente al equilibrio dentro de las venas) a casi 0.0 mmHg en un radio de 150 μm .

1.2. Función del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)

La generación de energía en las células es mediada por la concentración de oxígeno, por lo que una de las funciones del factor HIF es activar los genes relacionados a glicólisis, ya que, al no haber oxígeno, hay un cambio metabólico de respiración aerobia a anaerobia [24].

El papel que juega la familia del factor HIF en diferentes casos patológicos es primordial, como en la anemia renal [25], en procesos de angiogénesis y migración celular, en procesos de cicatrización, en úlceras gástricas [26], en la isquemia miocárdica, en la regeneración de tejido muerto [27], en hipertensión arterial pulmonar [28], entre otros.

Una de las principales características del cáncer es que las células cancerígenas son insensibles a las señales de inhibición de crecimiento celular, por lo que los tumores crecen sin control alguno [13]. Por esta razón las células cancerígenas son resistentes a las terapias existentes, ya que la distancia entre las células cancerígenas y los vasos sanguíneos es cada vez mayor, dejando a las células que se localizan después de los 70-100 μm desprovistas de perfusión sanguínea, y por ende dejándolas en condición de hipoxia y con resistencia a la quimioterapia [29] (**Figura 4**).

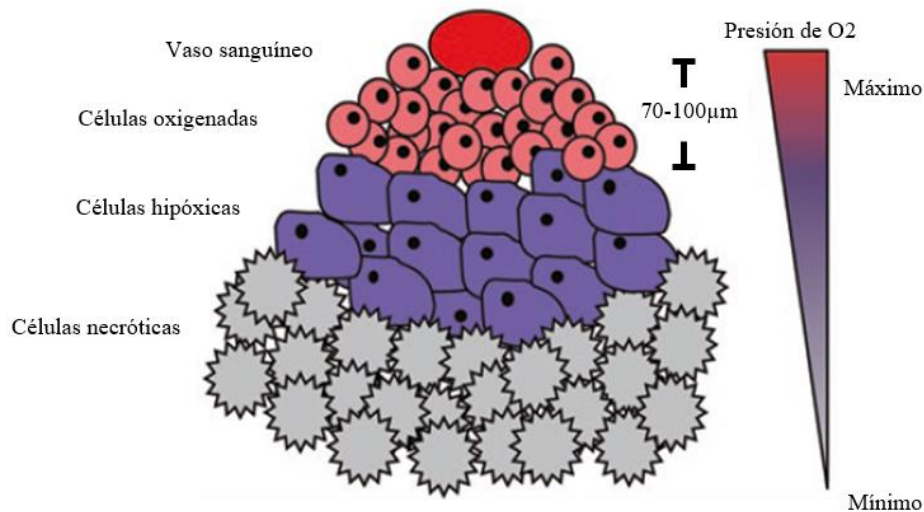


Figura 4. Crecimiento de la masa tumoral en donde se observa a las células alejarse de los vasos sanguíneos, disminuyendo la presión y la concentración de oxígeno en las células más internas [30].

La modificación en el epitelio de las nuevas vascularizaciones formadas a partir de la activación de genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) llamadas células endoteliales tumorales (TECs, Tumoral Endothelial Cells) limita la proporción de sangre a la masa tumoral (**Figura 5**). El tejido endotelial en las células de tejido sano es una capa laminar que hace que el flujo sanguíneo sea uniforme, mientras que el tejido endotelial de los capilares tumorales tiene una forma y un tamaño irregular con proyecciones citoplasmáticas cruzando y saliendo del lumen, limitando la irrigación sanguínea efectiva [31].

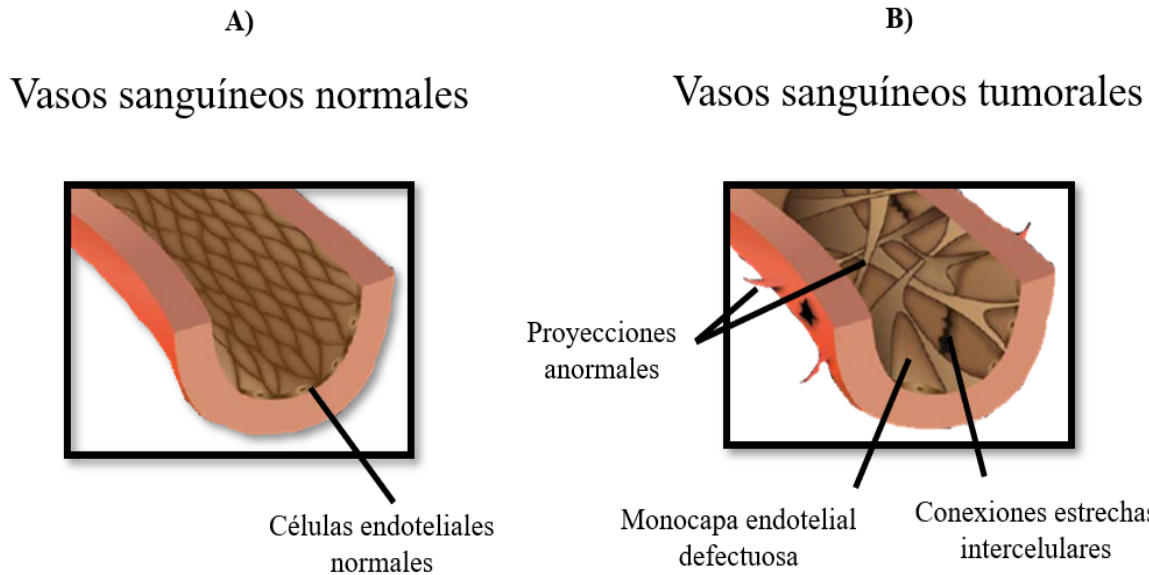


Figura 5. A) Vaso sanguíneo normal con recubrimiento de células endoteliales que forman la luz vascular de manera uniforme, lo que permite la correcta irrigación sanguínea. B) Vaso sanguíneo con células endoteliales con crecimiento descontrolado, generando proyecciones dentro y fuera del vaso con irrigación sanguínea deficiente [31].

Las células cancerígenas pueden presentar condición de hipoxia aguda o crónica. La hipoxia aguda es causada por una transición intermitente facilitada por el suplemento sanguíneo por parte de las células tumorales, mientras que la hipoxia crónica tiene la característica de tener ausencia de oxígeno por la estructura morfológica deficiente de las vascularizaciones tumorales. En células cancerígenas, la hipoxia aguda o intermitente es más agresiva que la hipoxia crónica o mantenida [32].

Las células tumorales sobreviven a las bajas concentraciones de oxígeno gracias a la familia de transcripción HIF-1, HIF-2 y HIF-3. El tumor tiene la capacidad para formar nuevas vascularizaciones para suplir la baja concentración de oxígeno y nutrientes que las células necesitan.

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico que se encuentra conformado por dos subunidades, α y β . La subunidad α es una estructura oxígeno dependiente, que al expresarse

en células con concentraciones normales de oxígeno se degrada en el proteosoma. La subunidad β se expresa de forma mantenida en las células del organismo.

Las dos subunidades α y β deben dimerizarse para formar el complejo activo HIF-1. La subunidad α está compuesta por una cadena de 826 aminoácidos, mientras que la subunidad β cuenta con 778 aminoácidos en su cadena, que incluyen todos los dominios en ambas cadenas. Los dominios de las subunidades α y β de interés se muestran en la **Tabla 1**. Tanto la estructura α como β tienen el dominio bHLH, que es el dominio de unión a ADN que activa los genes de elemento de respuesta a hipoxia (HRE, Hypoxia Response Element). Por otra parte, comparten los dominios Per-ARNT-Sim (PAS), PAS-A y PAS-B, que son los dominios donde se lleva a cabo la dimerización de ambas subunidades para formar el complejo HIF-1. El dominio PAC (PAS-associated COOH-terminal) es una extensión del dominio PAS-B en ambos monómeros, sin embargo, en el monómero β la estructura cristalizada es más corta respecto a la de α , por lo que el dominio PAC no aparece en su estructura. A partir de las estructuras de *Mus Musculus* HIF-2 α y HIF-2 β (**Figura 6**), se modelan las estructuras homólogas de HIF-1 α y HIF-1 β .

Tabla 1. Dominios constitucionales de las subunidades α y β de HIF-1 de humano.

	HIF-1 α	HIF-1 β
Dominio bHLH	17 - 70	89 - 142
Dominio PAS-A	85 - 158 170 - 191	161 - 235 —
Zona inactiva	159 - 169	—
Dominio PAS-B	228 - 298	349 - 419
Dominio PAC	302 - 345	—

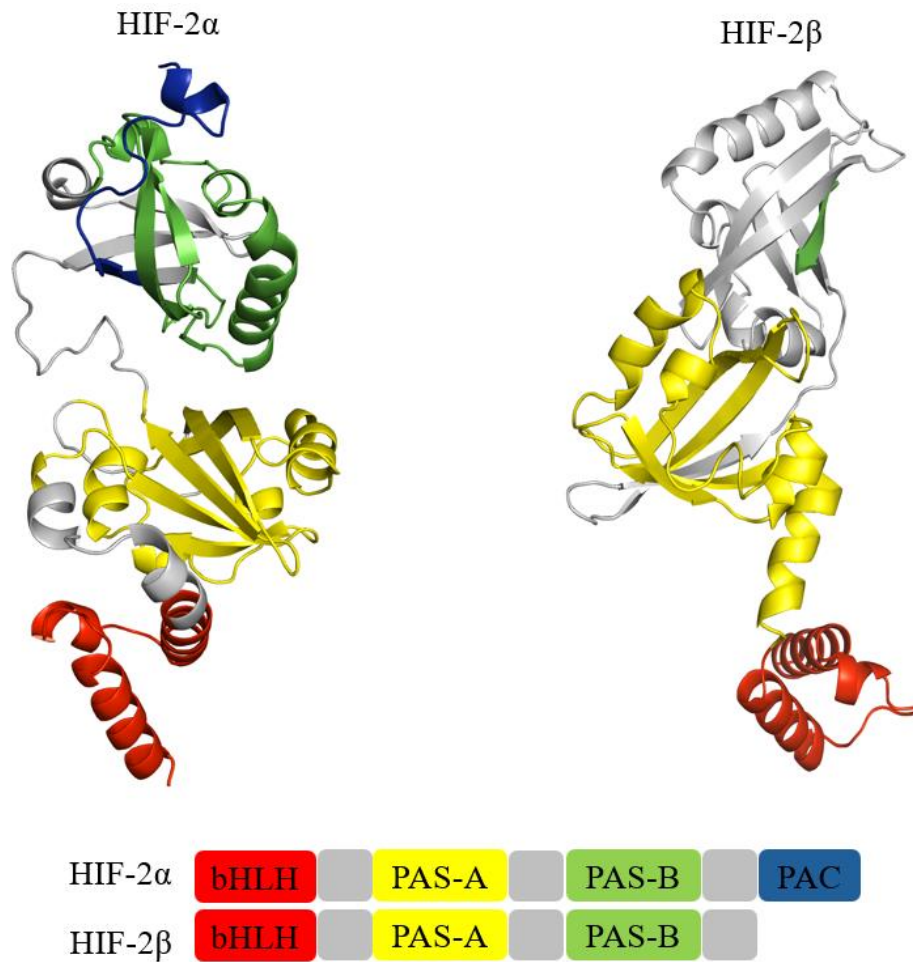


Figura 6. Estructura 3D de HIF-2 α y HIF-2 β de *Mus musculus*. Se muestra el mismo código de color para los sitios de unión PAS-A (amarillo) y PAS-B (verde) necesarios para la dimerización de la subunidad α y β , tal como se presentan en la **Tabla 1**. En rojo se muestra la región de unión a ADN, bHLH. En azul se muestra el dominio PAC, presente únicamente en la estructura de HIF-2 α .

Además, se han reportado evidencias de que existen otros dominios importantes en la actividad de HIF. La subunidad α contiene los dominios de degradación dependientes de oxígeno (ODD, Oxygen Dependent Degradation), donde bajo condiciones normales de oxígeno la subunidad α es hidroxilada, llevando al proceso de marcaje de ubiquitinación, en el cual puede ser identificada para dirigirla al proteosoma y sea degradada.

Por otro lado, ante la ausencia de oxígeno en el ambiente celular, la hidroxilación de la proteína no se lleva a cabo y se forma el complejo HIF-1. Éste debe ser transactivado en el

dominio de transactivación carboxi (C-TAD, Carboxy TransActivation Domain) de la estructura α , por la proteína CBP (Creb Binding Protein) y p300 para activar los genes objetivo para la supervivencia celular en hipoxia en el elemento de respuesta a hipoxia (HRE, Hipoxia Response Element) (**Figura 7**). Por el contrario, en la subunidad β el dominio C-TAD no tiene reportada alguna actividad [33-35].

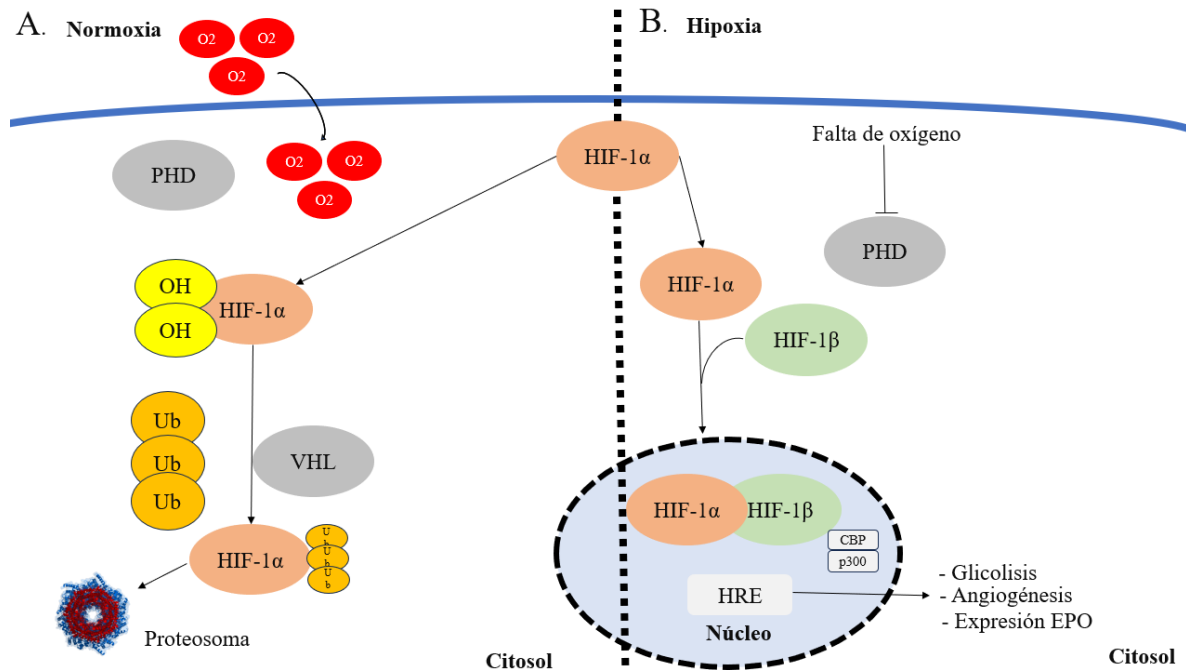


Figura 7. Estructura de HIF-1 α en condiciones de A. normoxia y B. hipoxia celular. En A. HIF-1 α es hidroxilada por PHD, posteriormente es ubiquitinada por VHL y enviada al proteosoma donde se degrada. En B. HIF-1 α se dimeriza con HIF-1 β , posteriormente el complejo se une a CPB/p300 e interactúa con los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) [36].

HIF-1 en cáncer tiene actividad en ambos tipos de tumores (sólidos y líquidos), además regula varias actividades metabólicas para el mantenimiento, la tumorigenicidad, la invasión a tejido nuevo, el arresto de procesos apoptóticos, etc. [37].

La sobreexpresión de HIF-1 α por sí mismo (sin la formación del dímero HIF-1 con HIF-1 β o ARNT) es de suma importancia en procesos tumorales. Es la unidad responsable de procesos de angiogénesis, proceso de rebote en el que se desarrollan y crecen nuevos vasos sanguíneos, así como la división y expansión de los que ya existen.

La actividad que tiene HIF-1 en el cambio metabólico es diferente en células cancerígenas. En células normales se lleva a cabo la formación de glucosa en energía mediante un proceso dependiente de oxígeno, mientras que, en las células cancerígenas, por la ausencia de oxígeno este proceso debe ser cambiado a procesos glucolíticos alternos [38].

1.3. Secuencia de la vía de HIF-1

La vía de HIF-1 consta de varios pasos para que pueda ser una proteína completamente activa. Los compuestos químicos que se proponen para inhibir la actividad de HIF-1 van dirigidos a etapas específicas de la vía (**Figura 8**). En concreto, las etapas de la vía de HIF-1 se pueden enlistar de la siguiente manera [39]:

1. Expresión de ARNm de HIF-1 α
2. Traducción y síntesis de HIF-1 α
3. Estabilización de HIF-1 α
4. Dimerización de HIF-1 α/β
5. Formación del complejo HIF-cbp/p300/y unión con ADN (actividad transcripcional)

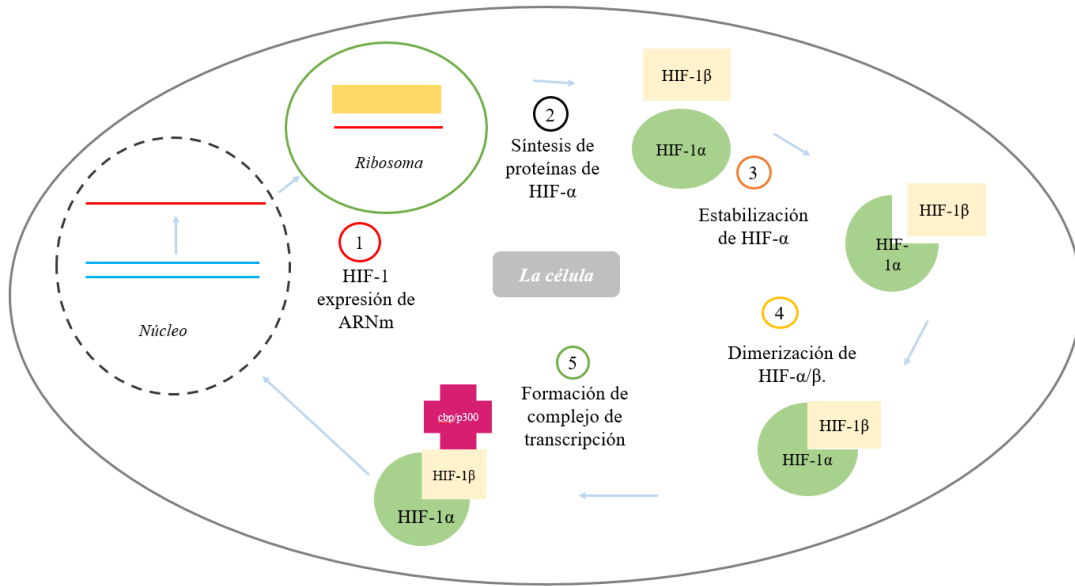


Figura 8. Se esquematiza las etapas de la vía HIF-1 dentro de una célula representada por un óvalo en color gris [39].

1.4. Inhibidores de HIF-1

HIF-1 al ser un factor de transcripción de naturaleza proteica puede ser inhibido desde la expresión de ARNm, tanto del elemento α como del elemento β , es decir, el bloqueo de los genes objetivo del complejo HIF-1 α/β . De esta forma al bloquearse HIF-1 no puede transactivar los genes necesarios para el correcto funcionamiento, proliferación e invasión del tejido sano por tejido cancerígeno [40].

Se han reportado diferentes compuestos orientados a la inhibición de la vía de HIF-1, como son EZN-2208, 2-metoxiestradiol, PX-478, digoxina, BAY 87-2243, PT2385 y PT2399 [41], que actúan en distintos niveles de la vía. EZN-2208 actúa inhibiendo la síntesis de ARNm de HIF-1 α ; el 2-metoxiestradiol, PX-478 y análogos de camptotecina (por ejemplo topotecan) inhiben la síntesis de proteínas tanto de HIF-1 α y HIF-2 α . PT2385 y PT2399 inhiben la dimerización de las estructuras α y β del complejo HIF; y de forma análoga, la acriflavina inhibe la dimerización de las estructuras α/β de HIF-1 y HIF-2, mediante la unión en el dominio PAS-B de la estructura α , imposibilitando que se formen los complejos HIF-1/2 [41, 42].

Adicionalmente a estos compuestos, se ha estudiado el uso de factores de transcripción para bloquear la actividad de HIF-1 CITED4. Este factor se une a p300 y competir con HIF-1 α por HIF-1 β , de tal manera que se quede incompleta la estructura y no realice su actividad de forma normal dentro de la masa tumoral [43].

No necesariamente los compuestos propuestos actúan sobre la vía de HIF-1. BBAY 87-2243 evita la acumulación de la proteína para que no transactive los genes objetivo. Existe una variedad bastante amplia de compuestos que han sido probados de forma experimental y en diferentes etapas de la vía, desde la inhibición de la expresión del mRNA de HIF- α hasta el bloqueo de los genes que transactivan el complejo HIF, con los elementos α y β con las proteínas CBP/p300 (**Figura 9**).

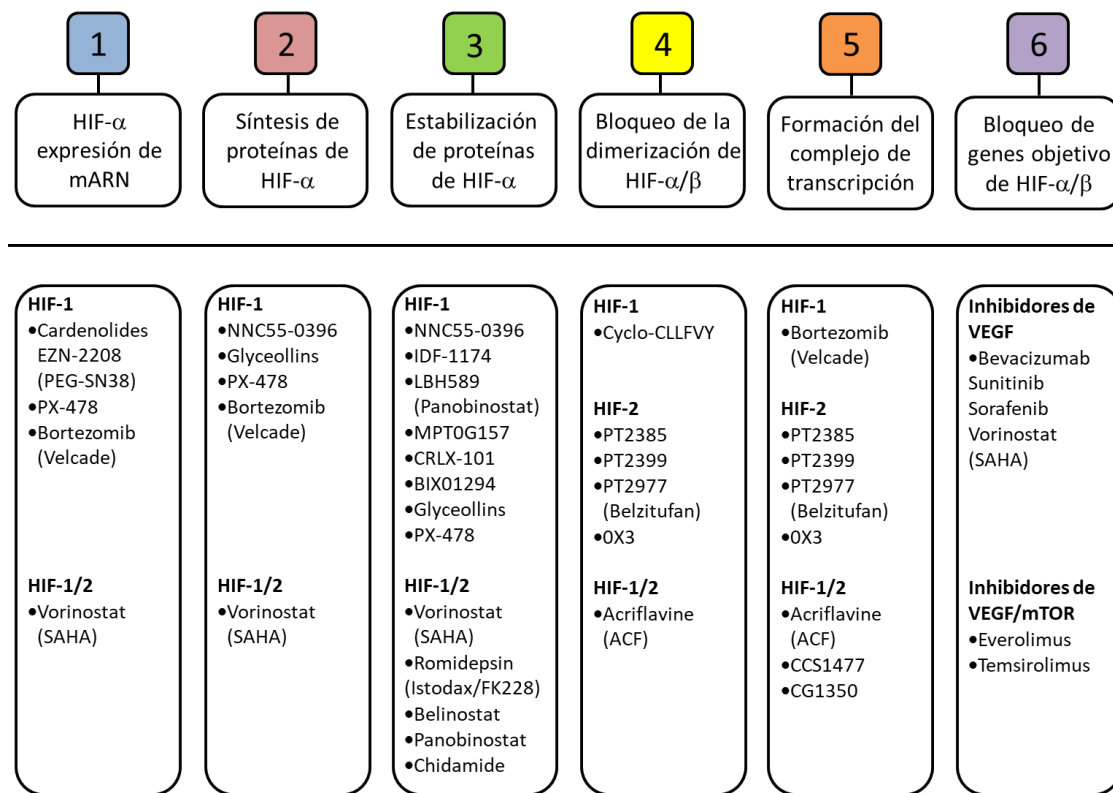


Figura 9. Seis puntos definidos de la vía de HIF-1 en donde se han probado compuestos químicos específicos que lleva a su desregulación [44].

1.5. Simulaciones computacionales

Las técnicas *in silico* tienen gran importancia en dilucidar la actividad de distintos compuestos en la inhibición de la actividad de HIF. Se han reportado estudios donde mediante técnicas de búsqueda virtual (*virtual screening*), usando moléculas similares a chalconas, y mediante la técnica de acoplamiento molecular, estudiaron la inhibición del dominio de unión a ADN (bHLH), proponiendo que dos hélices α están en contacto para comenzar la transcripción de los genes objetivos de HIF-1 [45]. Además, ya que la estructura de HIF-1 humana no se encuentra resuelta por técnicas de RMN o rayos X, modelaron la estructura por técnicas de modelado por homología del dominio bHLH. Los autores obtuvieron energías de afinidad de -11.9 kcal/mol como la energía más baja y de -6.6 kcal/mol como la energía más alta [45].

Por otro lado, también se han analizado los efectos del inhibidor OX3 en la disrupción de HIF-2. En este trabajo se mostró que el compuesto OX3, no sólo tiene actividad inhibitoria en la dimerización del complejo de HIF-2 α/β , sino que desestabiliza al complejo una vez que ha sido formado, esto debido a efectos alostéricos que perturban los dominios de dimerización de HIF-2 α/β , haciendo que el complejo de HIF-2 no pueda llevar a cabo su papel funcional dentro de la célula hipóxica [46].

Otro trabajo realizado con técnicas *in silico* orientado a la inhibición de la estructura de HIF-2 de humano, propuso compuestos novedosos (**Figura 10**) obtenidos por técnicas de *virtual screening* para la inhibición de la dimerización de HIF-2 de humano [47]. Estos compuestos se dirigieron al dominio de dimerización de PAS-B de las subunidades α y β , y se mostró que se unen en la cavidad de PAS-B por contribuciones electrostáticas e interacciones de tipo de puente de hidrógeno con los aminoácidos His293, Tyr 281, Ser246, Tyr 307 y Asn341 [47].

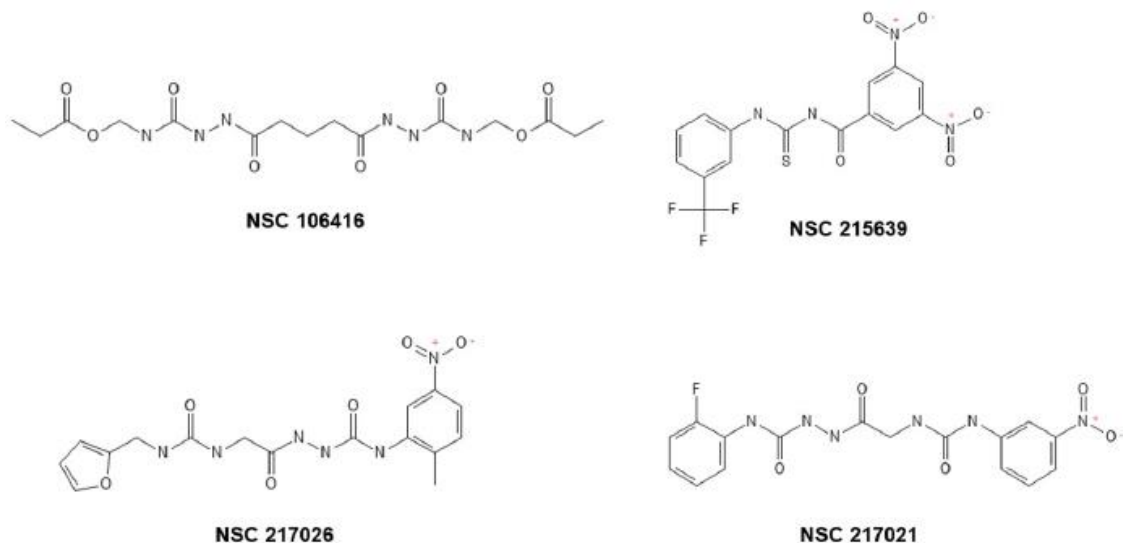


Figura 10. Estructuras 2D de los compuestos químicos obtenidos por virtual screening para la inhibición de la dimerización de HIF-2 [47].

Además de analizar el papel inhibitorio que tienen PT2399 y 0X3 en la dimerización del complejo HIF-2, se han estudiado como elementos que perturban la estructura del complejo HIF-2 de modelos humanos (*Homo sapiens*) y de ratón (*Mus musculus*). Los autores indicaron que obtuvieron buenos resultados gracias a los cambios conformacionales de los residuos de HIF-2 α , modificando las interacciones de puente de hidrógeno en el complejo α/β , reduciendo así la estabilidad de los heterodímeros. Tanto PT2399 como 0X3 interactuaron con los aminoácidos His248, Phe254, Met252, Tyr278, Tyr281 y His293, siendo PT2399 el compuesto que tuvo la mayor fuerza inhibitoria [48].

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del problema

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial. En 2016, el cáncer se encontraba posicionado en el segundo lugar dentro de las 20 principales causas de muerte en el mundo con 244.6 millones de personas que padecen algún tipo de cáncer, de los cuales 137.4 millones eran hombres y 107.1 millones mujeres. Además, el continente americano es el segundo lugar de mortalidad con 1.348 millones de muertes, siendo estos índices epidemiológicos y de mortalidad muy alarmantes. En el año 2000 las muertes por cáncer fueron de 7.010 millones y, en promedio, es la causa de 8.966 millones de muertes al año a nivel mundial. [49]

En México, de acuerdo con las cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2021 de 1, 222, 249 de defunciones en el país, el 8% (90,123) se debió a tumores malignos. La tasa de defunciones por esta causa aumentó de 6.09 defunciones por cada 10 mil personas en 2010 a 7.06 en 2021 (**Figura 11**).

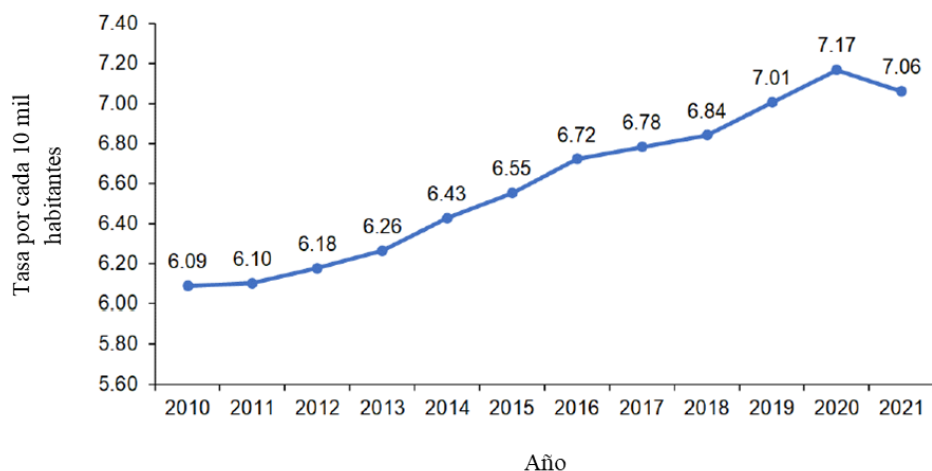


Figura 11. Tasa de defunciones ocasionadas por tumores malignos (defunciones por cada 10 mil habitantes por año de registro) [50].

El cáncer es un padecimiento bastante antiguo, se tienen muestras de huesos cancerígenos de momificaciones egipcias y antiguos manuscritos de 1600 A.C. con registros de casos. Hipócrates describió el cáncer como una falla en los “humores” del cuerpo humano [51].

A través del tiempo se han desarrollado terapias para poder tener un tratamiento que detenga la proliferación de las células cancerígenas y las elimine. Dentro de ellas está la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, fototerapia, etc., las cuales dependen de la concentración de oxígeno para ser eficientes [52, 53].

En las células de tumores sólidos la concentración de oxígeno se ve comprometida, lo que se conoce como hipoxia celular. Esta discapacidad en la difusión de oxígeno se debe a las anormalidades en las vascularizaciones dentro del tumor y a lo alejadas que se encuentran las células más internas respecto a los vasos sanguíneos. Esta condición de hipoxia influye de forma negativa en tumores tratados con radioterapia, quimioterapia y fototerapia, además de que en condiciones de hipoxia las células tumorales potencian su capacidad de metástasis.

Los elementos responsables de mantener a las células cancerígenas vivas, aún ante la falta de oxígeno, son los elementos de transcripción de la familia del factor inducido por la hipoxia (HIF, Hypoxia Induces Factor). Se han identificado tres elementos de esta familia, HIF-1, HIF-2 y HIF-3, que modulan la respuesta ante la falta de oxígeno, no solo en células tumorales sino en cualquier tejido que se vea comprometido por la falta de oxígeno. Las isoformas de HIF tienen distintas actividades en condiciones de hipoxia. Por ejemplo, HIF-3 por similitudes en su estructura, compite e inhibe la actividad de HIF-1 [54]. Por otro lado, de forma contraria a HIF-1, la actividad de HIF-2 no está presente en todas las células y su actividad se presenta en hipoxia aguda y crónica [55, 56]. Por ello inhibir la vía de HIF-1 se ha vuelto un blanco terapéutico para complementar las terapias ya existentes, por lo que se han desarrollado y probado de forma experimental distintos compuestos para bloquear la actividad de HIF-1.

La mayoría de los compuestos se han probado de forma experimental, pero no se conoce a nivel molecular de qué forma interactúan estos compuestos con el complejo HIF-1, qué tipo de enlaces forman, con qué dominios de la proteína y con qué residuos aminoacídicos interactúan. Al ser de gran importancia conocer qué interacciones existen en el complejo ligante-proteína para proponer compuestos que bloqueen la vía de HIF-1, en este trabajo se plantea modelar la interacción entre HIF-1 y diferentes inhibidores de su dimerización.

2.2. Hipótesis

Utilizando métodos de la química computacional es posible modelar la inhibición de los complejos de transcripción dependientes de hipoxia (HIF-1/2) por compuestos probados experimentalmente con dicha actividad. Se espera que al realizar los cálculos de acoplamiento molecular con estas moléculas se obtengan parámetros relevantes como energías de afinidad y tipo de interacciones específicas que permitan proponer compuestos extraídos de la naturaleza y sus derivados como potenciales fármacos en el proceso de angiogénesis tumoral.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Modelar el bloqueo de la dimerización del factor HIF-1 α / β en el proceso de angiogénesis tumoral usando métodos de la química computacional.

2.3.2. Objetivo específicos

1. Obtener las estructuras más estables de diferentes inhibidores del factor HIF-1 α / β usando cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad DFT.
2. Obtener las estructuras del factor HIF-1 α / β de humano mediante modelado por homología de proteínas.
3. Realizar cálculos de acoplamiento molecular de los inhibidores con las proteínas HIF-1 α / β modeladas.

CAPÍTULO III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

La teoría del funcional de la densidad (DFT, Density Functional Theory) está basada en los teoremas de Hohenberg-Kohn y las ecuaciones de Kohn-Sham.

Los teoremas de Hohenberg-Kohn [57, 58] establecen que el estado fundamental, denominado E_0 , se determina por la densidad electrónica, conocida como ρ_0 , como en la ecuación:

$$E_0 = E_0[\rho_0] \quad (1)$$

El segundo teorema establece que la verdadera densidad electrónica en el estado fundamental (ρ_0) minimiza el funcional de energía $E_0[\rho']$ igual que la verdadera función de onda normalizada del estado fundamental minimiza la integral variacional, de acuerdo con la ecuación:

$$E_0[\rho'] \geq E_0[\rho_0] \text{ si } \rho' \neq \rho_0 \quad (2)$$

La teoría DFT puede calcular la función de onda y todas las propiedades electrónicas a partir de la densidad electrónica del estado fundamental ρ_0 , la cual es una función de tres variables independientemente del número de electrones [59]. La energía total que depende de ρ_0 se expresa como:

$$E_0[\rho_0] = E_{en}[\rho_0] + V_{nn} + J[\rho_0] + T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0] \quad (3)$$

Los términos de los funcionales de energía cinética y de intercambio-correlación ($T[\rho_0] + E_{xc}[\rho_0]$) no tienen forma conocida y se evalúan de acuerdo con distintos modelos. En general, se considera al término de intercambio-correlación como suma de un término de intercambio y otro de correlación de la forma:

$$E_{xc}[\rho_0] = E_x[\rho_0] + E_c[\rho_0] \quad (4)$$

Los métodos DFT se clasifican de acuerdo al método utilizado para calcular el término de intercambio-correlación. Los métodos híbridos son muy utilizados en la actualidad. En ellos se considera que se obtiene un valor exacto del término de intercambio mediante el método HF y se aproxima el valor de la correlación con una expresión adecuada. Uno de los

funcionales híbridos más utilizados por su relación eficiencia-costo computacional es el funcional B3LYP, el cual se basa en el funcional de intercambio de 3 parámetros funcionales de Becke que forman la parte de B3, y el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr, LYP [59]. El funcional B3LYP es una buena alternativa para estudiar sistemas con un número elevado de electrones a un costo computacional bajo y provee una alta precisión para encontrar estructuras de mínima energía de moléculas orgánicas.

3.2. Conjunto de funciones base

Los conjuntos de funciones base son conjuntos de funciones matemáticas utilizadas para representar la función de onda electrónica y convertir las ecuaciones de diferenciales parciales del modelo en ecuaciones algebraicas que puedan ser resueltas de forma más eficiente en una computadora. Estas funciones son necesarias para los cálculos de estructura electrónica, como los cálculos de campo autoconsistente (SCF, Self Consistent Field), teoría de perturbaciones, clústeres acoplados (CC, Coupled Cluster), etc.

Los orbitales moleculares se expresan como una combinación lineal de funciones atómicas χ_r de la forma:

$$\phi_i = \sum c_{ri} \chi_r \quad (5)$$

Los dos tipos de funciones atómicas comúnmente utilizadas son el conjunto de funciones tipo Slater (STO) y las funciones de tipo Gaussianas (GTO). Las funciones de tipo Slater llevan a cabo el cálculo de las integrales bielectrónicas para describir a los orbitales atómicos, lo cual requiere de mucho tiempo de cómputo. Para optimizar el tiempo de evaluación de las integrales moleculares, se introdujeron las funciones de tipo Gaussianas (GTO) que actualmente es el conjunto de base más utilizado. Este tipo de funciones tiene una representación menos precisa de los orbitales atómicos, sin embargo, al reducir el tiempo de resolución de integrales moleculares, se reduce el costo computacional.

Algunos tipos de conjunto de funciones de base más utilizadas son las bases extendidas o *split-valence* [60], a las cuales se les puede añadir funciones de polarización y funciones difusas. Los conjuntos de funciones de polarización permiten cambiar la forma de los orbitales aumentando la flexibilidad y permitiendo una mayor deformación de la nube

electrónica de los átomos en el campo de la molécula. Las funciones difusas se utilizan para que los orbitales ocupen una región del espacio más grande, estas son útiles en sistemas donde los enlaces son débiles, como es el caso de enlaces por puente de hidrógeno y en el caso donde los electrones están lejos de los núcleos, como los aniones, compuestos con pares de electrones libres, los dímeros con enlaces de hidrógeno, entre otros, los cuales tienen densidad electrónica significativa a grandes distancias del núcleo. Las funciones base difusas están representadas por los signos “+” y “++”.

Algunos ejemplos de conjuntos de funciones base polarizadas y difusas son 6-31+G(d) y 6-311+G(d,p) las cuales fueron desarrolladas por Pople y colaboradores [61,62], y son las que se utilizan en este proyecto de tesis.

3.3. Modelado de proteínas por homología

El conocimiento de las estructuras tridimensionales de las proteínas es una tarea ardua y difícil en el quehacer científico, ya que se puede comprender de mejor forma cómo son las interacciones de la macromolécula con distintos ligantes. Por ello, el conocer la forma, la carga, la función química y la flexibilidad de las estructuras proteicas es de gran importancia [63].

La elucidación de las estructuras proteicas por métodos experimentales como la cristalografía por rayos X o por resonancia magnética nuclear (RMN) es de suma importancia. Sin embargo, no siempre es posible obtener la estructura de todas las proteínas mediante estas técnicas, por lo que se han desarrollado herramientas para poder obtener estas estructuras con métodos teóricos. Aunque existen métodos bastante precisos como los métodos semiempíricos y *ab initio*, solo se utilizan para proteínas pequeñas debido al costo computacional, por lo que la técnica de modelado por homología de secuencias es la más utilizada para modelar estructuras proteicas grandes [64].

El modelado de proteínas por homología es un método que predice la estructura tridimensional de una proteína aún no resuelta experimentalmente, basándose en la estructura de proteínas homólogas de las que ya se conoce su estructura y que pueden ser fácilmente obtenidas de una base de datos biológica.

Los pasos para llevarse a cabo son los siguientes:

1. Identificación de secuencias homólogas mediante la búsqueda de secuencias de proteínas similares a la proteína de interés mediante alineamientos por pares ante una base de datos.
2. Alineamiento por pares de secuencias para alinear la secuencia de la proteína objetivo con las secuencias homólogas para identificar regiones conservadas y no conservadas.
3. La construcción del modelo en donde se utiliza la estructura tridimensional conocida de las proteínas homólogas como plantilla para construir un modelo tridimensional de la proteína objetivo.
4. Optimización del modelo refinándolo y optimizándolo para corregir posibles errores y mejorar la precisión utilizando métodos de simulación molecular.
5. Validar el modelo mediante herramientas y criterios establecidos para evaluar su calidad y fiabilidad [65].

3.3.1 Alineamiento por pares de secuencias de proteínas.

Esta técnica bioinformática se refiere a un proceso en el cual se comparan dos secuencias de aminoácidos para identificar regiones de similitud y posibles homologías.

A continuación se presentan de manera general la secuencia de pasos a seguir para obtener a los posibles homólogos:

1. Seleccionar las dos secuencias proteicas que se van a comparar
2. Se asignan puntuaciones a cada posible alineamiento entre los residuos de las dos secuencias, las cuales se pueden basar en la similitud química entre los residuos, la frecuencia con la que aparecen en alineamientos observados en bases de datos, o en matrices de sustitución como BLOSUM O PAM que son las más conocidas y utilizadas en los programas de libre acceso.
3. Encontrar el mejor alineamiento global o local entre las dos secuencias utilizando la matriz de sustitución y considerando los parámetros de penalización por apertura o extensión de huecos considerados como mutaciones a lo largo del tiempo.

4. Se utiliza el mejor alineamiento y se identifican las regiones conservadas y las diferencias entre ellas.

El alineamiento de secuencias es una técnica estandarizada en bioinformática para visualizar las relaciones entre residuos en una colección de proteínas relacionadas estructural o evolutivamente. Los algoritmos comúnmente utilizados son los de programación dinámica (Needleman-Wunsch, Smith-Waterman) y los métodos heurísticos (BLAST, FASTA), estos últimos son más rápidos que los primeros por disminuir su precisión.

3.3.2. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas (ASMs)

El alineamiento de secuencias de proteínas múltiple es un método computacional utilizado para comparar y alinear más de dos secuencias de proteínas relacionadas entre sí. [66].

Como primer paso se seleccionan varias secuencias de proteínas relacionadas entre sí, posteriormente se asignan puntuaciones a cada posible alineamiento entre los aminoácidos basadas en la similitud química entre los aminoácidos y para ello se necesita una matriz de puntuación. Por último, se utiliza el mejor alineamiento identificado para resaltar las regiones conservadas y las diferencias entre ellas.

Existen dos métodos para llevar a cabo los alineamientos múltiples, los métodos exhaustivos y los métodos heurísticos. Con los métodos exhaustivos la precisión es mejor, pero el costo computacional es demasiado alto, por lo que en la práctica los métodos heurísticos son más utilizados.

Los algoritmos de los programas de alineamiento de secuencias constan de dos elementos para llevar a cabo dicho proceso:

1. La función objetivo: Se evalúa la calidad de un alineamiento candidato de un juego de secuencias de entrada.
2. El procedimiento de optimización: Se identifica el puntaje de alineamiento más alto con respecto a la función de puntuación que utiliza cada función objetivo.

Si bien todos los algoritmos de alineamiento de secuencias múltiples tienen estos dos elementos, la arquitectura de los programas es distinta. Los métodos más comunes son los siguientes:

1. Modelado de puntaje de suma de pares
2. Técnicas de optimización global
3. Alineamiento progresivo
4. Extensiones de alineamiento progresivo
5. Alineamiento local
6. Modelos probabilísticos
7. Métodos intensivos computacionales

La validación de los resultados de un alineamiento múltiple utiliza datos de referencia para comparar con los alineamientos generados. Un alineamiento producido por el programa comparado con un alineamiento de referencia da un puntaje de qué tan preciso es el alineamiento. Los métodos para evaluar el desempeño del alineamiento se basan en demostrar la efectividad de un programa de alineamiento basado en una estrategia heurística, comparando su exactitud con respecto a alineamientos referencia de proteínas reales o simuladas. Por dar algunos ejemplos se tienen referencias como BALiBase, que es de las más utilizadas, OXBENCH, PREFAB, SABmark, IRMBASE, etc. [67].

3.4. Acoplamiento molecular

La metodología de acoplamiento molecular es un enfoque computacional utilizado para predecir la estructura tridimensional de complejos formados por dos o más moléculas. Esta metodología es ampliamente utilizada en el diseño de fármacos y en estudios de interacciones moleculares. Esta técnica se utiliza para modelar la interacción entre una molécula pequeña (ligante) y una estructura proteica o de ácido nucleico como ADN o ARN, o incluso la interacción proteína-proteína, la cual permitirá caracterizar el comportamiento de la molécula pequeña en el objetivo diana y de esa forma dilucidar el proceso bioquímico fundamental por el cual se lleva a cabo dicha unión.

Los algoritmos de búsqueda tienen parámetros y métodos de búsqueda específicos, utilizados para explorar la superficie de energía libre y encontrar las mejores poses y así obtener el mejor ajuste entre las moléculas interactuantes con base en parámetros que se obtienen de las coordenadas del receptor y el ligante, como complementariedad geométrica, interacciones de van der Waals, flexibilidad ligante-receptor o consideraciones interatómicas como puentes de hidrógenos o contactos hidrofóbicos.

Si las consideraciones termodinámicas del sistema se modelan correctamente, las funciones de puntaje de energía evalúan la superficie energética. Desafortunadamente, tomar en cuenta las consideraciones termodinámicas no es una tarea sencilla, por lo que no se garantiza que el mínimo global asociado a la superficie energética corresponda al acoplamiento nativo [68,69]

De forma general los algoritmos de búsqueda que ubican a las moléculas en el sitio activo y las funciones de puntaje de energía elucidan poses correctas de poses incorrectas evaluando las interacciones entre compuestos y los objetivos potenciales con cálculos de aproximación e interacciones electrostáticas, de van der Waals, términos de solvatación o efectos entrópicos [70].

Los programas de acoplamiento molecular tienen distintos algoritmos que utilizan diversas estrategias computacionales, como el muestreo de conformaciones, el análisis de energía y la optimización de la geometría molecular, para predecir las interacciones entre las moléculas de manera precisa y eficiente búsqueda como son:

1. Los **basados en estructuras**, que utilizan información detallada sobre las estructuras tridimensionales de las moléculas involucradas en la interacción. Ejemplos de programas que lo incluyen son AutoDock, DOCK, y GOLD.
2. Los **basados en ligandos** se centran en el ligando y buscan predecir su conformación óptima para encajar en el sitio de unión del receptor. Ejemplos incluyen FlexX, Glide, y Surflex.
3. Y los **basados en receptores**, los cuales se centran en el receptor y buscan predecir la orientación óptima del ligando en su sitio de unión. Ejemplos incluyen AutoDock Vina, GOLD, y Glide.

Por otro lado, las funciones de puntuación de energía evalúan (no calculan) las diferentes tomando en cuenta las interacciones entre compuestos y los objetivos potenciales con aproximaciones e interacciones electrostáticas o interacciones de van der Waals, términos de solvatación o efectos entrópicos

Al realizar un acoplamiento molecular se debe tomar en cuenta la flexibilidad que tienen los ligandos y los receptores, es decir, el acoplamiento se puede realizar rígido, semiflexible o flexible.

En un acoplamiento rígido, se asume que tanto el ligando como el receptor mantienen sus estructuras tridimensionales fijas durante todo el proceso de acoplamiento, es decir, no se permite ningún movimiento o cambio conformacional en ninguna de las moléculas durante la formación del complejo ligando-receptor.

Los acoplamientos rígidos son adecuados cuando se espera que tanto el ligando como el receptor mantengan una estructura rígida durante la interacción, como en el caso de moléculas pequeñas que se unen a sitios de unión bien definidos en proteínas. Sin embargo, en muchos casos, especialmente cuando se consideran proteínas grandes o flexibles, los acoplamientos flexibles o semiflexibles pueden proporcionar predicciones más precisas al tener en cuenta los posibles cambios conformacionales en el ligando, el receptor o ambos durante la formación del complejo. Los acoplamientos rígidos son más simples computacionalmente, lo que los hace más rápidos de calcular, pero no toman en cuenta los posibles cambios conformacionales que pueden ocurrir en el ligando, el receptor o ambos durante la formación del complejo. Esto puede llevar a predicciones menos precisas de las interacciones ligando-receptor.

Por otro lado, un acoplamiento semirrígido es una variante intermedia entre un acoplamiento rígido y uno flexible. En este tipo de acoplamiento se permite cierto grado de flexibilidad o movimiento en una o ambas moléculas (ligando y/o receptor), mientras que al menos una de las moléculas se mantiene rígida durante el proceso de acoplamiento.

Por último, el acoplamiento flexible brinda mayor refinamiento de especificidad por un costo computacional mayor. El acoplamiento flexible puede considerar varias conformaciones

posibles tanto de ligante como del receptor, así como para ambas moléculas al mismo tiempo [67].

En la implementación del programa AutoDock Vina se cuenta con un algoritmo de búsqueda de tipo estocástico, algoritmos genéticos con procedimientos para optimizaciones locales. En este algoritmo los pasos son elementos de mutación y posteriormente una optimización local. Mientras que la función de puntuación es una suma de todos los pares de átomos que pueden moverse respecto a los otros. Aquí cada átomo i se le asigna un tipo t_i y se define como un conjunto simétrico de funciones de interacciones $f_{t_i t_j}$ de distancias interatómicas definidas por r_{ij} :

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \quad (6)$$

donde C es la suma de interacciones intra e intermoleculares. La función de puntuación del AutoDock Vina está basada en la suma de interacciones atómicas, como interacciones estéricas, hidrofóbicas e interacciones de puente de hidrógeno [70, 71]:

$$c = c_{inter} + c_{intra} \quad (7)$$

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

4.1. Cálculo de la estructura molecular de los inhibidores de HIF-1

Se seleccionaron los compuestos 0X3 (CID: 71575231) [73], PT2385 (CID: 91754484) [74], PT2399 (CID 91663289) [75] y PT2377 (belzutifán) (CID: 117947097) [76], ya que se ha reportado previamente que tienen actividad anticancerígena por la inhibición de la actividad del factor HIF-1 mediante el bloqueo de la dimerización de las subunidades α y β [44].

Se realizaron cálculos de optimización y frecuencias vibracionales en los niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p) [59, 61] en el programa Gaussian16 [77] para obtener las estructuras de mínima energía. Los cálculos de frecuencias vibracionales se realizaron para corroborar que las estructuras correspondieran a mínimos locales en la superficie de energía potencial. Los resultados se visualizaron en el programa GaussView 6.0 [78]. Finalmente se calcularon los valores de RMSD de las estructuras optimizadas en ambos niveles de teoría respecto a las estructuras 3D obtenidas en la base de datos de PubChem utilizando el programa VMD [79].

4.2. Modelado de HIF-1

4.2.1. Alineamiento de secuencias.

Se realizó la búsqueda de la estructura cristalina del complejo HIF-1 α / β de humano en la base de datos Protein Data Bank, PDB (<https://rcsb.org>) y en otras bases de datos. Al no disponer de datos cristalográficos de esta proteína, se llevó a cabo el modelado de proteínas por homología. Esta técnica se realizó mediante un alineamiento por pares de secuencias contra la base de datos PDB en el programa BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Posteriormente, se ejecutó un alineamiento múltiple de secuencias de la proteína que se desea modelar, (*target* u objetivo) con una serie de secuencias de proteínas homólogas con estructuras cristalinas resueltas (*template* o molde). Esto se llevó a cabo en el programa Clustal Omega a través de la interfaz de JalView [80, 81].

4.2.2. Modelado por homología

Una vez alineadas las secuencias, se llevó a cabo el modelado por homología con el programa Modeller [82]. Este programa utiliza las secuencias homólogas alineadas, para construir un modelo tridimensional de la proteína objetivo basado en la estructura tridimensional conocida de las proteínas homólogas. Posteriormente, optimiza el modelo utilizando métodos de optimización molecular como la minimización de energía o la dinámica molecular para mejorar la geometría y la estabilidad del modelo. Se evalúa la calidad del modelo utilizando diversos criterios, como la energía potencial, la geometría de enlace y la orientación de residuos, se realizan ajustes adicionales para mejorar la calidad y precisión y, para finalizar, se valida el modelo.

Las estructuras cristalizadas que se utilizaron como molde para llevar a cabo el modelado de la estructura de HIF-1 α/β fueron las siguientes:

1. Para el modelado de la estructura HIF-1 α se utilizaron las estructuras con PDB ID: 4ZP4 [83], 4ZPR [84] y 6E3T [85]. pertenecientes a las estructuras HIF-1 α y HIF-2 α , aisladas de ratón (*Mus musculus*).
2. Para el modelado de la estructura HIF-1 β se utilizaron las estructuras con PDB ID: 4ZP4 [86], 7V7L [87], 5Y7Y [88] y 5V0L [89] pertenecientes a las estructuras de HIF-2 β y HIF-3 β pertenecientes a *Mus musculus* y *Homo sapiens*, respectivamente.

Además, se llevó a cabo el modelado de las estructuras de HIF-1 α/β utilizando los tres y cuatro *templates* respectivamente, para realizar un modelado que llamaremos “múltiple”.

4.3. Acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1

Una vez obtenidas las estructuras optimizadas de las moléculas con actividad inhibitoria de HIF-1 y las estructuras tridimensionales de las subunidades del complejo HIF-1 α/β de humano modeladas, se realizó el acoplamiento molecular entre cada monómero proteico modelado y los inhibidores para obtener la descripción de un posible mecanismo de acción por el cual estas moléculas ejercen su actividad anticancerígena.

Los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo en el programa Autodock Vina y se obtuvieron distintas poses con sus respectivas energías de afinidad [90].

El diagrama general de la metodología para el acoplamiento molecular de los inhibidores con las subunidades de HIF-1 α/β de humano modeladas se muestra en la **Figura 12**.

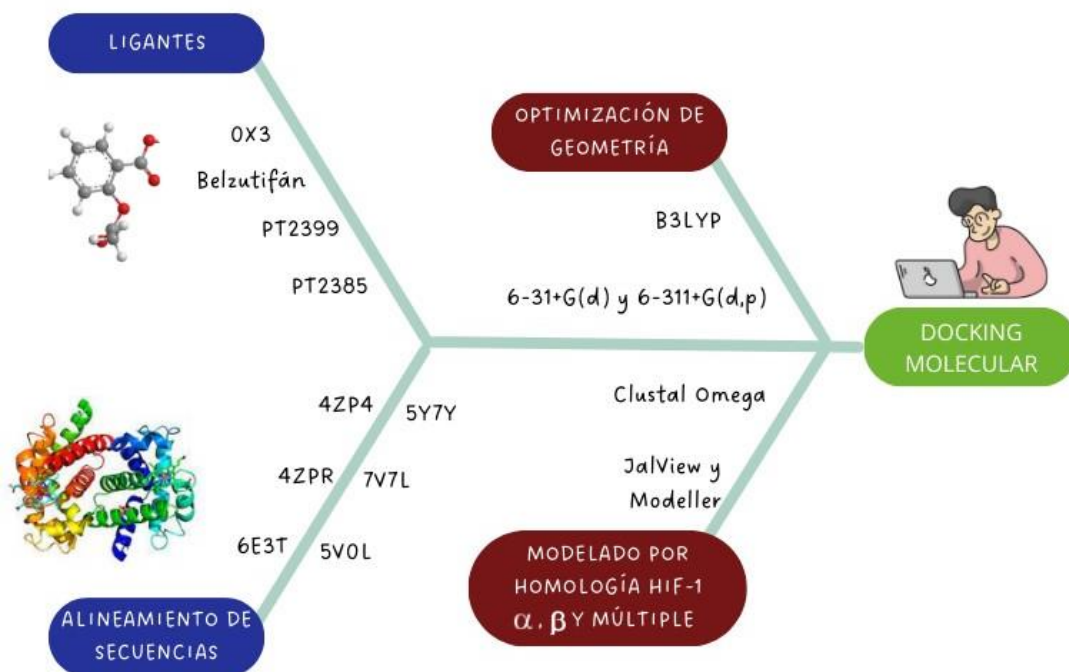


Figura 12. Diagrama general de la metodología para el acoplamiento molecular de los inhibidores con las proteínas HIF-1 α/β modeladas.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estructura molecular de los inhibidores de HIF-1

Las estructuras moleculares optimizadas de los inhibidores 0X3, PT2399, PT2385 y PT2977 (Belzutifán) se obtuvieron usando los niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p). En la **Figura 13** se muestran las estructuras optimizadas en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p), así como la numeración utilizada. En la **Tabla 2** se muestran los parámetros optimizados seleccionados de las cuatro moléculas inhibidoras en ambos niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p), así como la energía total y el valor del RMSD respecto a los parámetros reportados en las bases de datos [73-76].

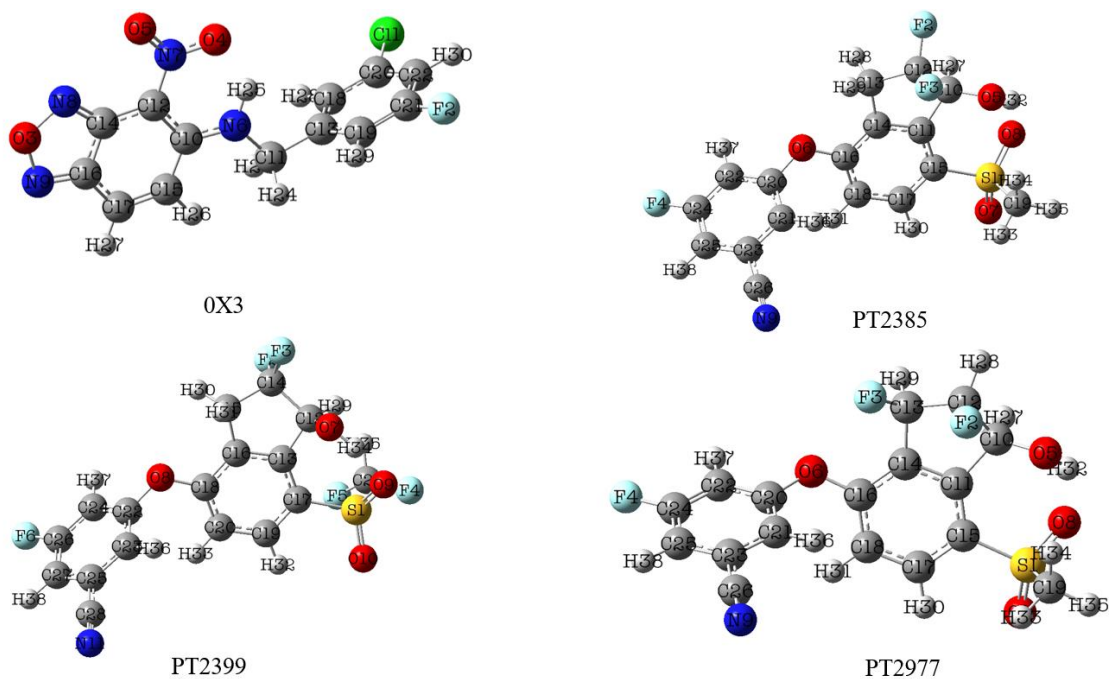


Figura 13. Estructuras optimizadas de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α/β en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p).

Tabla 2. Parámetros optimizados seleccionados (distancias de enlace en Å y ángulos en grados) y energías absolutas (u.a.) de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α/β calculados en los niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p).

0X3			
Parámetros	Experimental	B3LYP/6-31+G(d)	B3LYP/6-311+G(d, p)
N8-O3	1.385	1.386	1.38
N9-O3	1.385	1.358	1.35
C12-N7	1.416	1.428	1.43
N7-O4	1.257	1.258	1.25
N7-O5	1.258	1.230	1.22
N6-H25	1.014	1.020	1.02
N6-C10	1.422	1.349	1.35
N6-C11	1.423	1.465	1.46
C20-C11	1.721	1.752	1.75
C21-F2	1.340	1.354	1.35
N8-O3-N9	111.84	113.20	113.12
O4-N7-O5	121.66	122.69	122.88
H25-N6-C10	117.53	114.66	114.60
H25-N6-C11	119.99	119.11	119.23
C11-C20-C18	119.98	119.38	119.35
C11-C20-C22	120.01	119.10	119.07
C19-C21-F2	120.03	118.71	118.77
C22-C21-F2	119.98	118.29	118.36
C14-N8-O3-N9	0.00	0.00	0.00
C14-C12-N7-O5	89.99	-0.01	0.01
C10-C12-N7-O4	89.95	0.02	0.01
C12-C10-N6-H25	0.26	-0.36	-0.37
C12-C10-N6-C11	179.98	-179.94	-179.82
N6-C11-C13-C18	-76.29	-93.75	-93.55
C11-C20-C18-C13	180.00	179.76	179.74
C11-C20-C22-C21	-180.00	-179.82	-179.80
C13-C19-C21-F2	-179.99	-179.74	-179.70
C20-C22-C21-F2	179.97	179.74	179.72
Energía (u.a.)	—	-1504.7634	-1505.0330
PT2385			
Parámetros	Experimental	B3LYP/6-31+G(d)	B3LYP/6-311+G(d, p)
C24-F4	1.340	1.352	1.347
C26-N9	1.161	1.163	1.155
O6-C20	1.387	1.381	1.380
O6-C16	1.357	1.379	1.377
C12-F2	1.350	1.372	1.368
C12-F3	1.355	1.373	1.370
C10-O5	1.414	1.404	1.401
O5-H32	0.973	0.977	0.970
C15-S1	1.745	1.805	1.806
S1-O7	1.457	1.472	1.465
S1-O8	1.457	1.484	1.477

S1-C19	1.778	1.808	1.806
C22-C24-F4	120.00	118.31	118.37
C23-C26-N9	179.97	179.72	179.76
C22-C20-O6	119.99	116.58	116.77
C20-O6-C16	117.82	121.39	121.25
O6-C16-C18	120.39	123.53	123.60
O6-C16-C14	121.32	116.25	116.23
F2-C12-F3	107.40	106.47	106.44
F2-C12-C13	110.73	112.42	112.50
F3-C12-C13	109.46	109.58	109.61
F2-C12-C10	110.84	111.79	111.81
F3-C12-C10	110.73	109.86	109.92
C12-C10-O5	111.37	110.99	111.08
C10-O5-H32	107.44	106.33	106.51
C15-S1-O7	108.96	107.71	107.69
C15-S1-O8	107.94	108.15	108.07
C15-S1-C19	104.47	104.85	104.66
O7-S1-O8	119.69	119.67	119.74
F4-C24-C22-C20	-179.92	-180.00	179.98
C21-C20-O6-C16	45.02	47.92	50.28
C22-C20-O6-C16	-134.99	-136.62	-134.13
C14-C16-O6-C20	-120.00	-152.62	-154.08
C16-O6-C20-C22	-134.99	-136.62	-134.13
C18-C16-O6-C20	60.06	31.113	29.41
O6-C16-C18-C17	179.34	176.95	177.26
O6-C16-C14-C11	-179.39	-177.01	-177.33
C14-C13-C12-F2	148.85	149.37	149.55
C14-C13-C12-F3	-92.93	-92.45	-92.24
F2-C12-C10-C11	-149.28	-151.13	-151.36
F3-C12-C10-C11	91.63	90.89	90.66
C12-C10-O5-H32	-59.23	-162.59	-161.41
C11-C10-O5-H32	-171.94	80.75	81.72
H27-C10-O5-H32	64.44	-44.38	-43.30
C17-C15-S1-O7	23.96	18.42	17.87
C17-C15-S1-O8	155.39	149.07	148.54
C17-C15-S1-C19	-90.00	-96.38	-96.95
Energía (u.a.)	—	-1708.3625	-1708.7076

PT2399

Parámetros	Experimental	B3LYP/6-31+G(d)	B3LYP/6-311+G(d, p)
C26-F6	1.340	1.352	1.346
C28-N11	1.160	1.163	1.155
O8-C22	1.387	1.383	1.385
O8-C18	1.358	1.375	1.371
C14-F2	1.358	1.386	1.386
C14-F3	1.351	1.367	1.353
C12-O7	1.416	1.418	1.409
O7-H34	0.972	0.971	0.969
C17-S1	1.745	1.796	1.788
S1-O9	1.455	1.469	1.471
S1-O10	1.457	1.466	1.458
S1-C21	1.775	1.885	1.888

C21-F4	1.357	1.349	1.343
C21-F5	1.356	1.357	1.350
C24-C26-F6	119.99	118.27	118.43
C25-C28-N11	179.93	179.96	179.89
C24-C22-O8	119.95	121.10	117.72
C22-O8-C18	117.81	121.34	120.92
O8-C18-C20	120.39	123.86	124.06
O8-C18-C16	121.23	116.02	115.78
F2-C14-F3	106.98	106.32	106.58
F2-C14-C15	109.55	109.58	108.83
F3-C14-C15	110.90	113.66	113.44
F2-C14-C12	109.40	108.07	106.95
F3-C14-C12	111.44	112.10	113.23
C14-C12-O7	111.24	110.69	109.12
C12-O7-H34	107.37	109.04	106.56
C17-S1-O9	107.79	110.13	108.57
C17-S1-O10	108.89	108.58	109.19
C17-S1-C21	104.52	102.21	103.72
O10-S1-O9	119.94	122.56	121.73
F5-C21-F4	106.80	109.07	109.33
F6-C26-C24-C22	-179.91	-179.96	179.91
C23-C22-O8-C18	134.97	129.25	69.28
C24-C22-O8-C18	-45.06	-55.58	-115.18
C16-C18-O8-C22	120.08	159.30	-168.22
C20-C18-O8-C22	-59.86	-24.09	13.28
O8-C18-C20-C19	-179.62	-178.12	179.01
O8-C18-C16-C13	179.51	177.52	-178.64
C16-C15-C14-F2	94.73	89.20	89.41
C16-C15-C14-F3	-147.41	-152.01	-152.13
F2-C14-C12-C13	-94.90	-87.45	-89.48
F3-C14-C12-C13	147.01	155.70	153.43
C14-C12-O7-H34	-59.27	-84.59	-174.99
C13-C12-O7-H34	-170.11	166.17	74.07
H29-C12-O7-H34	63.89	39.72	-54.67
C19-C17-S1-O9	-135.40	-164.10	-150.80
C19-C17-S1-O10	-3.81	-27.40	-16.01
C19-C17-S1-C21	109.99	85.56	98.33
S1-C21-F4-H35	-121.65	-120.07	-119.86
S1-C21-F5-H35	122.02	121.41	120.75
Energía (u.a.)	—	-1906.8236	-1907.2278

PT2977

Parámetros	Experimental	B3LYP/6-31+G(d)	B3LYP/6-311+G(d, p)
C24-F4	1.340	1.352	1.348
C26-N9	1.161	1.163	1.155
O6-C20	1.387	1.378	1.376
O6-C16	1.357	1.376	1.374
C12-F2	1.367	1.391	1.388
C13-F3	1.354	1.391	1.387
C10-O5	1.412	1.404	1.402
O5-H32	0.973	0.978	0.971
C15-S1	1.745	1.806	1.807

S1-O7	1.457	1.471	1.465
S1-O8	1.456	1.484	1.478
S1-C19	1.779	1.807	1.805
C22-C24-F4	119.95	118.28	118.35
C23-C26-N9	179.98	179.64	179.67
C22-C20-O6	119.990	116.11	116.10
C20-O6-C16	117.859	121.27	121.26
O6-C16-C18	120.476	122.37	122.34
O6-C16-C14	121.367	117.73	117.77
F2-C12-H28	107.15	107.36	107.55
F3-C13-H29	109.12	106.54	106.84
F2-C12-C13	108.08	108.27	108.36
F3-C13-C12	110.07	111.33	111.43
F2-C12-C10	108.52	109.07	109.14
F3-C13-C14	115.61	113.31	113.42
C12-C10-O5	111.53	110.57	110.66
C10-O5-H32	107.44	106.64	106.79
C15-S1-O7	108.92	107.69	107.66
C15-S1-O8	107.96	108.03	107.95
C15-S1-C19	104.44	104.84	104.66
O7-S1-O8	119.70	119.58	119.64
F4-C24-C22-C20	-179.94	-179.90	-179.92
C21-C20-O6-C16	45.04	35.75	34.86
C22-C20-O6-C16	-134.94	-148.02	-148.73
C14-C16-O6-C20	-120.01	-137.60	-136.87
C18-C16-O6-C20	60.27	47.09	47.82
F2-C12-C13-F3	40.86	37.40	37.67
F2-C12-C10-C11	81.48	82.05	81.93
F3-C13-C14-C16	42.03	43.33	43.14
C12-C10-O5-H32	-59.65	-166.71	-166.01
C11-C10-O5-H32	-171.93	76.09	76.64
H27-C10-O5-H32	64.67	-47.96	-47.27
C17-C15-S1-O7	23.89	16.73	16.40
C17-C15-S1-O8	155.33	147.17	146.84
C17-C15-S1-C19	-90.00	-98.23	-98.59
Energía (u.a.)	—	-1708.3440	-1708.6894

De los resultados se observa que en general para las moléculas inhibitoras no hubo cambios significativos en las distancias de enlace ni en los ángulos de enlace, únicamente en los ángulos diedros. Para 0X3, derivado de hidroxibenzaldehído, se observaron los mayores cambios en los valores calculados respecto a los valores reportados experimentalmente en los ángulos diedros C14-C12-N7-O5, C10-C12-N7-O4 y N6-C11-C13-C18. Los dos primeros corresponden a la torsión del grupo NO₂ sobre el anillo 2,1,3-benzoxadioazol y el tercero corresponde a la torsión del anillo aromático que contiene a los sustituyentes Cl1 y

F2 en las posiciones *meta*, ver **Figura 13**. Se puede observar en la **Tabla 2** que en ambos niveles de teoría los valores calculados son similares.

Para los compuestos derivados de inden-fluorobenzonitrilo, en PT2385 se observaron cambios significativos en los ángulos diedros C14–C16–O6–C20, C18–C16–O6–C20, C12–C10–O5–H32, C11–C10–O5–H32 y H27–C10–O5–H32. Los ángulos diedros C14–C16–O6–C20 y C18–C16–O6–C20 corresponden a la torsión entre el anillo 5-benzofluoronitrilo y el anillo dihidroindenilo a través de los enlaces C16–O6 y O6–C20 del grupo éter, mientras que los ángulos diedros C12–C10–O5–H32, C11–C10–O5–H32 y H27–C10–O5–H32 involucran el cambio en la posición del grupo hidroxilo O5–H32 respecto al anillo dihidroindenilo, ver **Figura 13**. Los ángulos diedros que involucran al grupo SO₂, como son C17–C15–S1–O7, C17–C15–S1–O8 y C17–C15–S1–C19, presentan cambios pequeños respecto a los valores de la base de datos. En ambos niveles de teoría los valores son similares variando únicamente de 1 a 2° aproximadamente, ver **Tabla 2**.

De la misma manera, para PT2399, los ángulos diedros que involucran la torsión de los anillos 5-benzofluoronitrilo y dihidroindenilo a través de los enlaces C18–O8 y O8–C22 del grupo éter son los que presentan los mayores cambios, como son los ángulos diedros C23–C22–O8–C18, C24–C22–O8–C18, C16–C18–O8–C22 y C20–C18–O8–C22. También los ángulos diedros involucrados en la posición del grupo hidroxilo O7–H34 varían significativamente en las estructuras calculadas. Estos ángulos diedros corresponden a los átomos C14–C12–O7–H34, C13–C12–O7–H34 y H29–C12–O7–H34. Para PT2399, a diferencia de PT2385, se observan cambios más significativos en la torsión del grupo SO₂ respecto a la estructura de la base de datos, lo cual se observa en los valores de los ángulos diedros C19–C17–S1–O9, C19–C17–S1–O10 y C19–C17–S1–C21, ver **Tabla 2**. Cabe mencionar que en este caso, los valores obtenidos para estos ángulos diedros sí varían en el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) respecto a los valores obtenidos en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p). Esto se puede atribuir al efecto del grupo (difluorometil)sulfonilo en PT2399, el cual no lo contienen las moléculas de PT2385 y PT2977.

Finalmente, la estructura de PT2977 (belzutifán) es muy similar a PT2385, variando únicamente la posición de los átomos de F2 y F3 en el anillo dihidroindenilo. En este caso,

también cambia la posición de los anillos 5-benzofluoronitrilo y dihidroindenilo, respecto a los enlaces C16–O6 y O6–C20 del grupo éter central, como se puede observar en los valores de los ángulos diedros C21–C20–O6–C16, C22–C20–O6–C16, C14–C16–O6–C20 y C18–C16–O6–C20. Los ángulos diedros C12–C10–O5–H32, C11–C10–O5–H32 y H27–C10–O5–H32 que involucran el cambio en la posición del grupo hidroxilo O5–H32 respecto al grupo dihidroindenilo, cambian significativamente respecto a los valores experimentales de forma similar a PT2385. Los ángulos diedros que involucran al grupo SO₂, C17–C15–S1–O7, C17–C15–S1–O8 y C17–C15–S1–C19, presentan cambios pequeños respecto a los valores de la base de datos, al igual que PT2385. Ambos niveles de teoría dan valores similares al igual que para las moléculas de 0X3 y PT2385.

Se puede concluir que el efecto del cambio de posición del átomo F3 unido a C12 en PT2977, a diferencia de PT2385, no tiene un efecto significativo en la estructura molecular de ambos compuestos, los cuales son bastante similares. Mientras que en PT2399 tiene mayor efecto el grupo (difluorometil)sulfonilo el cual no lo contienen PT2385 y PT2977, y es donde se observan las mayores diferencias entre las estructuras optimizadas y la obtenida de la base de datos.

Por otro lado, en la **Tabla 3**, en el análisis de RMSD de las moléculas reportadas experimentalmente respecto a las moléculas optimizadas, para 0X3, PT2385 y PT2977 se obtuvieron valores similares al compararlos con ambos niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p), lo que indica que no hubo una variación significativa en las estructuras de las moléculas como se puede observar en la **Figura 14**. En el caso de PT2399 se obtuvo el valor más grande de RMSD (1.00 Å) al compararlo con el nivel de teoría más grande B3LYP/6-311+G(d,p). Como se mencionó anteriormente se debe al efecto del grupo (difluorometil)sulfonilo en PT2399, el cual no contienen las moléculas de PT2385 y PT2977. Finalmente, se observa que comparando las estructuras optimizadas en ambos niveles de teoría B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d,p) se obtienen valores pequeños de RMSD, menores a 0.1 Å, para las moléculas 0X3, PT2385 y PT2977, mientras para PT2399 se obtiene un valor de 0.75 Å.

Tabla 3. Valores de RMSD (Å) de las estructuras de las moléculas inhibidoras calculadas y reportadas en las bases de datos.

Ligantes	Exp/B3LYP/6-31+G(d)	Exp/B3LYP/6-311+G(d,p)	B3LYP/6-31+G(d)/B3LYP/6-311+G(d,p)
0X3	0.5137	0.5121	0.00837
PT2385	0.5941	0.6009	0.0237
PT2399	0.5365	1.0028	0.7529
PT2977	0.4818	0.4788	0.0137

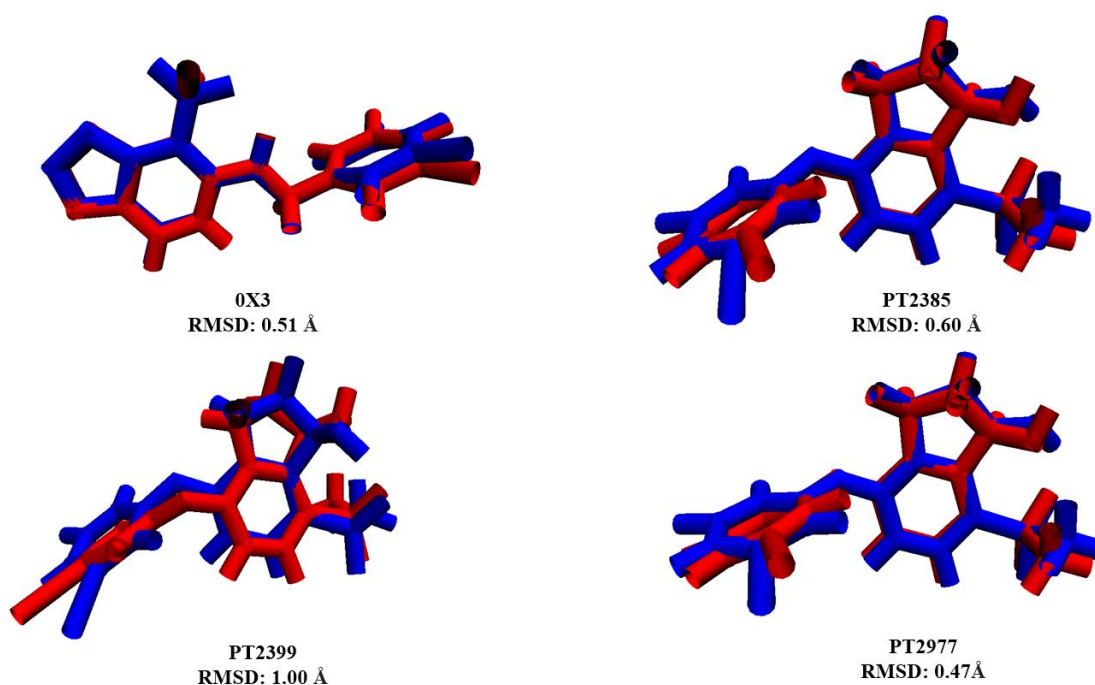


Figura 14. Comparación de las estructuras optimizadas de las moléculas inhibidoras de HIF-1 α / β calculadas en el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) (color azul) con las estructuras obtenidas en la base de datos PubChem [73-76] (color rojo).

5.2. Modelado de HIF-1

En la **Figura 15** se muestra el esquema de los pasos a seguir para realizar el modelado de las estructuras HIF-1 α / β de humano. El procedimiento comienza con la obtención de la

secuencia de aminoácidos de HIF-1 α y HIF-1 β de humano en las bases de datos hasta la construcción de sus estructuras 3D necesarias para llevar a cabo los acoplamientos moleculares con los distintos inhibidores. Estos pasos se describen detalladamente en las siguientes secciones.

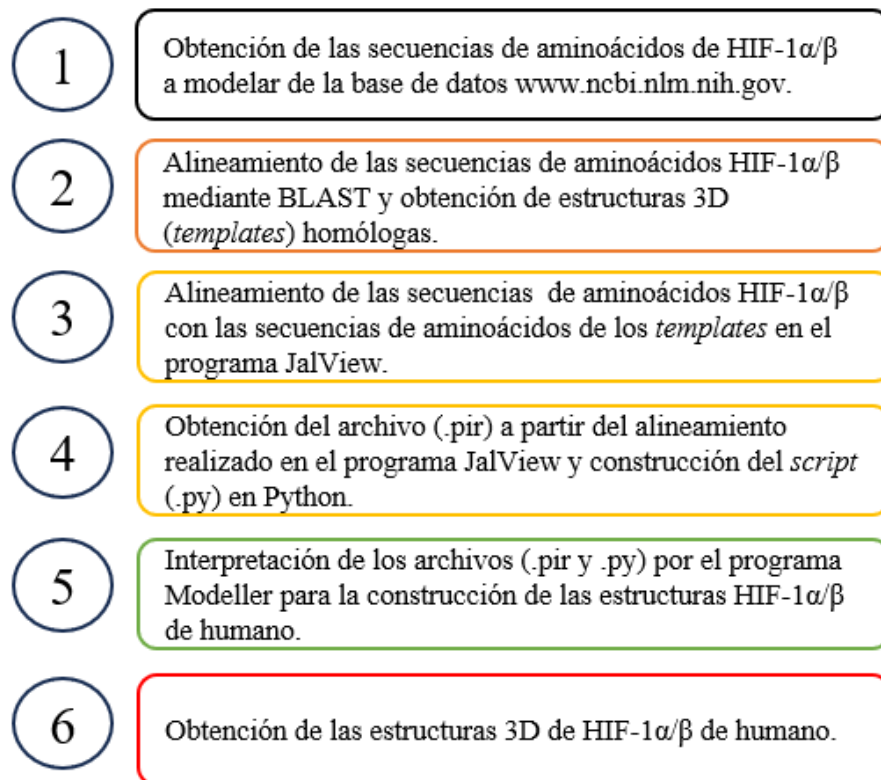


Figura 15. Pasos para realizar el modelado de las estructuras HIF-1 α/β de humano.

5.2.1. Alineamiento de secuencias

En la **Tabla 4** se muestran los distintos parámetros estimados en el alineamiento de las secuencias modeladas respecto a las secuencias de las bases de datos de ratón (*Mus musculus*) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la obtención y selección de las secuencias homólogas de HIF-1 α/β de humano.

De los parámetros mostrados, la identidad expresa el porcentaje en que dos secuencias de aminoácidos (secuencia a modelar contra secuencias de la base de datos) tengan los mismos residuos con la misma posición dentro del alineamiento. El parámetro de cobertura indica el porcentaje de superposición de la secuencia a modelar contra las secuencias de la base de

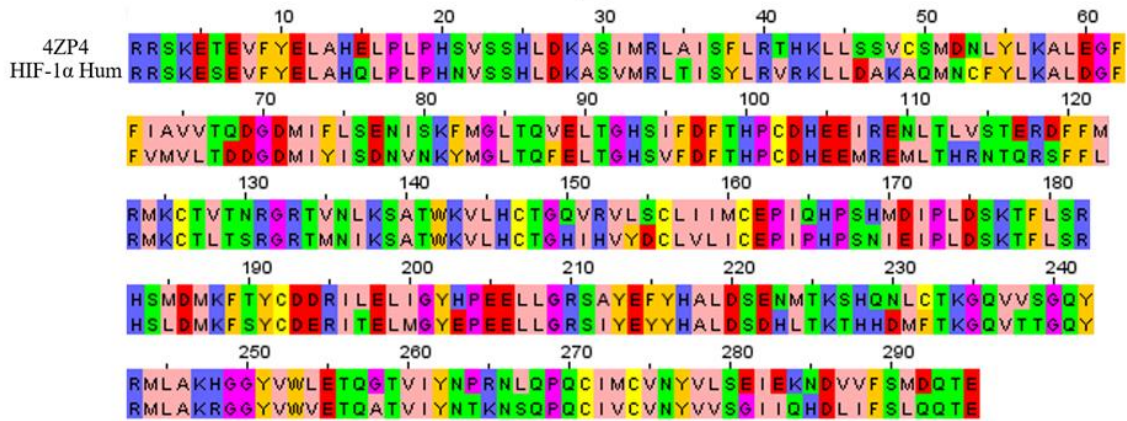
datos. El parámetro más importante para seleccionar las estructuras molde o *template* es el parámetro de valor esperado, que indica el número de alineamientos que se han realizado por azar, y cuanto más cercano esté de cero más significativo es el alineamiento y por ende se pueden seleccionar estructuras homólogas. Por lo anterior, se seleccionaron las tres primeras estructuras para HIF-1 α y las cuatro primeras para HIF-1 β como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Parámetros de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las estructuras homólogas de HIF-1 α/β de humano obtenidas mediante la herramienta BLAST.

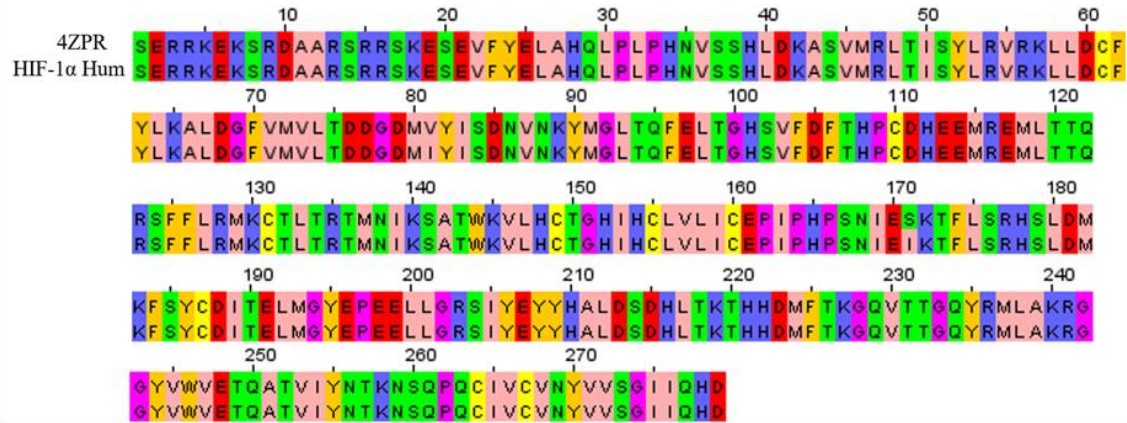
Organismo	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura	Valor esperado	Identidad	PDB ID
HIF-1α						
<i>Mus musculus</i>	679	679	37%	0.0	97.52%	4ZPR_B
<i>Mus musculus</i>	474	474	38%	4x10 ⁻¹⁶¹	65.76%	4ZP4_B
<i>Mus musculus</i>	474	474	38%	5x10 ⁻¹⁶¹	65.76%	6E3T_B
HIF-1β						
<i>Mus musculus</i>	801	801	48%	0.0	97.91%	4ZP4_A
<i>Mus musculus</i>	735	735	48%	0.0	91.64%	7V7L_A
<i>Bos taurus</i>	603	603	48%	0.0	79.22%	5Y7Y_B
<i>Mus musculus</i>	580	580	35%	0.0	99.64%	5VOL_A

Posteriormente, a partir de los alineamientos obtenidos por BLAST se obtienen las secuencias de aminoácidos de las estructuras resueltas por rayos-X de los *templates* en el programa JalView, para realizar un nuevo alineamiento que el programa Modeller utiliza como archivo de entrada (.pir) para construir las estructuras objetivo. Los alineamientos por pares con cada uno de los *templates* así como el alineamiento múltiple, obtenidos en Jalview, para el modelado de la estructura de HIF-1 α/β de humano se muestran en las **Figuras 16** y **17**, para HIF-1 α y HIF-1 β , respectivamente.

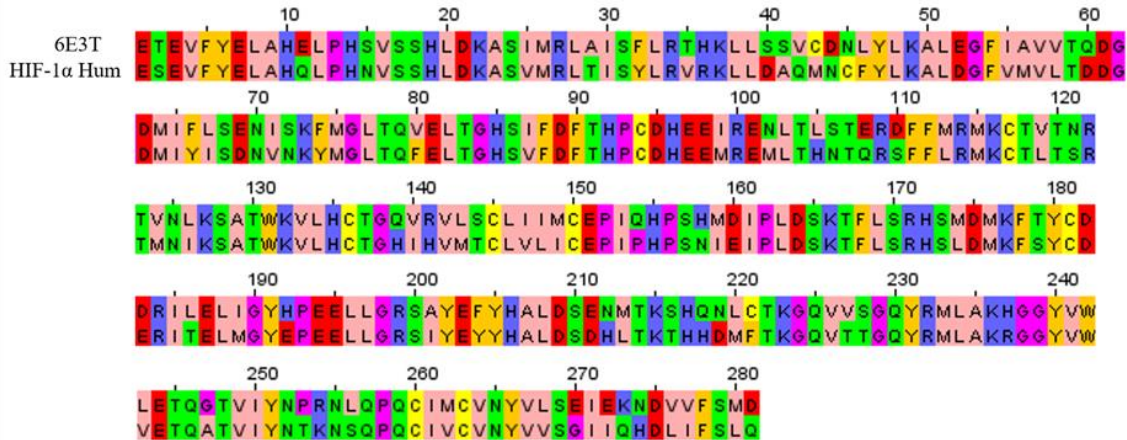
4ZP4_HIF-1 α



4ZPR_HIF-1 α



6E3T_HIF-1 α



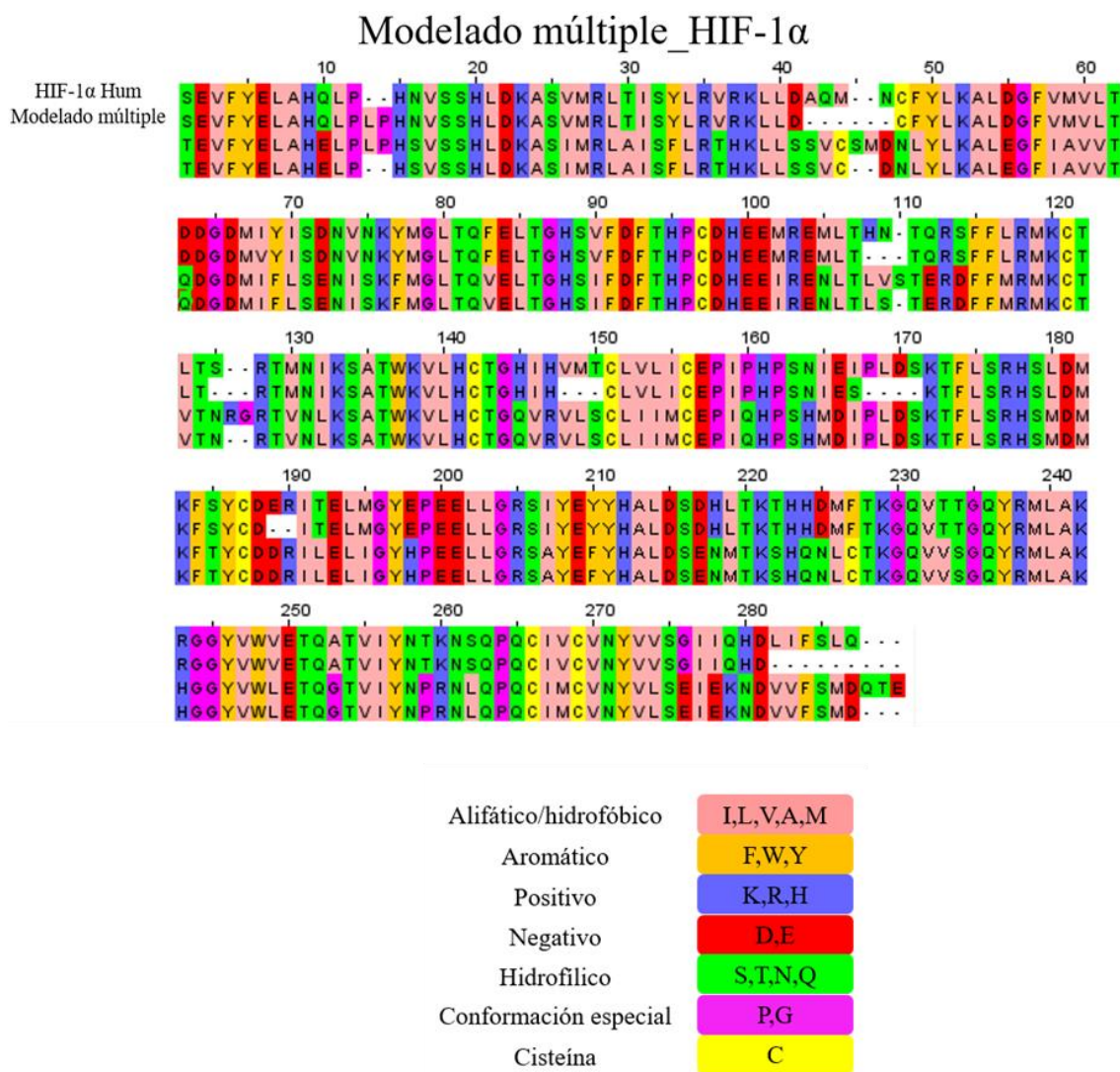
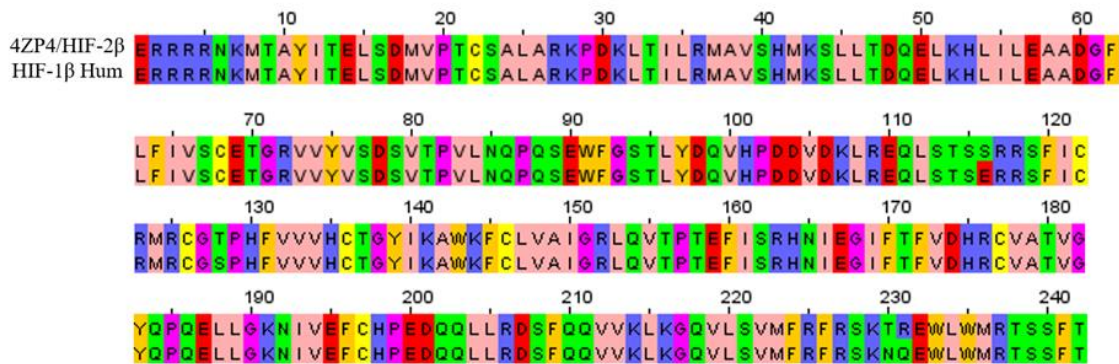
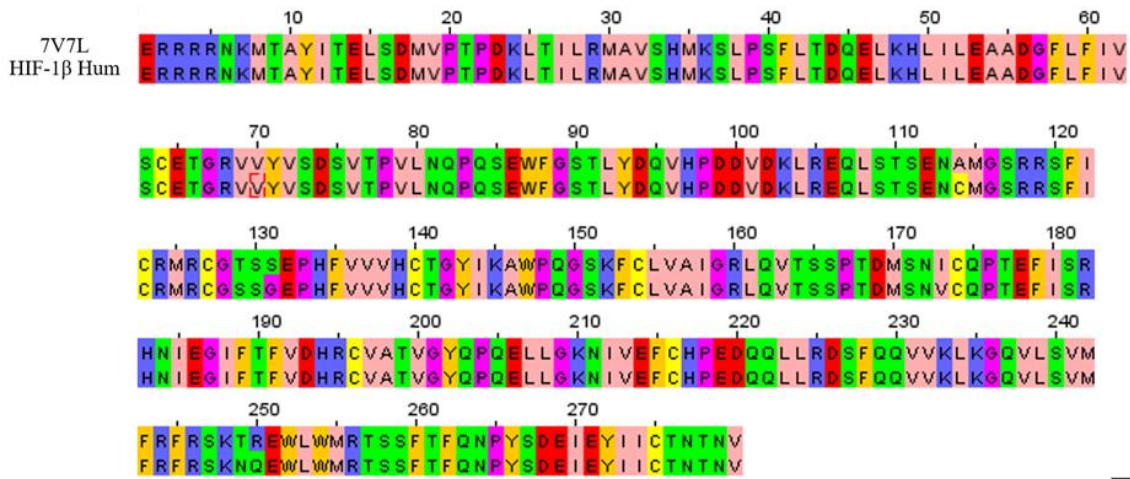


Figura 16. Alineamiento por pares de la secuencia de aminoácidos de HIF-1α de humano con la secuencia de aminoácidos de las estructuras de los *templates* 4ZP4, 4ZPR, 6E3T y el alineamiento múltiple. Se muestra el código de colores para representar a los aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas.

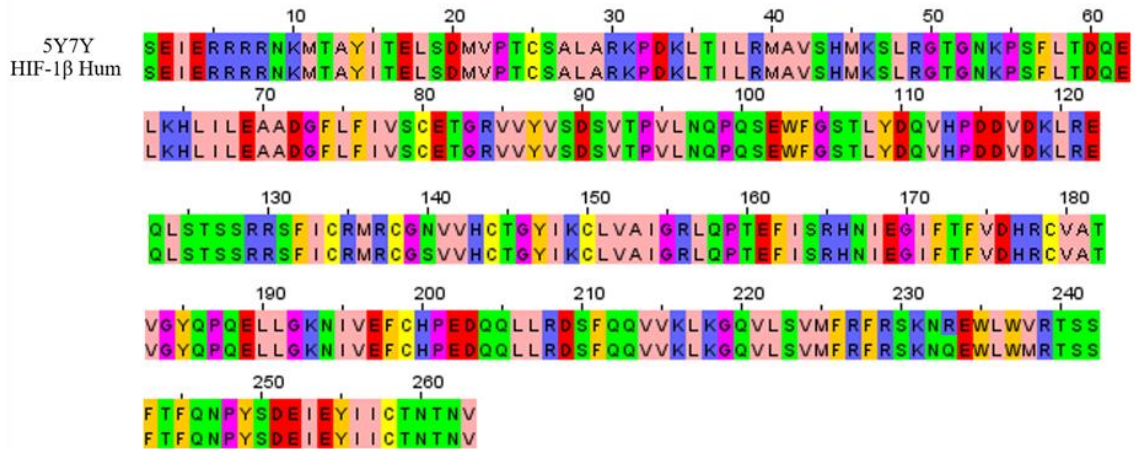
4ZP4_HIF-1 β

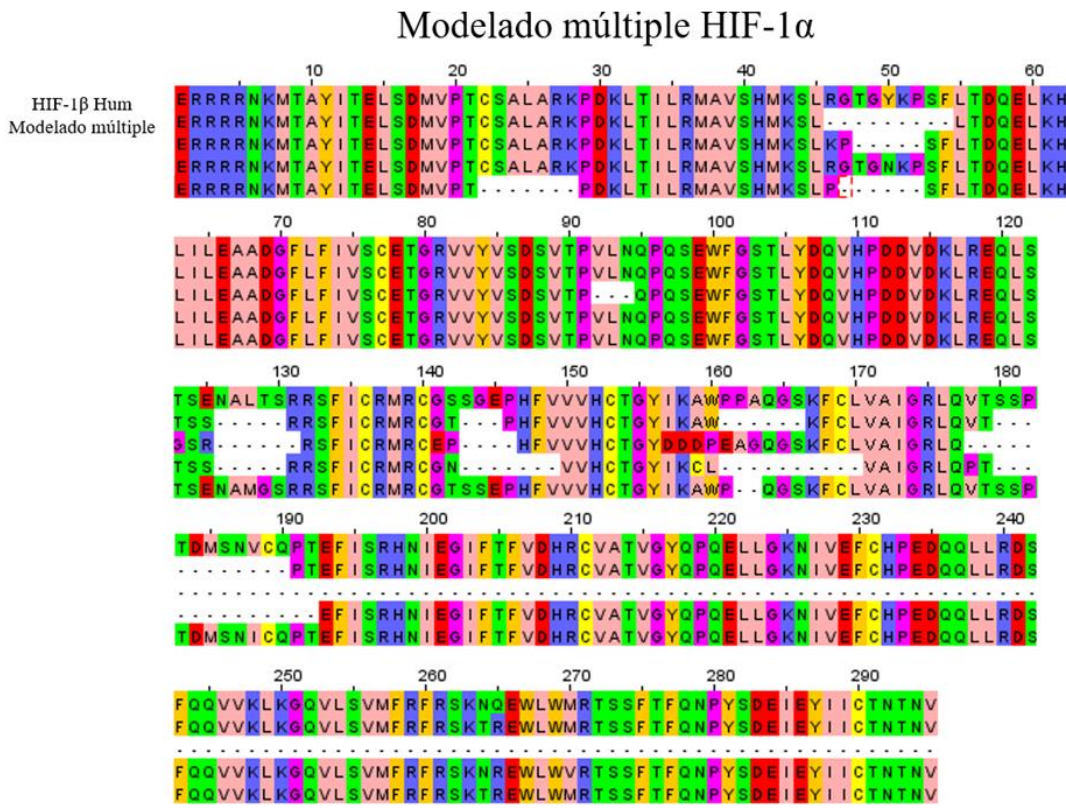
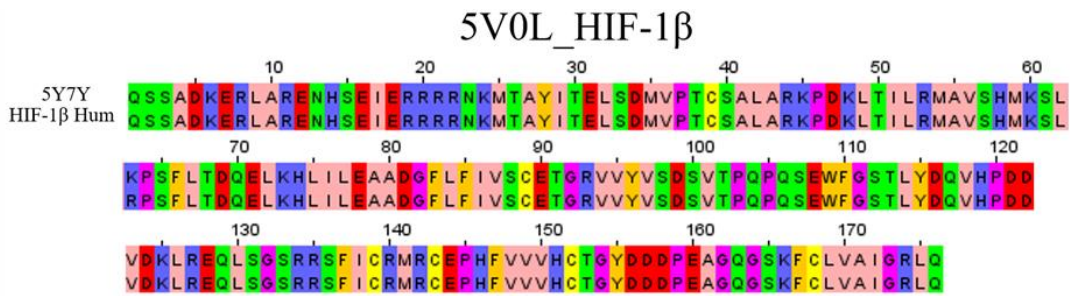


7V7L_HIF-1 β



5Y7Y_HIF-1 β





Alifático/hidrofóbico	I,L,V,A,M
Aromático	F,W,Y
Positivo	K,R,H
Negativo	D,E
Hidrofílico	S,T,N,Q
Conformación especial	P,G
Cisteína	C

Figura 17. Alineamiento por pares de la secuencia de aminoácidos de HIF-1 β de humano con la secuencia de aminoácidos de las estructuras de los *templates* 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y, 5V0L y el alineamiento múltiple. Se muestra el código de colores para representar a los aminoácidos y sus propiedades fisicoquímicas.

Los principales parámetros de puntuación de los alineamientos obtenidos por JalView son conservación y calidad. Por un lado el parámetro de conservación evalúa el número de aminoácidos que conservan las mismas propiedades fisicoquímicas por cada columna del alineamiento, siendo los residuos idénticos los que muestran el más alto puntaje, en este caso 11, mientras que el valor de 10 indica mutaciones donde las propiedades fisicoquímicas no han cambiado. Por ejemplo, en el alineamiento de 4ZP4/HIF-1 α en el aminoácido 60 se observa al ácido glutámico (D) y ácido aspártico (E), que si bien no son aminoácidos iguales, su propiedad fisicoquímica de ser ácidos es la misma (poseen carga negativa), asignando un valor de 10. Por otro lado, un puntaje de calidad alto sugiere que no hay mutaciones o que la mayoría de las mutaciones observadas son favorables. En este caso el valor asignado es a partir de cero.

En la **Tabla 5** se muestran los promedios de los parámetros de conservación y calidad que se obtuvieron en el alineamiento de las secuencias de los *templates* y las secuencias de las estructuras a modelar. Se observa que a pesar de que los valores de calidad no fueron altos, los promedios de conservación se encontraron dentro del intervalo entre 10 y 11, lo que indica que si bien hubo mutaciones, las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos se conservaron.

Tabla 5. Parámetros de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las estructuras homólogas de HIF-1 α/β de humano obtenidas mediante el programa JalView.

	HIF-1 α				HIF-1 β				
	4ZP4	4ZPR	63ET	M_M	4ZP4	7V7L	5Y7Y	5V0L	M_M
Conservación	10.10	10.9	10.10	9.03	10.95	10.94	10.96	10.98	5.9
Calidad	0.39	0.24	0.39	1.65	0.15	0.15	0.082	0.02	2.5

5.2.2. Modelado por homología.

A partir de los archivos .pir que contienen todos los alineamientos de las secuencias objetivo contra las secuencias de los *templates* y del script .py que contiene las líneas de código necesarias, se construyen los modelos con el programa Modeller.

Las instrucciones relevantes que se escriben en la línea de código para la construcción de los modelos 3D por Modeller son:

1. La generación de cinco estructuras por *template*.
2. Optimización de las moléculas con alto refinamiento.
3. Seleccionar la mejor estructura respecto al estadístico DOPE (Discrete Optimized Protein Energy).

La elección de estas tres instrucciones asegura que el número de estructuras indicadas (en este caso del 1 al 5) sean las de mayor calidad, además que el programa Modeller selecciona entre ellas a la estructura modelada con mayor calidad de acuerdo al mejor puntaje del estadístico DOPE (Discrete Optimized Protein Energy). Así, de las 55 estructuras modeladas sólo se seleccionó un modelo por cada *template*, ver **Tabla 6**. De esta forma se obtuvieron cuatro estructuras modeladas de HIF-1 α de humano (**Figura 18**) y cinco estructuras de HIF-1 β de humano (**Figura 19**), teniendo así los receptores necesarios para llevar a cabo el acoplamiento molecular con los inhibidores optimizados. En las **Tablas 7** y **8** se muestra la numeración correspondiente a los aminoácidos que conforman a cada dominio de cada estructura modelada de HIF-1 α y HIF-1 β , respectivamente.

Tabla 6. Puntaje estadístico DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) de las estructuras modeladas de HIF-1 α / β de humano obtenidas mediante el programa Modeller.

	HIF-1 α				HIF-1 β				
	4ZP4	4ZPR	63ET	M_M	4ZP4	7V7L	5Y7Y	5V0L	M_M
1	-31840.21	-28322.63	-30211.01	-29624.59	-27339.91	-14052.81	-25562.28	-29079.86	-28612.09
2	-31680.71	-28127.79	-30294.72	-29394.41	-27271.70	-14274.11	-25739.12	-29028.60	-25599.28
3	-31668.08	-28128.21	-29631.25	-29893.15	-26635.18	-14664.96	-25315.35	-29367.25	-28704.61
4	-31402.97	-28371.27	-29919.87	-29870.30	-27362.33	-14501.22	-25531.24	-29398.82	-28687.25
5	-31421.70	-27835.78	-30076.79	-28721.89	-27150.22	-14131.34	-25481.81	-29673.82	-28117.24

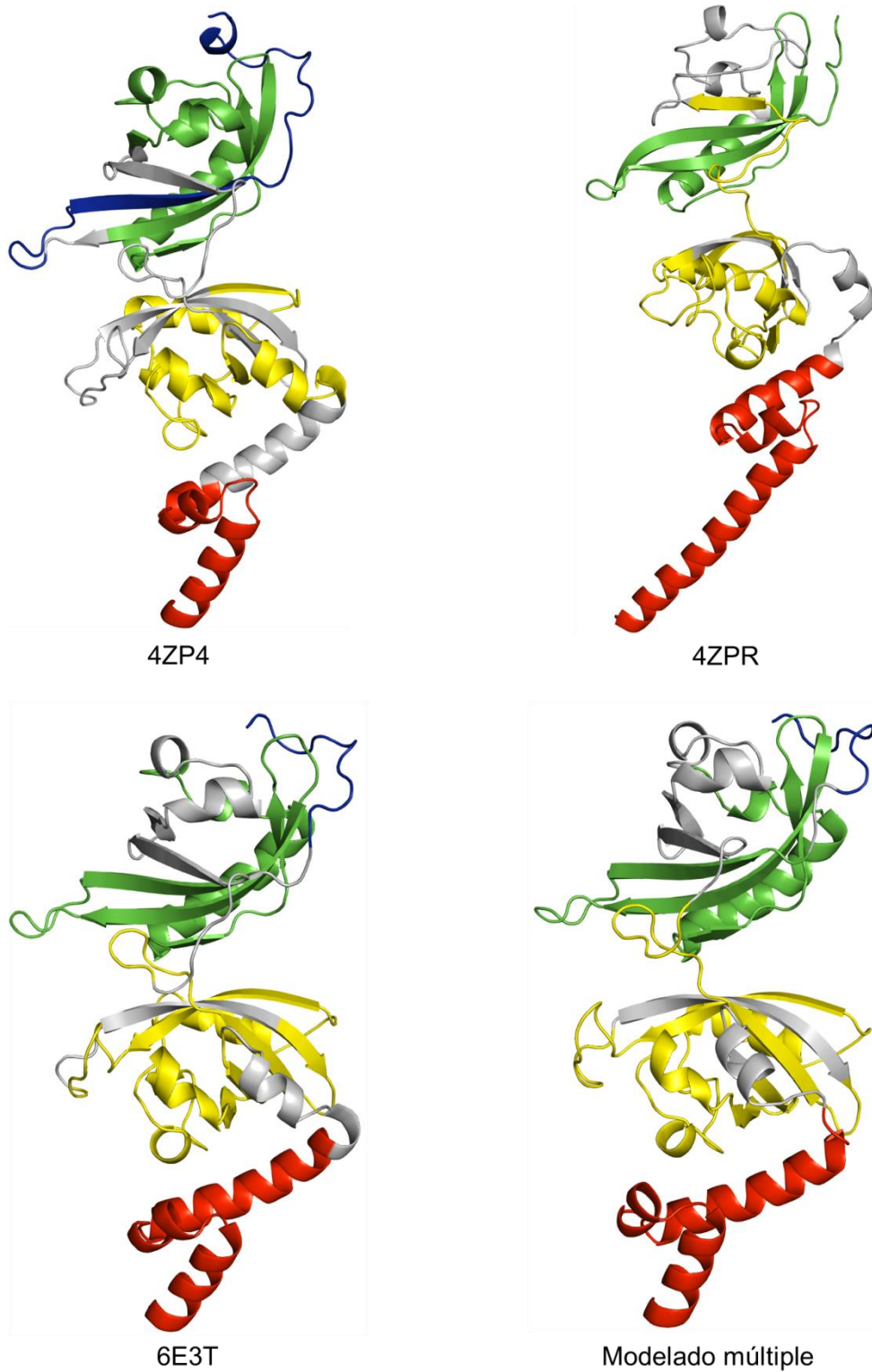


Figura 18. Estructuras homólogas de HIF-1 α de humano modeladas a partir de los *templates* 4ZP4, 4ZPR, 6E3T y con modelado múltiple.

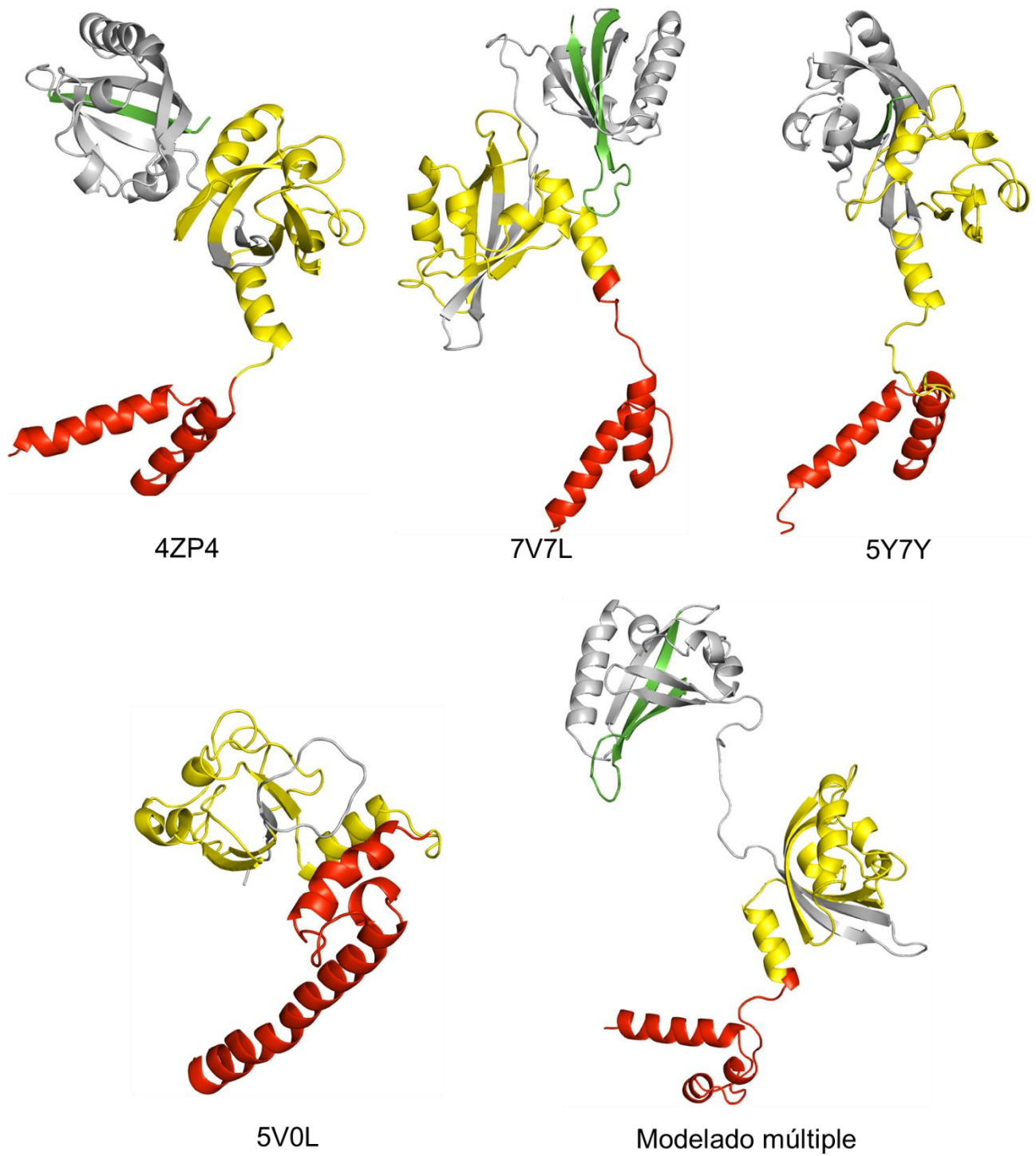


Figura 19. Estructuras homólogas de HIF-1 β de humano modeladas a partir de los *templates* 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y, 5V0L y con modelado múltiple.

Tabla 7. Dominios de las estructuras modeladas de la subunidad HIF-1 α .

	HIF-1 α	4ZP4	4ZPR	6E3T	M_M
Dominio bHLH	17-70	1-42	1-56	1-39	1-41
Dominio PAS-A	85-158 170-191	57-130 142-163	71-144 156-177	53-126 138-159	56-129 141-162
Zona inactiva	159-169	131-141	145-155	127-137	130-140
Dominio PAS-B	228-298	200-270	214-279	196-266	199-269
Dominio PAC	302-345	274-295	—	270-281	273-281

Tabla 8. Dominios de las estructuras modeladas de la subunidad de HIF-1 β .

	HIF-1 β	4ZP4	7V7L	5Y7Y	5V0L	M_M
Dominio bHLH	89-142	1-45	1-45	1-15	1-62	1-45
Dominio PAS-A	161-235	46-138	64-138	49-141	63-155	46-138
Dominio PAS-B	349-419	252-261	252-280	255-263	—	252-280

5.3. Acoplamiento molecular

5.3.1. Acoplamiento molecular con los *templates* 4ZP4, 4ZPR y 6E3T, y el *template* mixto de HIF-1 α

Los resultados de los acoplamientos moleculares de las estructuras modeladas de HIF-1 α con los distintos inhibidores se muestran en las **Figuras 20-23**, para 4ZP4, 4ZPR, 6E3T y el *template* mixto, respectivamente.

La estructura HIF-1 se encuentra conformada por la dimerización de las unidades α/β , estas estructuras se unen a través de los dominios PAS-A (85-158, 170-191) y PAS-B (228-298) con los que cuentan ambas estructuras. Para cada *template* modelado se usa la numeración correspondiente de los aminoácidos en cada dominio obtenida de los alineamientos como se muestra en la **Tabla 7**.

En la **Figura 20A1** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido del complejo HIF-1 α /4ZP4 con 0X3. Un aspecto importante es que en ambos acoplamientos se observan poses similares y el ligante se encuentra dentro del dominio de PAS-A (57-130 y 142-163) para 4ZP4, ver **Figura 18** y **Tabla 7** (color amarillo), indicando que se puede inhibir la

dimerización del complejo HIF-1. En la **Figura 20B1** del diagrama de interacciones 2D, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de tipo π - σ y π -alquilo con el aminoácido Val-63, de puente de hidrógeno con Tyr-74, de puente de halógeno y π -alquilo con Val-158 y π -alquilo con Ile-160. En el acoplamiento rígido, además de las interacciones π - σ y π -alquilo con Val-63 y de puente de hidrógeno con Tyr-74, se observa un puente de hidrógeno adicional con la Ser-76. En el acoplamiento semiflexible se obtiene una energía de interacción menor (-9.0 kcal/mol) respecto a la energía del acoplamiento rígido (-7.6 kcal/mol). Se observa una conformación similar del ligante 0X3 con algunos cambios conformacionales, con un valor de RMSD de 1.79 Å, ver **Figura 20C1**.

En la **Figura 20A2** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido con el ligante PT2385. Tanto en el acoplamiento semiflexible como en el rígido, el ligante está dentro de la región correspondiente a PAS-A (amarillo), mostrando que se puede llevar a cabo la inhibición de la formación del complejo HIF-1, aunque se obtuvieron poses diferentes. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 20B2**, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de puente de hidrógeno con Ser-76, mientras que en el acoplamiento rígido se observan interacciones de tipo π -alquilo con Leu-59, Val-63 y Ile-160. Estas interacciones le confieren una mejor energía de interacción a PT2385 en el acoplamiento rígido (-8.6 kcal/mol) respecto al acoplamiento semiflexible (-7.1 kcal/mol). La conformación del ligante dentro de HIF-1 α /4ZP4 presenta cambios, sobre todo en la orientación del grupo metilsulfonil. Esto se puede observar en el valor del RMSD de los ligantes en ambos acoplamientos (3.36 Å), mostrando diferencias conformacionales como se muestran en la **Figura 20C2**.

En la **Figura 20A3** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de HIF-1 α /4ZP4-PT2399. En este caso, las mejores poses en cada acoplamiento son idénticas y el ligante interactúa con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A (57-130 y 142-163) y PAS-B (200-270), ver **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 20B3**, se observan interacciones idénticas del ligante con los aminoácidos de la proteína. Existe una interacción de puente de hidrógeno con Arg-123 del dominio PAS-A, una interacción de puente de halógeno con Gln-236 y de tipo π -alquilo con Tyr-262 del dominio PAS-B. Se obtuvo una energía de interacción de -8.8 kcal/mol en ambos casos. El ligante no sufrió cambios

conformacionales en el acoplamiento semiflexible respecto al acoplamiento rígido y su valor de RMSD es de 0.00072 Å.

En la **Figura 20A4** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de HIF-1 α /4ZP4 con el ligante PT2977. Se observan poses diferentes, en el acoplamiento semiflexible, el ligante se encuentra dentro del dominio PAS-A, mientras que en el acoplamiento rígido interactúa con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 20B4**, se muestra que en el acoplamiento semiflexible existe una interacción de tipo π - σ con Val-63, dos interacciones de puente de hidrógeno con Ser-76 e His-152, y π -alquilo con Val-158 en el dominio PAS-A. Mientras que en el acoplamiento rígido se observan dos interacciones de puente de hidrógeno con Cys-126 y Val-144, una interacción de tipo puente de halógeno con Trp-142 y una interacción π -catión con Lys-143 en el dominio PAS-A, además de otra interacción de puente de halógeno con Gln-236 en el dominio PAS-B. En el acoplamiento semiflexible existen interacciones de tipo π - σ y π -alquilo respecto al acoplamiento rígido, proporcionando una energía más baja (-8.7 kcal/mol) que en el acoplamiento rígido (-7.9 kcal/mol). En la **Figura 20C4** se observa que el ligante tiene algunos cambios conformacionales con un valor de RMSD de 1.72 Å.

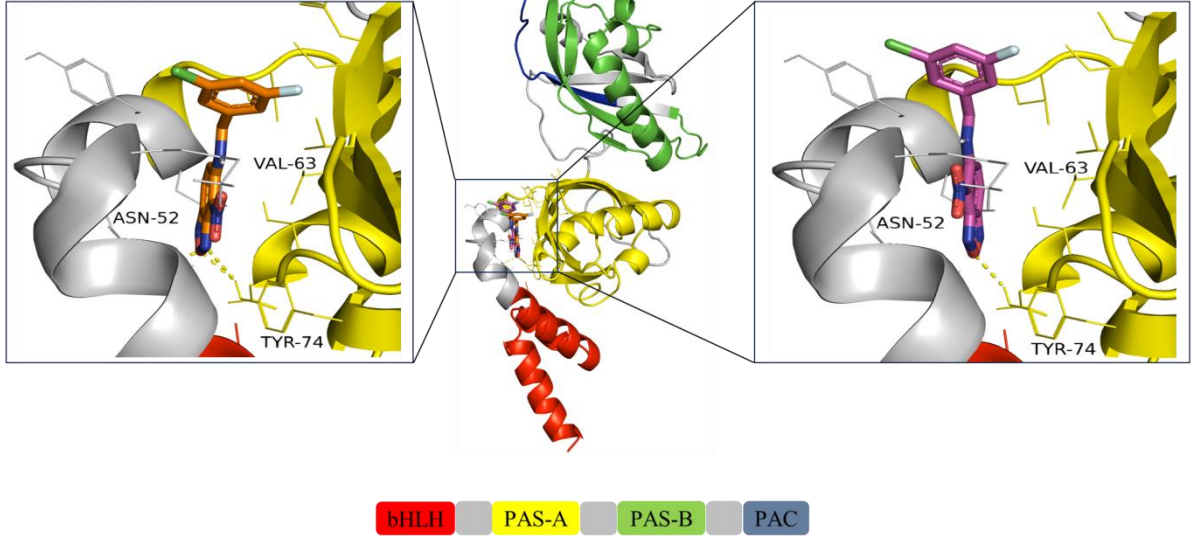
En general, de la **Figura 20** se puede observar que en los acoplamientos con HIF-1 α /4ZP4, los ligantes 0X3 y PT2385 interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A en ambos acoplamientos; y PT2399 y PT2977 interactuaron con ambos dominios, PAS-A y PAS-B, excepto PT2977 en el acoplamiento semiflexible. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de puente de hidrógeno, puente halógeno y π -alquilo. De los cuatro complejos con 4ZP4, se obtuvieron mejores energías de interacción con el acoplamiento semiflexible, excepto para el caso 4ZP4/PT2385. La mejor energía de interacción se obtiene en los complejos 4ZP4/0X3, 4ZP4/PT2399 y 4ZP4/PT2977 (-9.0, -8.8 y -8.7 kcal/mol), respectivamente, con acoplamiento semiflexible, y 4ZP4/PT2399 y 4ZP4-PT2385 (-8.8 y -8.6 kcal/mol), respectivamente, con acoplamiento rígido, como se observa en la **Tabla 9**.

HIF-1 α (4ZP4)/OX3

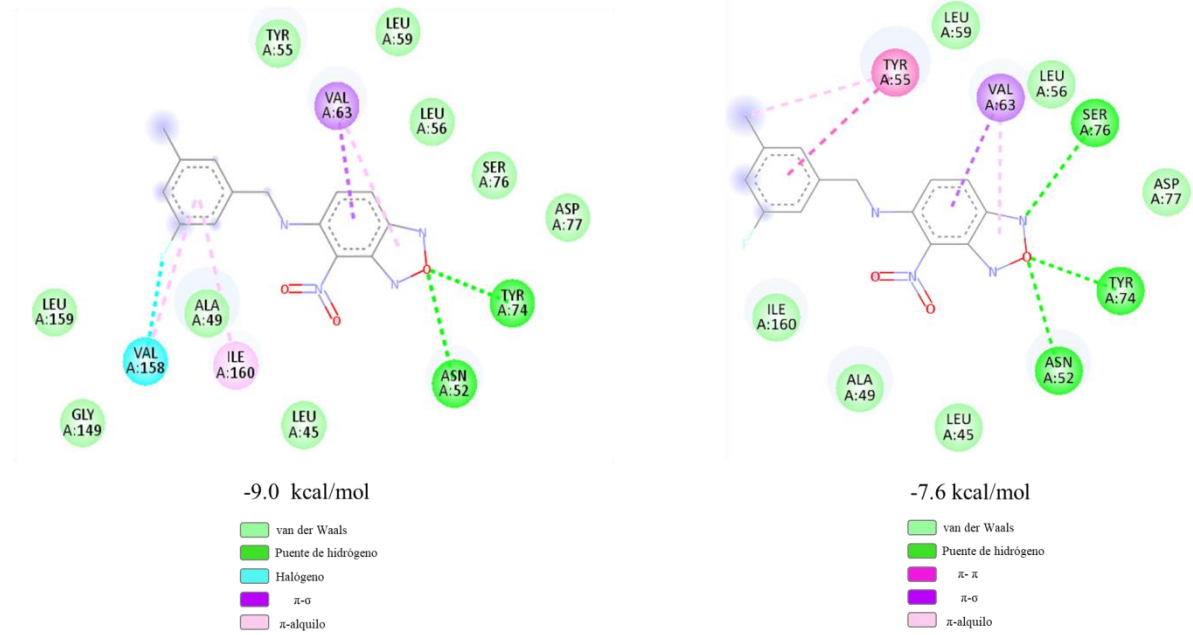
Semiflexible

Rígido

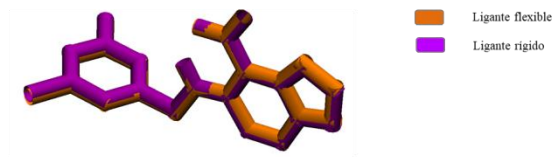
A1



B1



C1

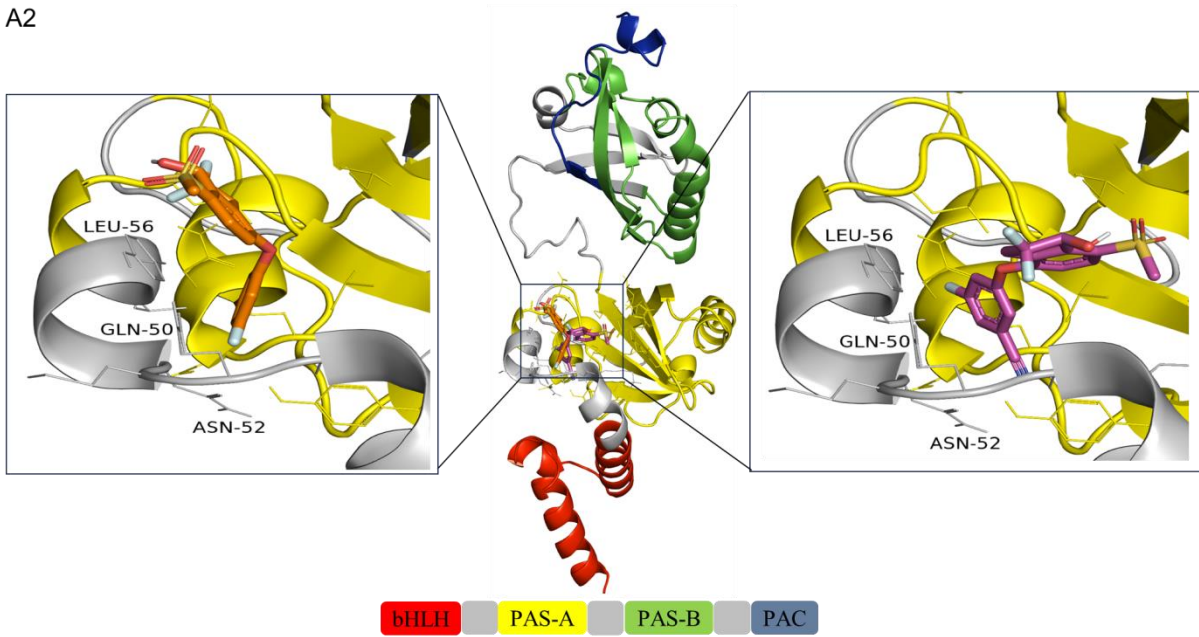


HIF-1 α (4ZP4)/PT2385

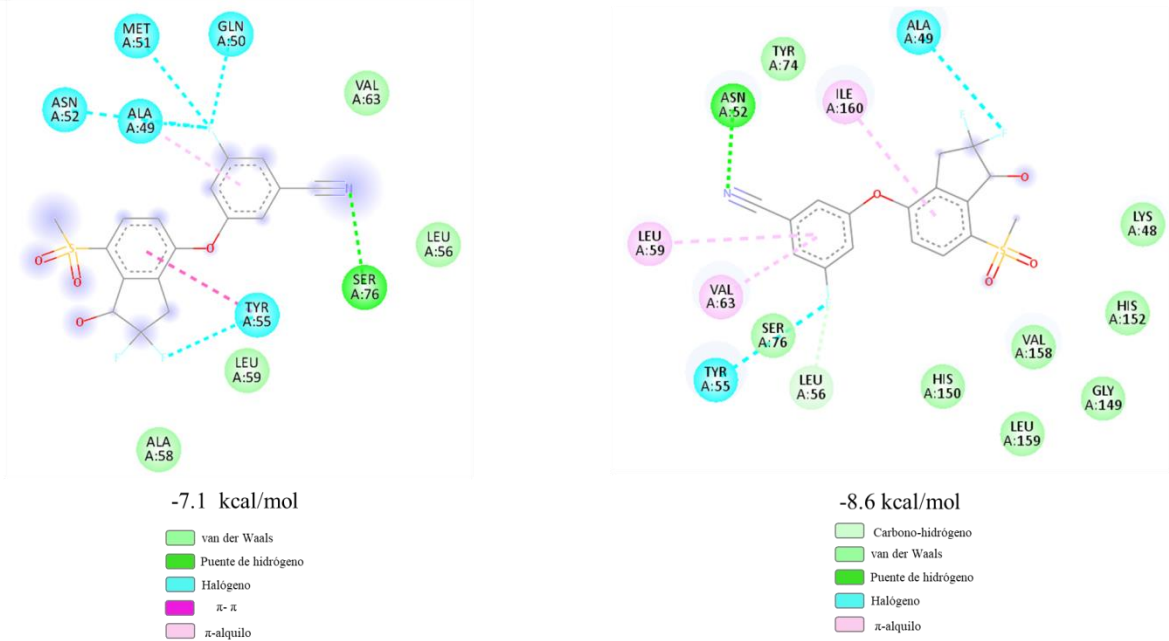
Semiflexible

Rígido

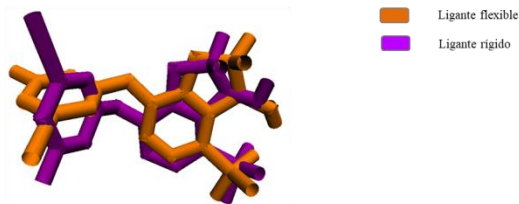
A2



B2

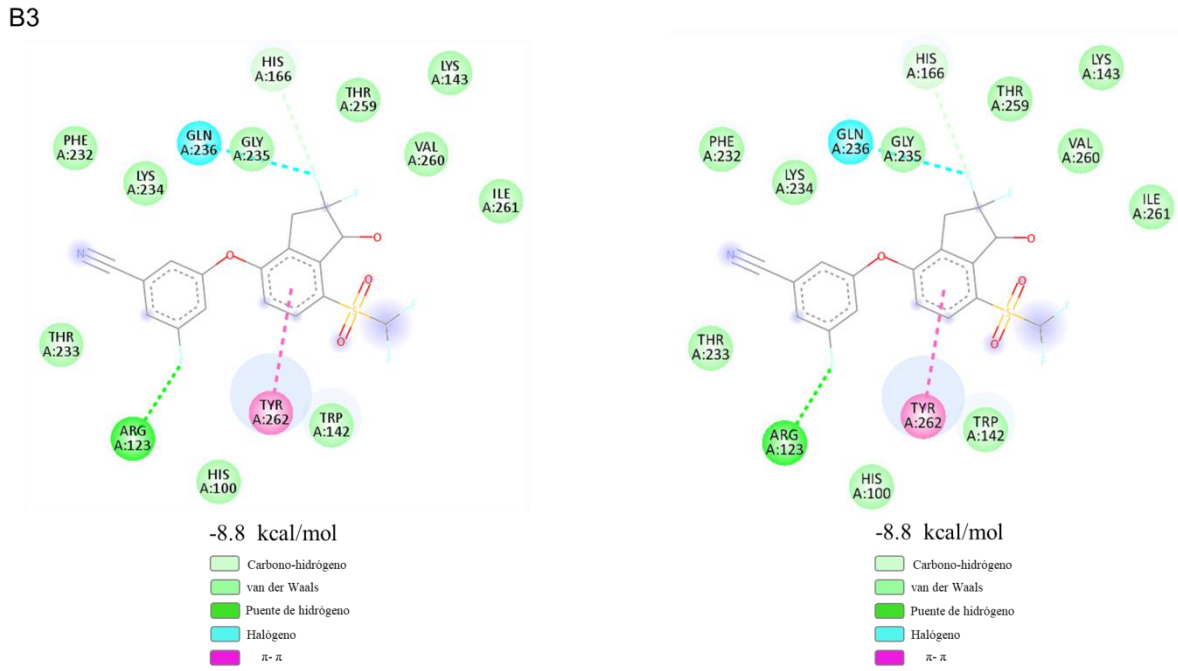
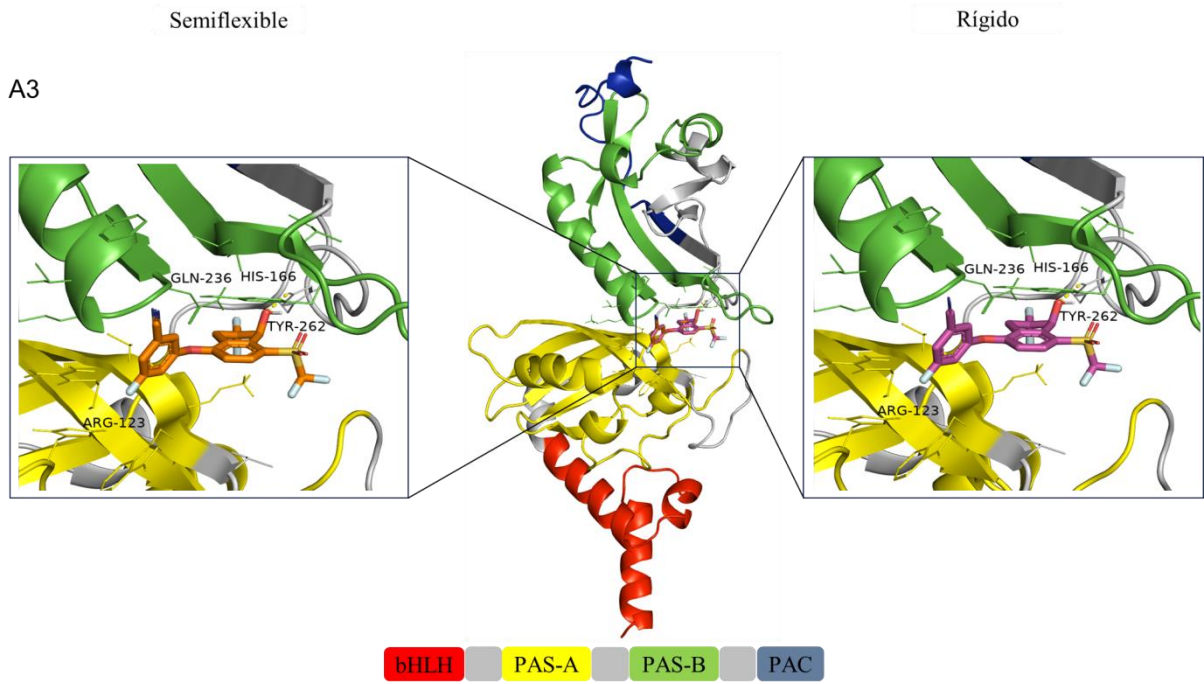


C2

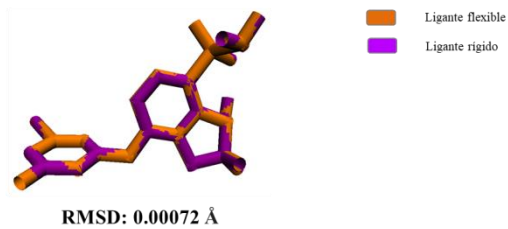


RMSD: 3.36 Å

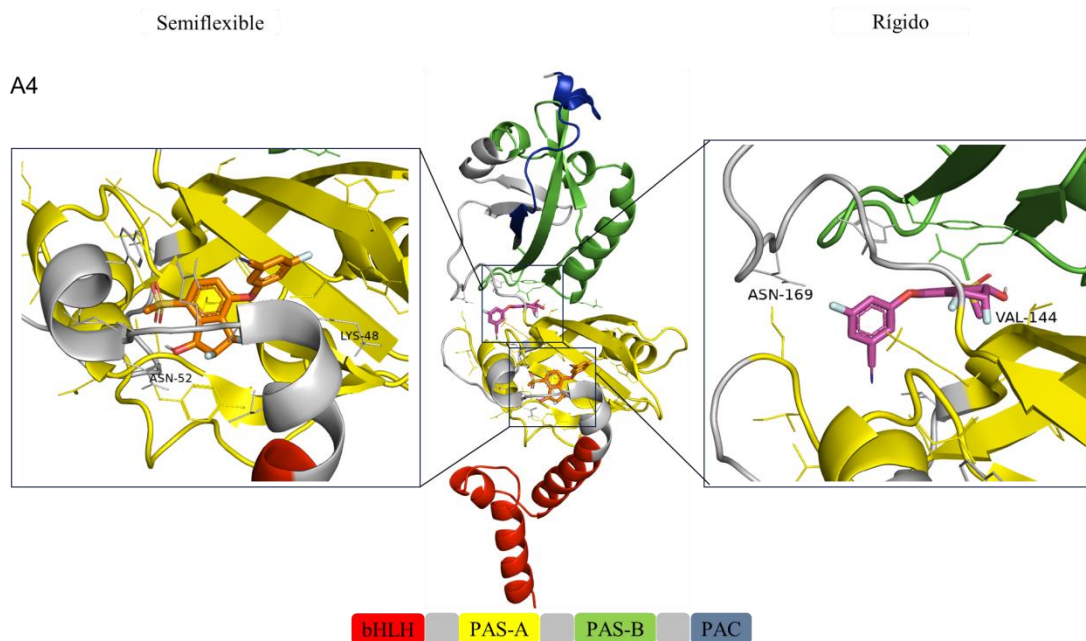
HIF-1 α (4ZP4)/PT2399



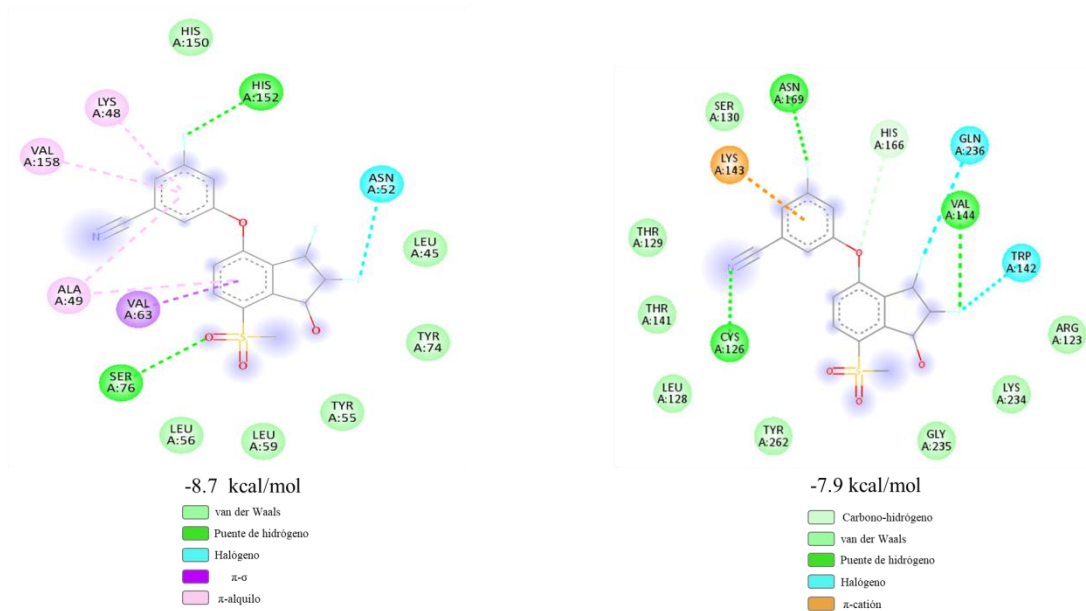
C3



HIF-1 α (4ZP4)/PT2977



B4



C4



■ Ligante flexible
■ Ligante rígido

RMSD: 1.72 Å

Figura 20. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el *template* 4ZP4.

En la **Figura 21A1** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de 0X3 con HIF-1 α /4ZPR. Se puede observar que aunque se obtienen poses diferentes en ambos acoplamiento, con la orientación de los sustituyentes halógeno (cloruro y fluoruro) de forma contraria, ambas se encuentran en el dominio de PAS-A (71-144 y 156-177) para 4ZPR, ver **Figura 18** y **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 21B1**, se observa que en el acoplamiento semiflexible existen interacciones de tipo π -alquilo con Val-71, Val-73 y Val-157. Mientras que en el acoplamiento rígido se observan interacciones de tipo π - π con Tyr-82 y las mismas interacciones π -alquilo con Val-71, Val-73 y Val-157 que en el acoplamiento semiflexible. Estas diferencias en las interacciones no les confiere un cambio de energía de interacción significativa, ya que ambas energías son prácticamente la misma, con una diferencia de sólo -0.1 kcal. El RMSD del ligante tiene un valor de 1.63 Å, indicando que las conformaciones del ligante son similares con ligeros cambios conformacionales, como se observa en la **Figura 21C1**.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 α /4ZPR se muestran en la **Figura 21A2**. Se puede observar que se obtienen poses diferentes. Por un lado, en el acoplamiento semiflexible PT2385 se ubica dentro del dominio PAS-A (71-144 y 156-177), mientras que en el acoplamiento rígido interactúa con ambos dominios PAS-A (71-144 y 156-177) y PAS-B (214-279), ver **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 21B2**, se observa que en el acoplamiento semiflexible existe una interacción π - π con Tyr-82 y π -alquilo con Val-157 en PAS-A. Por otro lado, en el acoplamiento rígido se observa una interacción de tipo π - π con His-108 y π -catión con Arg-128 del dominio PAS-A y dos interacciones de puente de hidrógeno con Gln-229 y Tyr-255 del dominio PAS-B. Estas interacciones le confieren al acoplamiento rígido una mejor energía de interacción ligeramente menor (de -8.7 kcal/mol) respecto a -8.4 kcal/mol del acoplamiento semiflexible. En la **Figura 21C2** se observan estructuras diferentes del ligante PT2385, con un RMSD de 3.36 Å.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con HIF- α /4ZPR se muestran en la **Figura 21A3**. Se observa que tienen poses idénticas en ambos acoplamiento, con el ligante interactuando con el dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 21B3** se observan interacciones idénticas. Se observan dos interacciones de tipo π -alquilo

con Val-71 y Val-157, y una interacción de puente de halógeno con Leu-158. Se obtiene la misma energía de acoplamiento en ambos casos de -9.8 kcal/mol. En la **Figura 21C3** se observa que la conformación de PT2399 no sufre cambios conformacionales y se obtiene un valor de RMSD de 0.00072Å.

En la **Figura 21A4** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 α /4ZPR. Igual que en el caso anterior, se obtienen poses idénticas en ambos acoplamientos. En ambos casos, la interacción de PT2977 se lleva a cabo con aminoácidos de los dos dominios, PAS-A y PAS-B. En la **Figura 214B**, en el diagrama de interacciones 2D, en ambos casos se observan una interacción de tipo π - π con His-108 de PAS-A. También se observan tres interacciones de puente de hidrógeno con Gln-229 y Tyr-255 de PAS-B en el acoplamiento semiflexible y dos en el acoplamiento rígido con los mismos aminoácidos. La diferencia en la energía de interacción es de sólo 0.1 kcal/mol. En la **Figura 214C**, se obtuvo un valor de RMSD de 0.00067Å, debido a que no hay cambios conformacionales en el ligante.

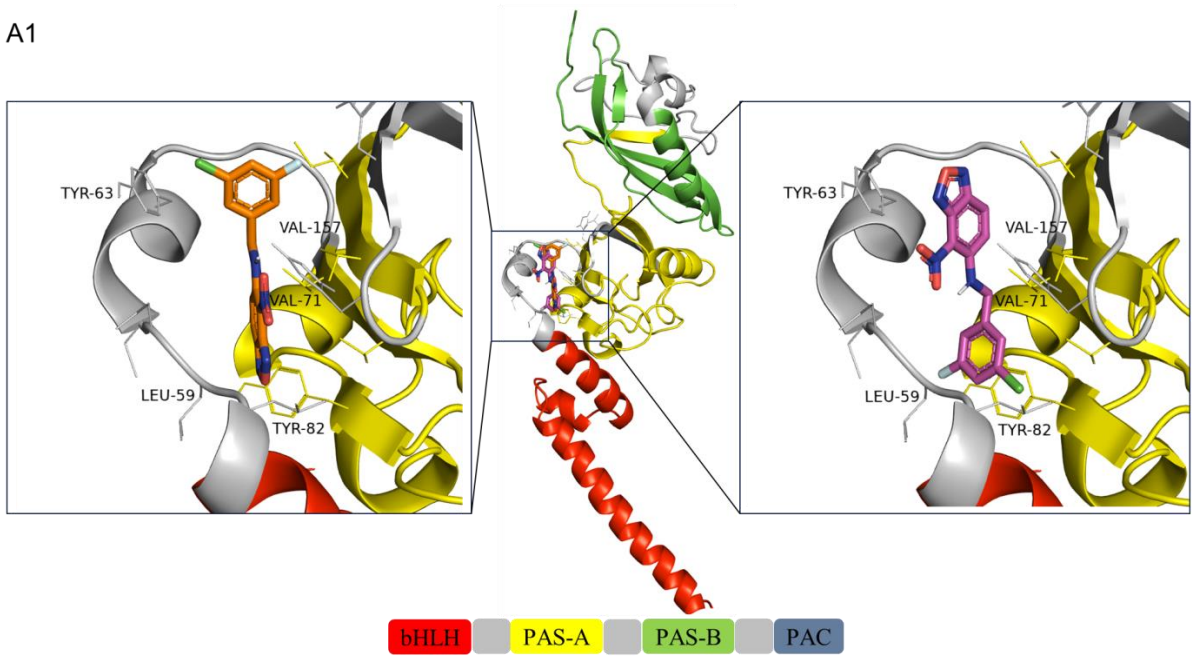
En general, de la **Figura 21** se puede observar que en los acoplamientos con HIF-1 α /4ZPR, todos los ligantes interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A en ambos acoplamientos; y PT2977 en ambos acoplamientos y PT2385 en el acoplamiento rígido, con ambos dominios PAS-A y PAS-B. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de tipo π - π y π -alquilo, de puente de hidrógeno para PT2385 y PT2977, y de puente de halógeno para PT2399. En los cuatro complejos con 4ZPR, se obtuvieron energías de interacción similares con ambos acoplamientos. La mejor energía de interacción se obtuvo en el complejo 4ZPR-PT2399 en ambos acoplamientos (-9.8 kcal/mol), como se observa en la **Tabla 9**.

HIF-1 α (4ZPR)/OX3

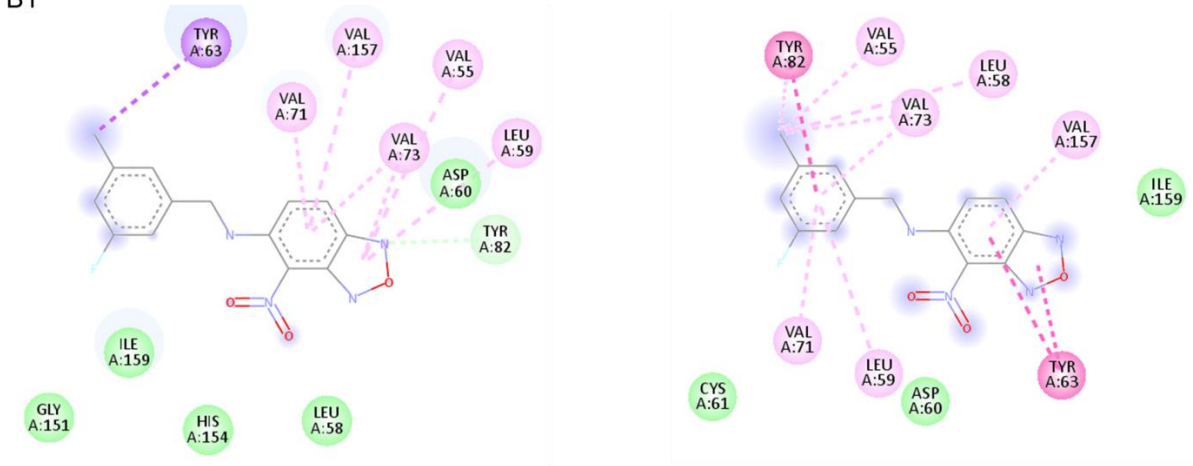
Semiflexible

Rígido

A1



B1



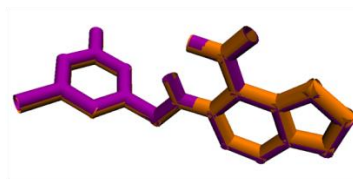
-8.4 kcal/mol

- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- π - σ
- π -alquilo

-8.5 kcal/mol

- van der Waals
- π - π
- alquilo
- π -alquilo

C1



RMSD: 1.63 Å

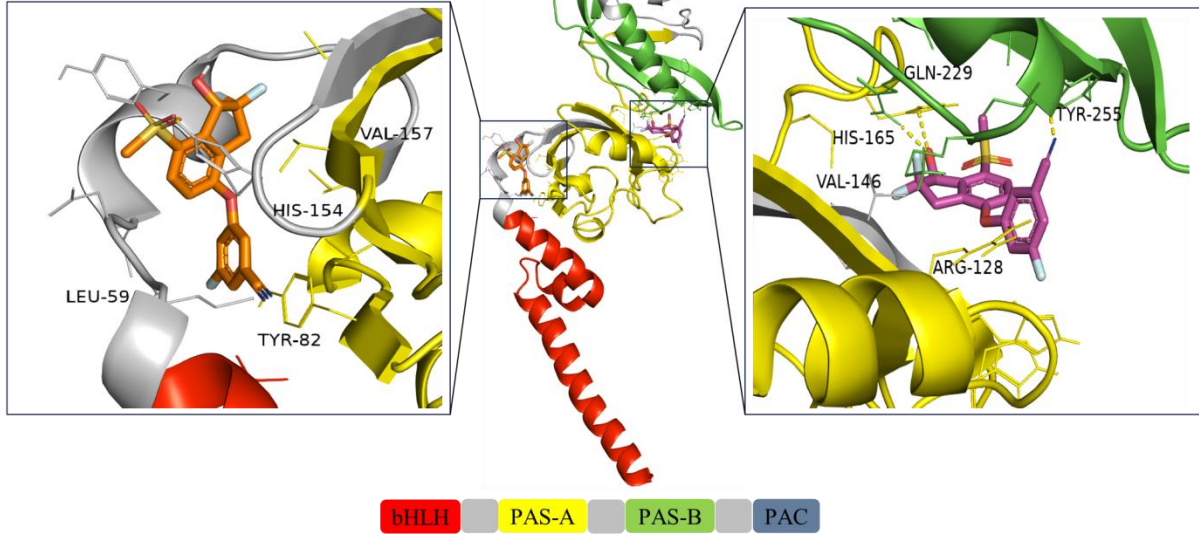
- Ligante flexible
- Ligante rígido

HIF-1 α (4ZPR)/PT2385

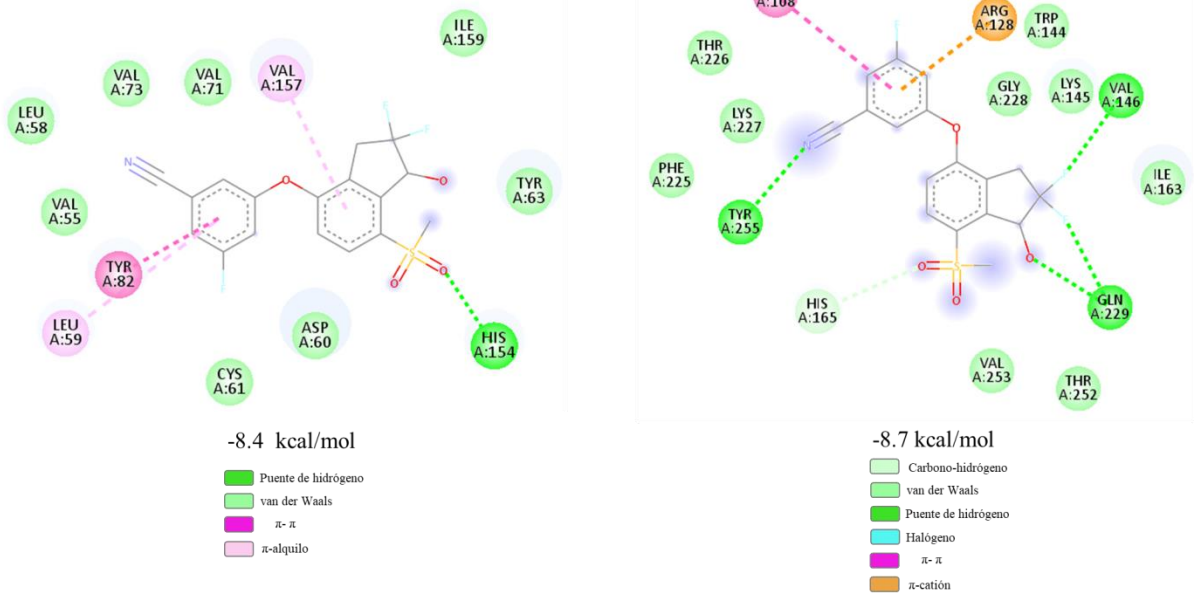
Semiflexible

Rígido

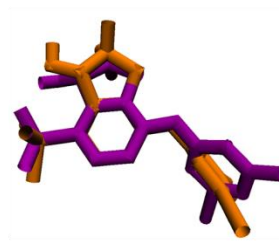
A2



B2



C2



RMSD: 3.36 Å

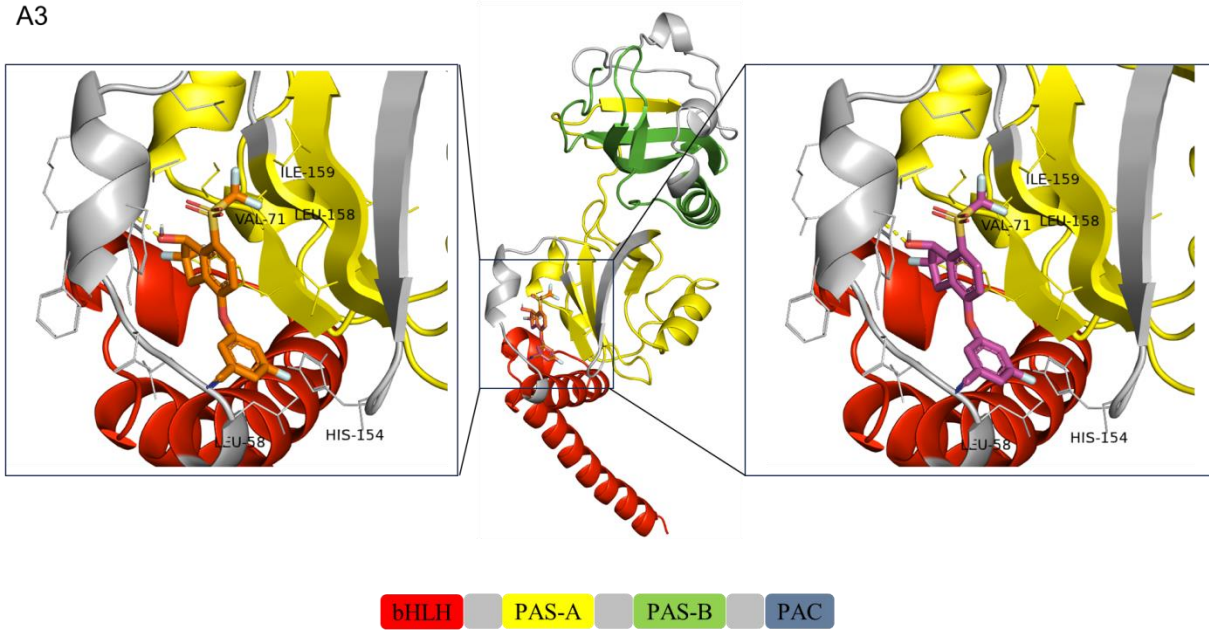
Ligante flexible
Ligante rígido

HIF-1 α (4ZPR)/PT2399

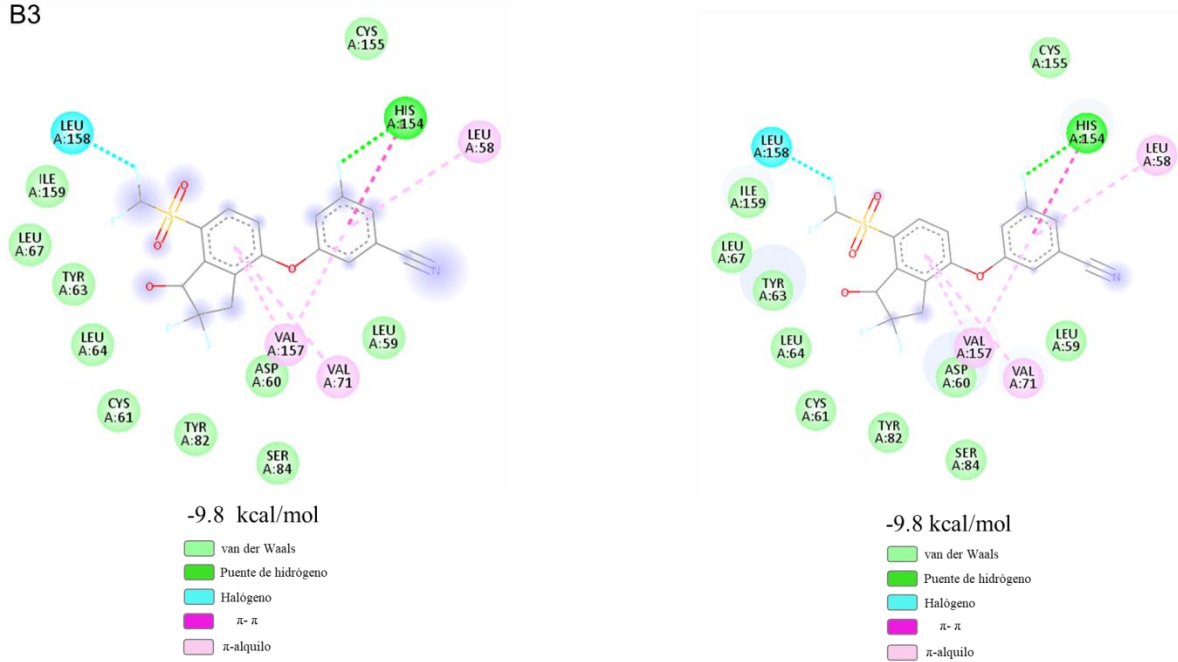
Semiflexible

Rígido

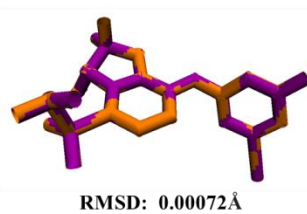
A3



B3



C3



■ Ligante flexible
■ Ligante rígido

Los acoplamientos semiflexible y rígido de OX3 con HIF-1 α /6E3T se muestran en la **Figura 22A1**. Se observan poses idénticas y el ligante se posiciona dentro del dominio de PAS-A (53-126 y 138-159) para 6E3T, en ambos casos, ver **Figura 18** y **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 22B1**, se observa únicamente una interacción de tipo π -alquilo con Pro-154. También existe una interacción desfavorable donador-donador con Asn-158 en el dominio de PAS-A. La energía de acoplamiento es de -8.2 kcal/mol en ambos casos. La **Figura 22C1** muestra que no hubo cambios conformacionales en el ligante, obteniendo un valor de RMSD de 0.00068 Å.

En la **Figura 22A2** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 α /6E3T. Se obtienen poses diferentes dentro del dominio de PAS-A. En la **Figura 22B2** del diagrama de las interacciones 2D, se observa en el acoplamiento semiflexible interacciones π -alquilo con Pro-152 y Pro-154, y de puente de hidrógeno con Asn-158. Mientras que en el acoplamiento rígido se observan interacciones de puente de hidrógeno con Lys-73, Tyr-74 y Asn-158, y un puente de halógeno con Ile-153. Estas interacciones adicionales de puente de hidrógeno y de halógeno le confieren al acoplamiento rígido una energía de interacción mejor de -9.1 kcal/mol, respecto al acoplamiento semiflexible con energía de interacción -8.1 kcal/mol. En la **Figura 22C2** se muestran varias diferencias conformacionales en el ligante, con un valor de RMSD de 2.28 Å.

Los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 α /6E3T se muestran en la **Figura 22A3**. Las mejores poses son idénticas para ambos acoplamientos y sitúan al ligante interactuando ambos dominios, PAS-A (53-126 y 138-159) y PAS-B (196-266), ver **Tabla 7**. En el diagrama de las interacciones 2D de la **Figura 22B3**, se observan dos interacciones de puente de halógeno con Leu-119 y Asn-158, y un puente de hidrógeno con His-155 en el dominio de PAS-A, mientras que en el dominio de PAS-B se observa un puente de halógeno con Val-249. La energía de acoplamiento es de -9.5 y -9.4 kcal/mol, para el acoplamiento semiflexible y rígido, respectivamente. La conformación del ligante se mantiene sin sufrir cambios conformacionales con un valor de RMSD de 0.00066 Å, como se muestra en la **Figura 22C3**.

En la **Figura 22A4** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 α /6E3T. Las mejores poses son diferentes en ambos casos, con el ligante orientado de forma

diferente, sobre todo en la disposición del grupo metilsulfonil. Ambas poses se encuentran dentro del dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 22B4**, se observa que en el acoplamiento semiflexible hay interacciones de tipo puente de hidrógeno con Lys-73 y Tyr-74, de puente de halógeno con Ile-153, y de tipo π -alquilo con Pro-154. Mientras que en el acoplamiento rígido son de tipo π - π con Tyr-74, de puente de halógeno con Lys-73 y Pro-152, de puente de hidrógeno con Ser-121 y π -alquilo con Pro-154. La diferencia de energía es únicamente de -0.5 kcal/mol, con -9.1 kcal/mol en el acoplamiento semiflexible y -8.6 kcal/mol en el acoplamiento rígido. En la **Figura 22C4** se observan ligeros cambios conformacionales de PT2977, con un valor de RMSD de 1.82 Å.

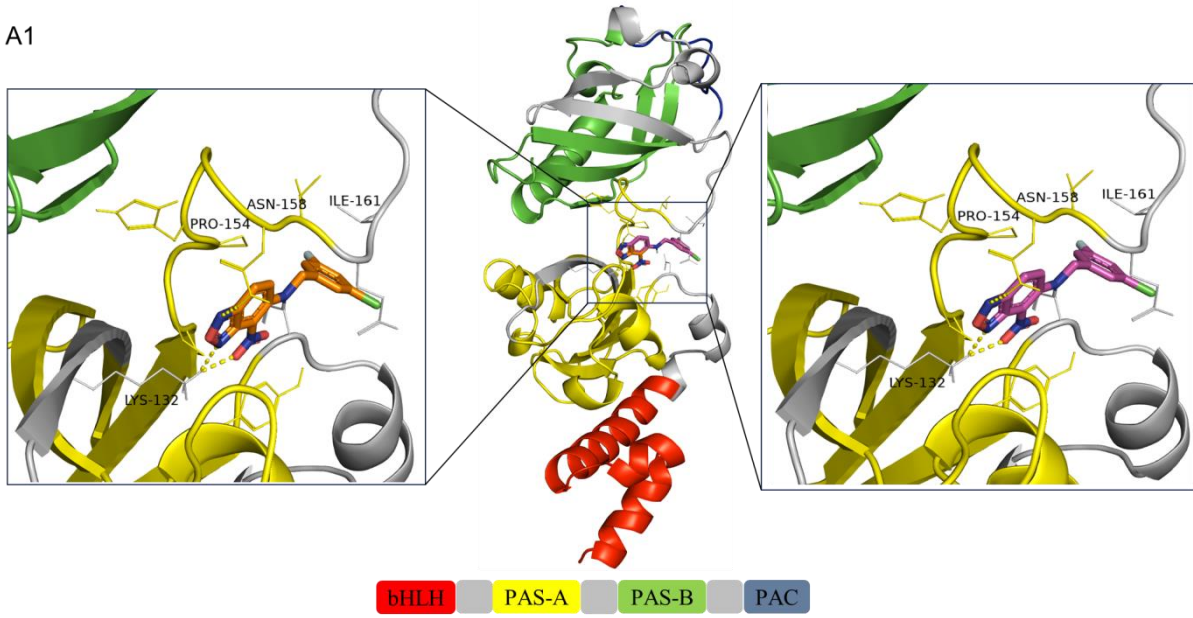
En general, de la **Figura 22** se puede observar que en los acoplamientos con HIF-1 α /6E3T, los ligantes 0X3, PT2385 y PT2977 interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A en ambos acoplamientos, mientras que PT2399 interactuó con ambos dominios, PAS-A y PAS-B en los dos acoplamientos semiflexible y rígido. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de tipo π -alquilo, y de puente de hidrógeno y de halógeno excepto para 0X3. En los complejos con 6E3T las energías de interacción fueron variables para ambos acoplamientos. La mejor energía de interacción se obtuvo en los complejos 6E3T-PT2399 (-9.5 y 9.4 kcal/mol) en ambos acoplamientos, 6E3T-PT2385 (-9.1 kcal/mol) y 6E3^oT-PT2977 (-9.1 kcal/mol), con acoplamiento rígido y semiflexible, respectivamente, como se observa en la **Tabla 9**.

HIF-1 α (6E3T)/OX3

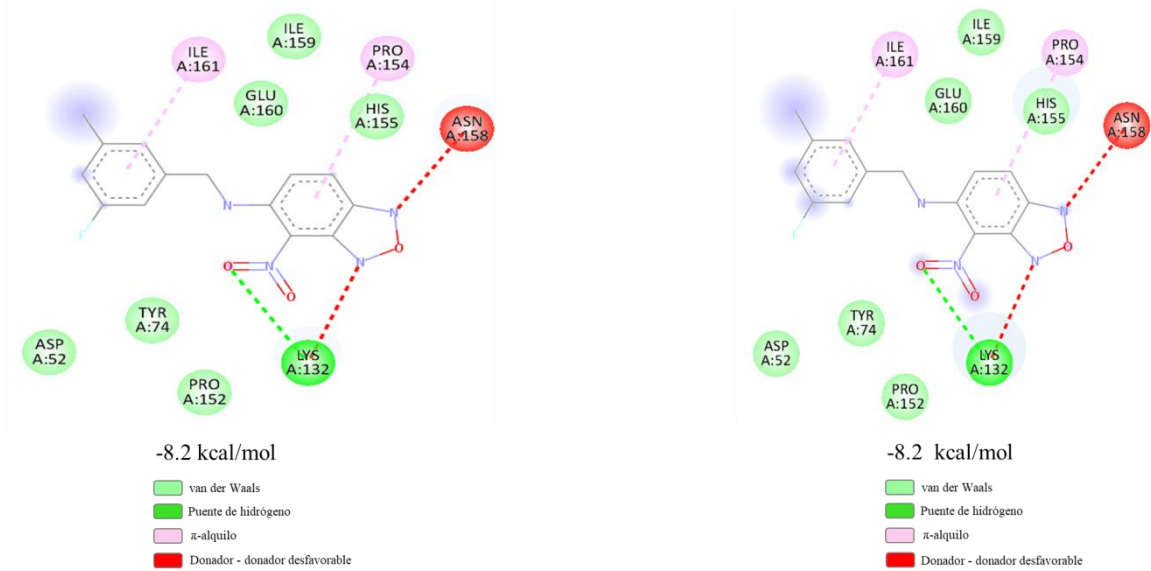
Semiflexible

Rígido

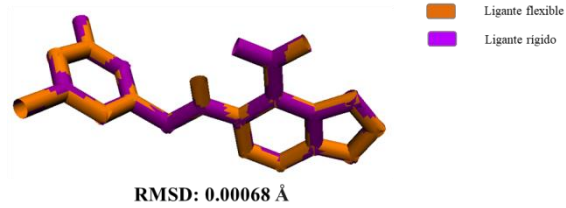
A1



B1



C1

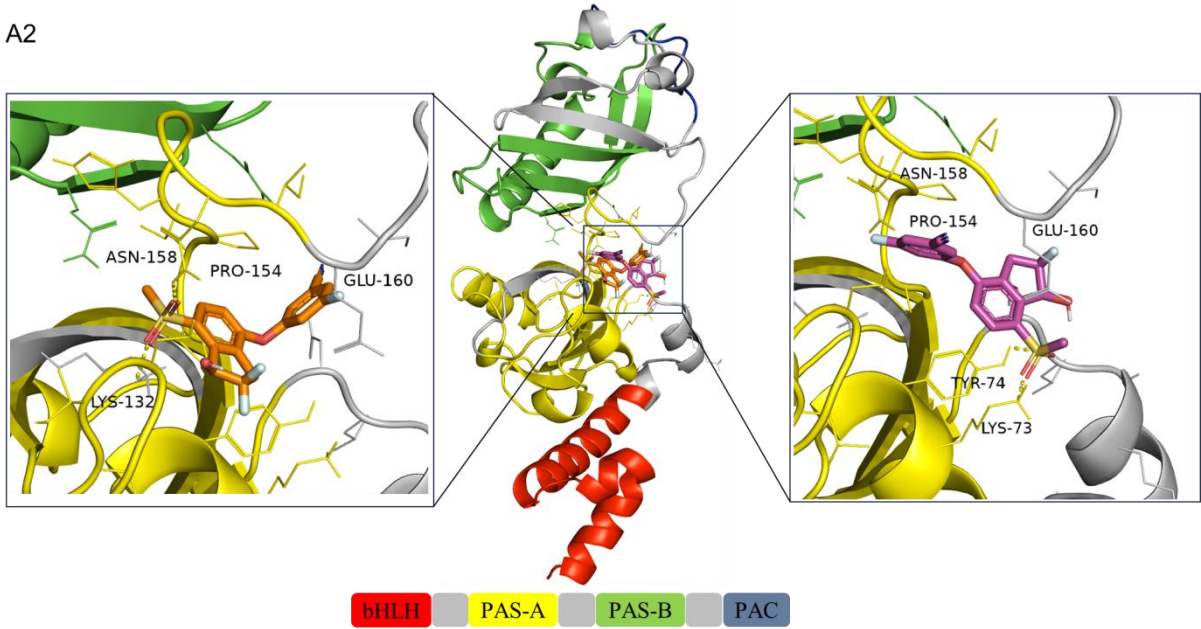


HIF-1 α (6E3T)/PT2385

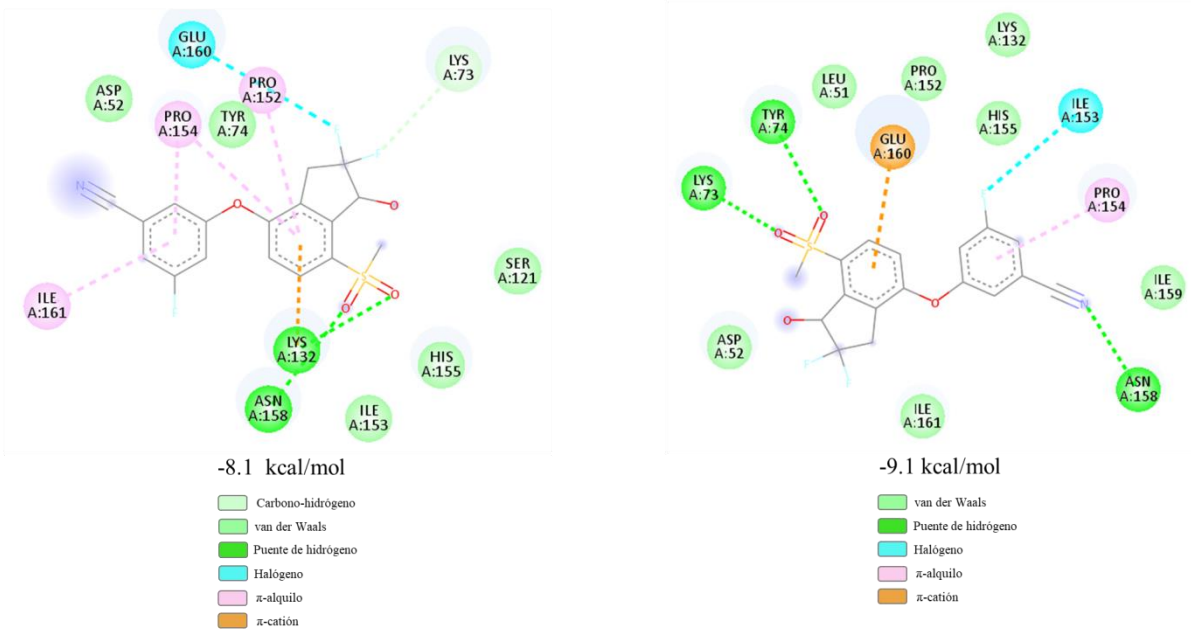
Semiflexible

Rígido

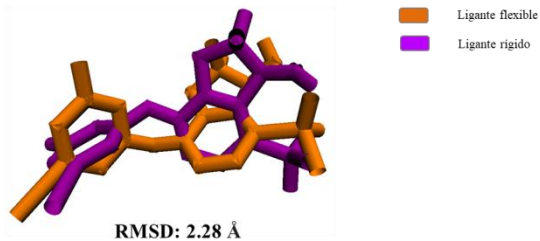
A2



B2



C2

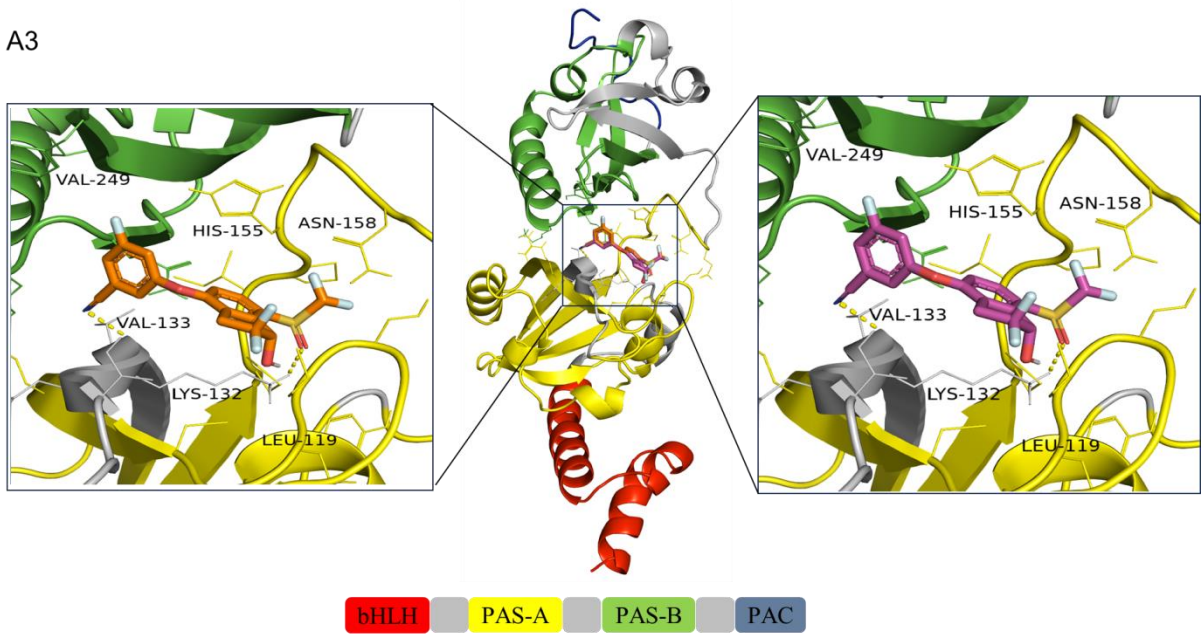


HIF-1 α (6E3T)/PT2399

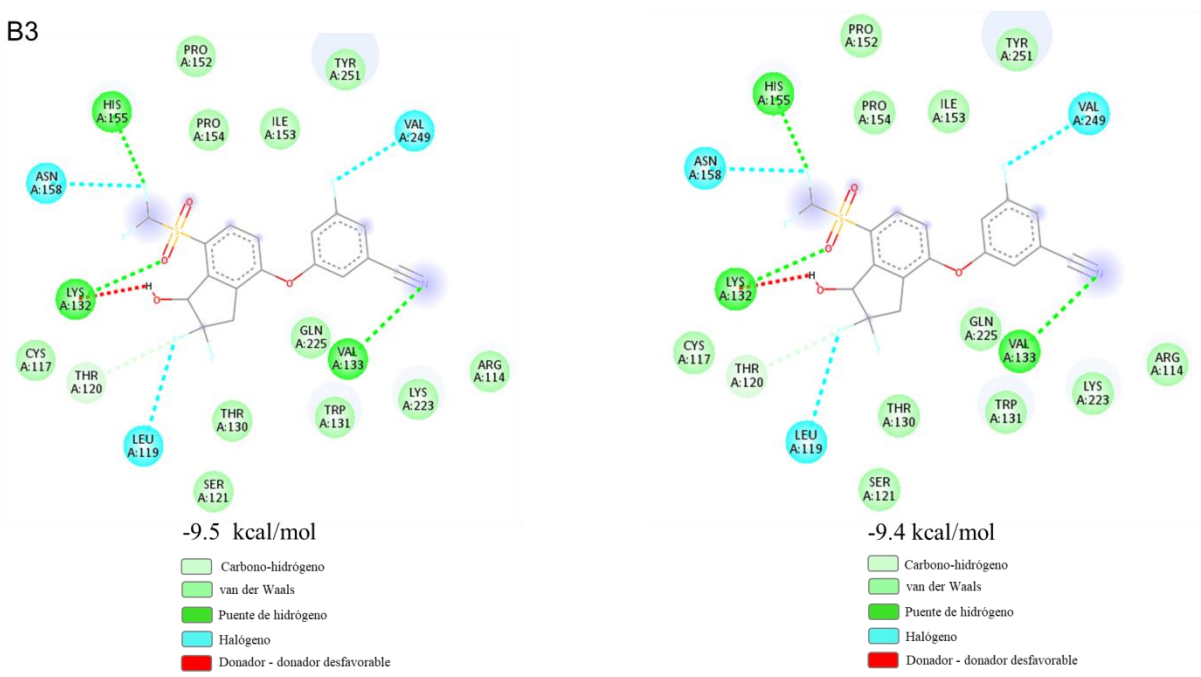
Semiflexible

Rígido

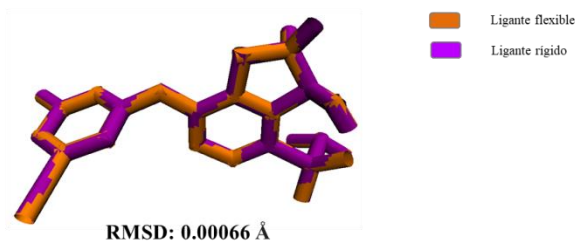
A3



B3



C3



Los acoplamientos semiflexible y rígido de OX3 con HIF-1 α M_M del modelado múltiple se muestran en la **Figura 23A1**. Se obtienen diferentes poses con el grupo cloro del grupo clorofluorofenilo del OX3 en posiciones contrarias en ambos acoplamientos. En el acoplamiento semiflexible la pose caen en la región del dominio de PAS-A (56-129 y 141-162), mientras que en el acoplamiento rígido también se observa interacción en el dominio de PAS-B (199-269) para el modelado múltiple, M_M, ver **Figura 18** y **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 23B1**, en el acoplamiento semiflexible se observan tres interacciones de tipo π -alquilo con Leu-119, Pro-152 y Pro-154, una única interacción de tipo π - π con Tyr-74 y un puente de halógeno con Asn-158. En el acoplamiento rígido se observan dos interacciones de tipo π -alquilo con Tyr-74 y Cys-117, el mismo puente de halógeno con Asn-158 y un puente de hidrógeno con His-155 en el dominio de PAS-A, mientras que en el dominio de PAS-B se observa otro puente de hidrógeno con Gln-225. La diferencia en la energía de interacción es de sólo -0.2 kcal/mol, con -7.8 y -8.0 kcal/mol, para el acoplamiento rígido y semiflexible, respectivamente. En la **Figura 23C1**, el valor de RMSD de 1.40Å indica que hubo ligeros cambios conformacionales del ligante.

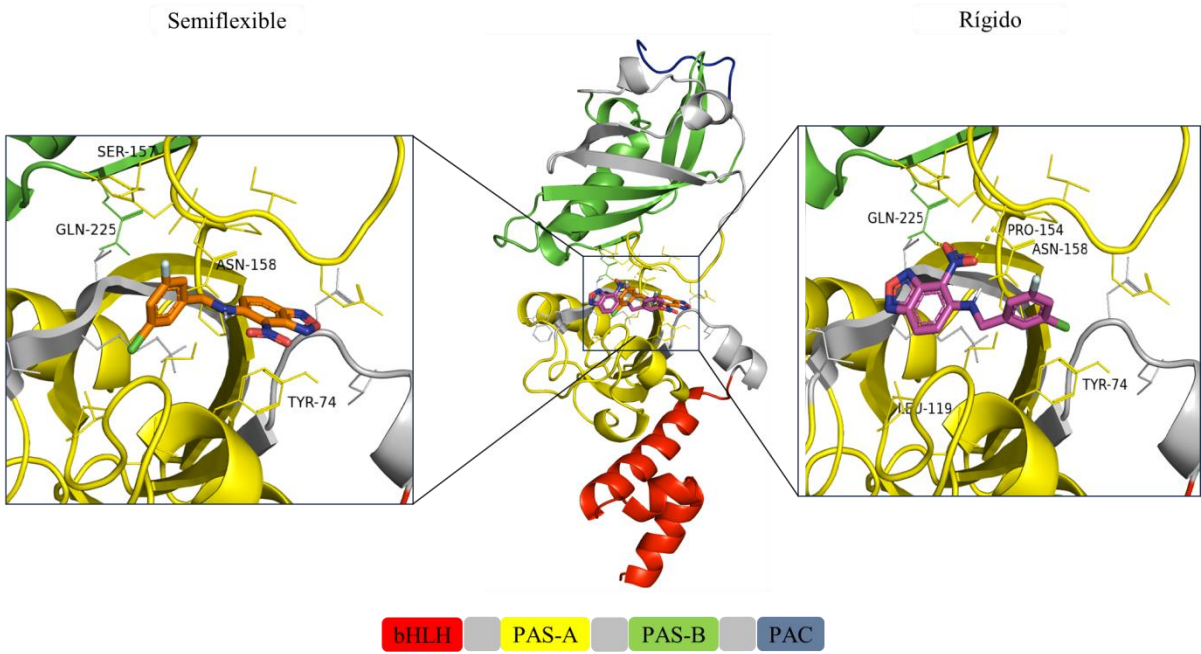
La **Figura 23A2** muestra los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 α M_M. Las mejores poses obtenidas son diferentes. En el acoplamiento semiflexible, el ligante interactúa con aminoácidos del dominio PAS-B (199-269), mientras que en el acoplamiento rígido, solamente lo hace con aminoácidos del dominio PAS-A (56-129 y 141-162), ver **Tabla 7**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 23B2**, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de puente de halógeno con Lys-223, una de puente de hidrógeno con Gln-225 y una interacción de tipo π - π en el dominio PAS-B. Mientras que en el acoplamiento rígido se muestran interacciones de tipo π -alquilo con Pro-154, dos puentes de halógeno con Ile-153 y Glu-160, y un puente de hidrógeno con Asn-158 en el dominio PAS-A. La mayor cantidad de interacciones de puente de halógeno en el acoplamiento rígido le confieren una mejor energía de interacción de -8.4 kcal/mol respecto al acoplamiento semiflexible con una energía de interacción de -7.4 kcal/mol. La **Figura 23C2** muestra que el ligante tiene conformaciones distintas en ambos acoplamientos, con un valor de RMSD de 1.79 Å.

Los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 α M_M se muestran en la **Figura 23A3**. En este caso las mejores poses obtenidas son idénticas. En ambos casos existe interacción del ligante con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 23B3**, se observan que las interacciones más relevantes son dos puentes de hidrógeno con Ser-121e His-155, y tres puentes de halógeno con Leu-119, Thr-120 y Asn-158, en el dominio PAS-A, mientras que en el dominio PAS-B se observa una interacción más de puente de halógeno con Val-249. La energía de interacción es de -9.3 y -9.2 kcal/mol para el acoplamiento semiflexible y rígido, respectivamente. La conformación del ligante no cambia, como se observa en la **Figura 23C3**, obteniéndose un valor de RMSD de 0.0 Å.

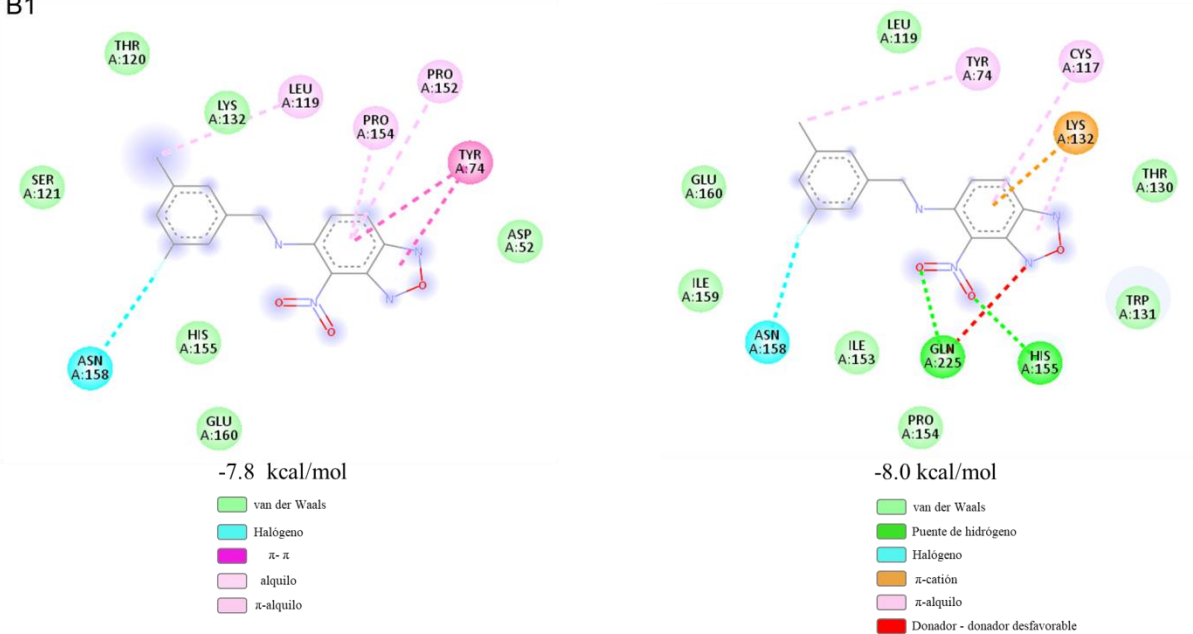
En el caso de los acoplamientos de PT2977 con HIF-1 α M_M mostrados en la **Figura 23A4**, al igual que para PT2399, son idénticas. En ambos acoplamientos las poses obtenidas están dentro del dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 23B4** se observan interacciones dos interacciones de tipo π -alquilo con Ile-161 y Pro-154, una interacción de puente de halógeno con Pro-152 y una interacción π -catión con Glu-160. La energía de interacción es de -8.5 kcal/mol. En la **Figura 23C4**, al igual para el ligante PT2399, no se observaron cambios conformacionales obteniéndose un valor de RMSD de 0.0 Å.

En general, de la **Figura 23** se puede observar que en los acoplamientos con el *template* del modelado múltiple, HIF-1 α /M_M, los ligantes 0X3 (semiflexible), PT2385 (rígido) y PT2977 (ambos) interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A, mientras que 0X3 (rígido) y PT2399 (ambos) lo hicieron con ambos dominios, y finalmente PT2385 (semiflexible) sólo interactuó con el dominio PAS-B. En todos los casos se observaron interacciones de puente de hidrógeno y halógeno, además de π -alquilo y π - π en algunos casos. En los complejos con el *template* de modelado múltiple se obtuvieron en la mayoría de los casos mejores energías de interacción para el acoplamiento rígido. La mejor energía de interacción se obtuvo en los complejos M_M-PT2399 (-9.3 y -9.2 kcal/mol) para los acoplamientos semiflexible y rígido, respectivamente, con interacciones de puente de hidrógeno y halógeno en ambos dominios, PAS-A y PAS-B, como se observa en la **Tabla 9**.

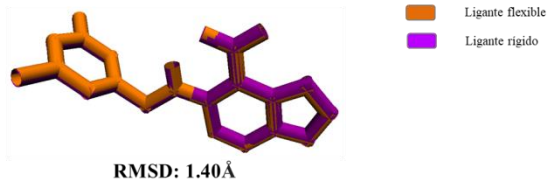
HIF-1 α (M_M)/0X3



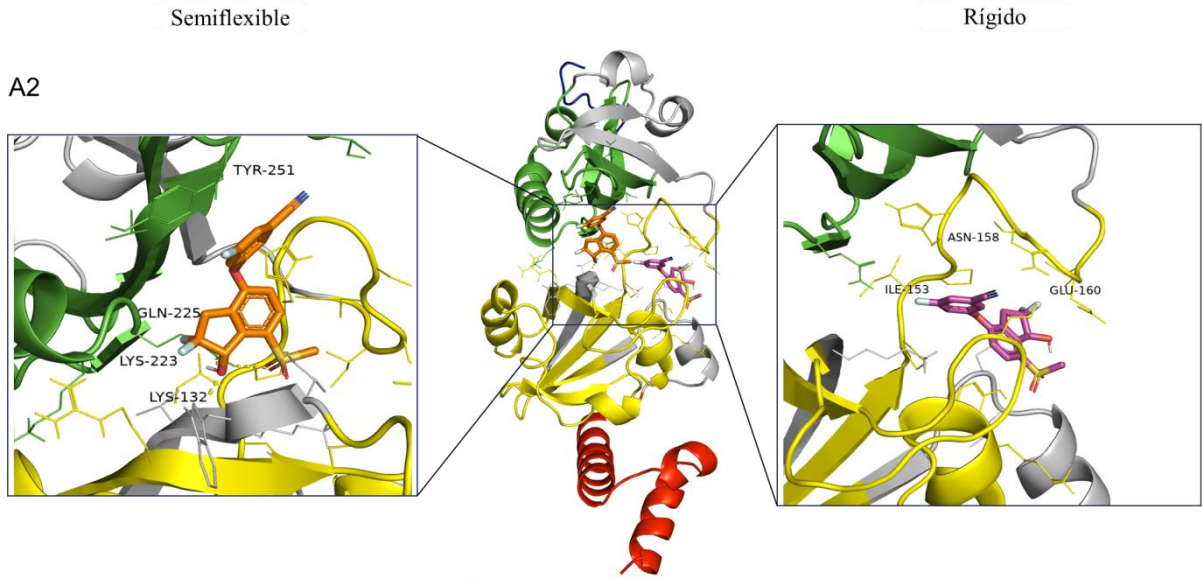
B1



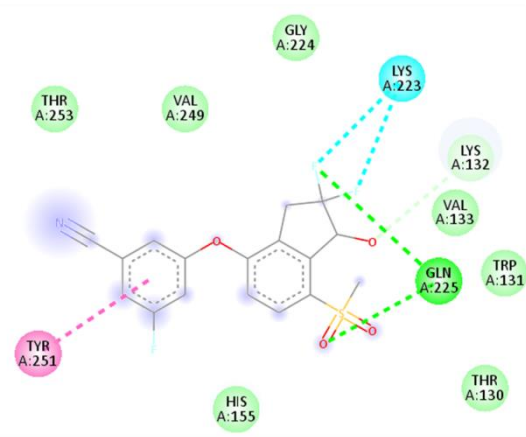
C1



HIF-1 α (M_M)/PT2385

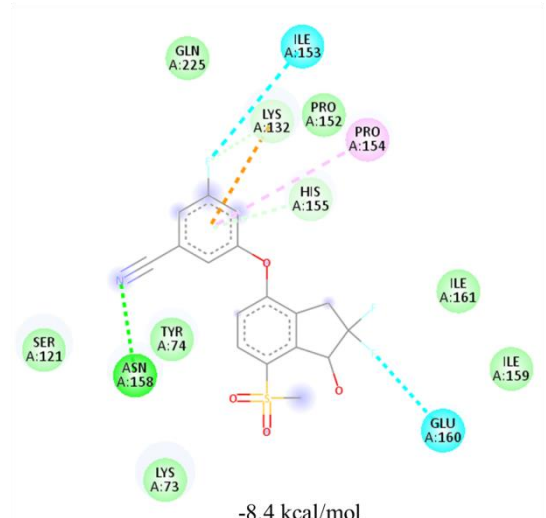


B2



-7.4 kcal/mol

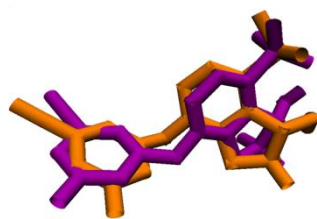
- Carbono-hidrógeno
- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- π - π



-8.4 kcal/mol

- Carbono-hidrógeno
- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- π -catión
- π -alquilo

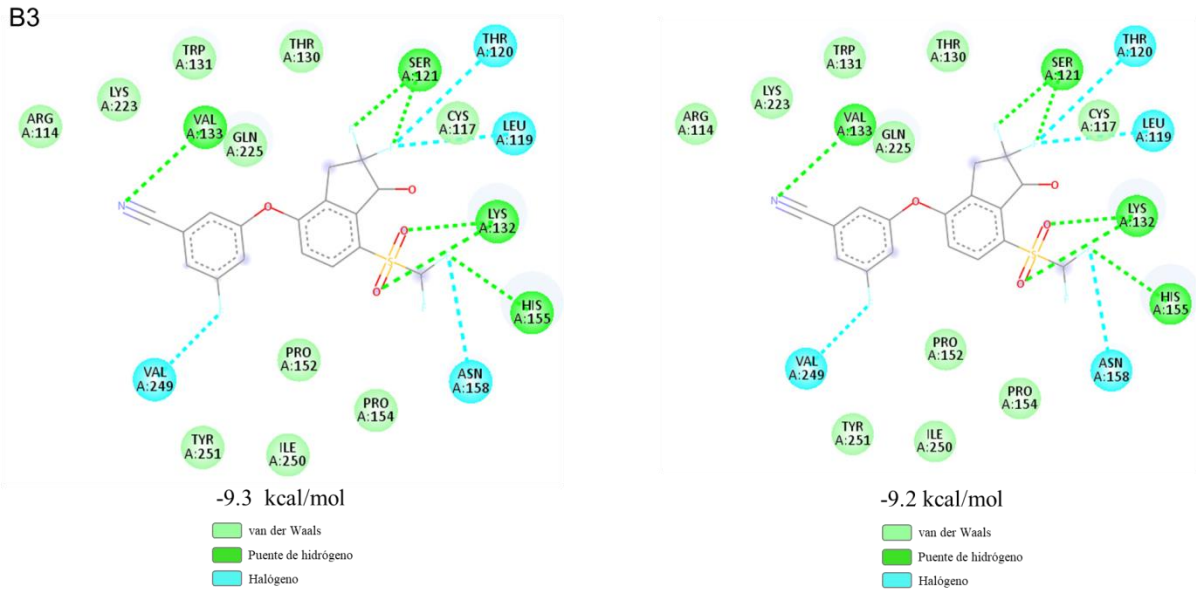
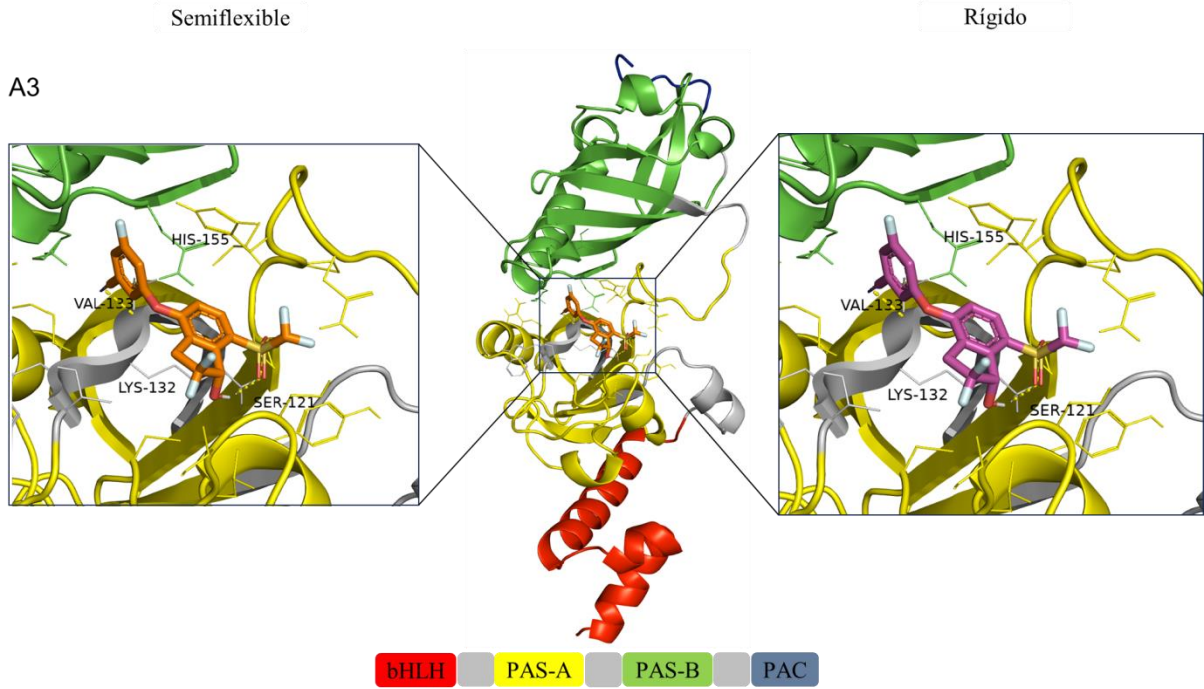
C2



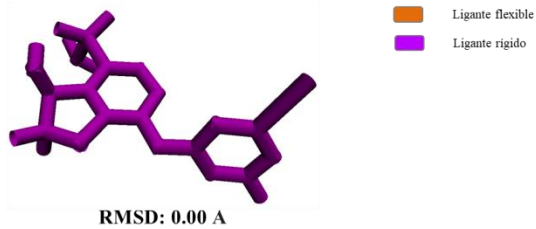
RMSD: 1.79 Å

- Ligante flexible
- Ligante rígido

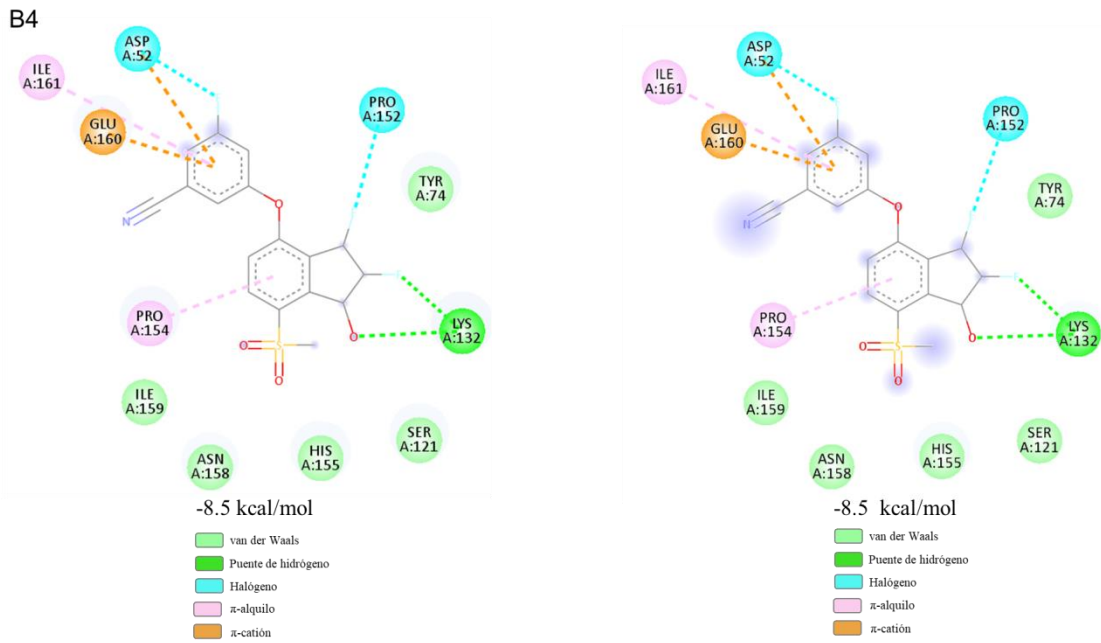
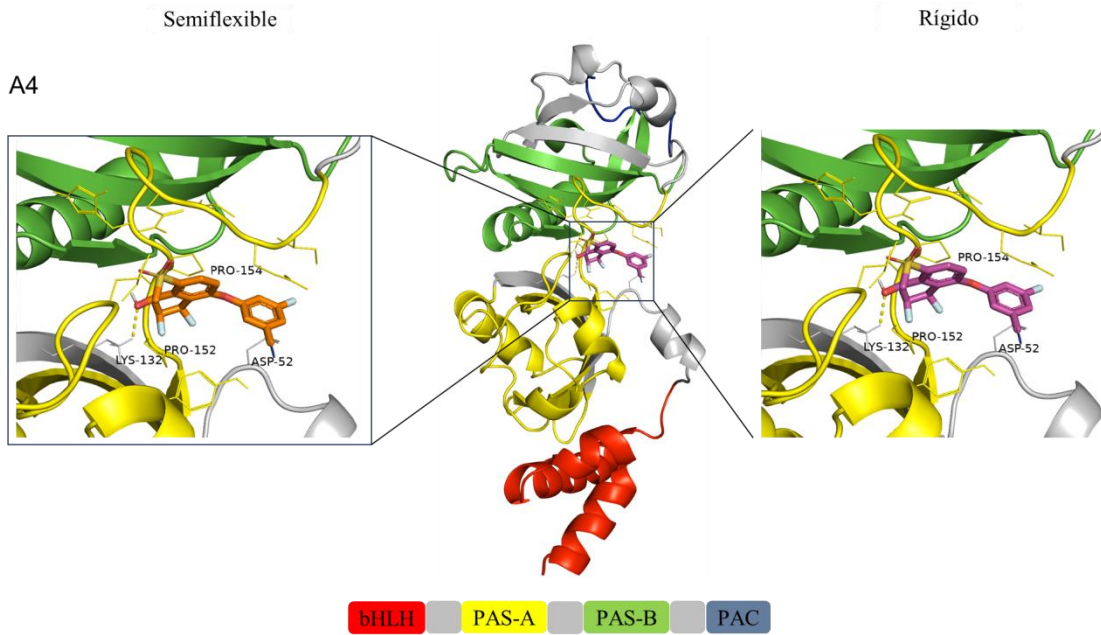
HIF-1 α (M_M)/PT2399



C3



HIF-1 α (M_M)/PT2977



C4

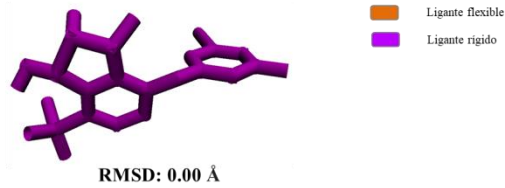


Figura 23. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 α de humano con el *template* mixto.

En la **Tabla 9** se resumen las energías de interacción obtenidas en los cálculos de acoplamiento semiflexible y rígido para todos los complejos ligante-receptor con HIF-1 α . En general, se observa que las mejores energías de interacción se obtuvieron con el ligante PT-2399 en la mayoría de los casos. Los mejores valores de energías de interacción son de los complejos **4ZPR-PT2399** (-9.8 kcal/mol), **63ET-PT2399** (-9.5 kcal/mol) y **M_M-PT2399** (-9.3 kcal/mol), obtenidas en los acoplamiento semiflexibles. Esto se puede deber a que el inhibidor PT2399 forma más interacciones de puente de halógeno con las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 α , ya que tiene cinco átomos de flúor en su estructura a comparación de PT2385 y PT2977 que tienen 3 átomos de flúor, o 0X3 que tiene un átomo de flúor y uno de cloro.

Tabla 9. Energías de interacción (kcal/mol) entre las moléculas inhibitoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 α de humano usando acoplamiento semiflexible y rígido.

Complejo ligante-receptor	Acoplamiento semiflexible	Acoplamiento rígido
4ZP4-0X3	-9.0	-7.6
4ZP4-PT2385	-7.1	-8.6
4ZP4-PT2399	-8.8	-8.8
4ZP4-PT2977	-8.7	-7.9
4ZPR-0X3	-8.4	-8.5
4ZPR-PT2385	-8.4	-8.7
4ZPR-PT2399	-9.8	-9.8
4ZPR-PT2977	-8.0	-7.9
63ET-0X3	-8.2	-8.2
63ET-PT2385	-8.1	-9.1
63ET-PT2399	-9.5	-9.4
63ET-PT2977	-9.1	-8.6
M_M-0X3	-7.8	-8.0
M_M-PT2385	-7.4	-8.4
M_M-PT2399	-9.3	-9.2
M_M-PT2977	-8.5	-8.5

5.3.2. Acoplamiento molecular con los *templates* 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y y 5V0L, y el *template* mixto de HIF-1 β

Los resultados de los acoplamientos moleculares de las estructuras modeladas de HIF-1 β con los distintos inhibidores se muestran en las **Figuras 24-28**.

En la **Figura 24A1** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de 0X3 con HIF-1 β /4ZP4. En ambos casos se obtienen poses distintas. En el acoplamiento semiflexible el ligante interactúa con aminoácidos del PAS-A (46-138), mientras que en el acoplamiento rígido lo hace con ambos dominios, PAS A (46-138) y PAS-B (252-261). En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 24B1**, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de tipo π -catión con His-135 en PAS-A. Mientras que en el acoplamiento rígido, además de esta misma interacción π -catión con His-135, se observan interacciones de tipo π -alquilo con Ile-121, π - σ con Val-133 en PAS-A, y en PAS-B se observa una interacción de puente de hidrógeno con Asn-260 y de puente de halógeno con Val-261. Este mayor número de interacciones en el acoplamiento rígido le confiere una mejor energía de -8.0 kcal/mol, respecto a la energía del acoplamiento semiflexible de -7.5 kcal/mol. En la **Figura 24C1** se observa que el ligante tuvo algunos cambios conformacionales en su estructura, con un valor de RMSD de 1.48 Å.

En la **Figura 24A2** se muestran los acoplamientos semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 β -4ZP4. Se observan poses distintas, en ambos casos las interacciones más relevantes con el ligante se llevan a cabo con aminoácidos del dominio PAS-A. En la **Figura 24B2** del diagrama de interacciones 2D, se observa que en el acoplamiento semiflexible existen interacciones π - σ con Leu-63, dos interacciones de tipo π -alquilo con Lys-52 y tres interacciones de puente de hidrógeno con Gln-49, Lys-52 y Tyr-75. Mientras que en el acoplamiento rígido se observan las interacciones π -catión con Arg-123 y de puente de hidrógeno con Lys-107. A pesar de que en el acoplamiento semiflexible se observa un mayor número de puentes de hidrógeno, en el acoplamiento rígido se obtuvo una energía de acoplamiento más baja (-7.7 kcal/mol) respecto al acoplamiento semiflexible (-7.0 kcal/mol), esto se puede deber a otras interacciones relevantes de puente de hidrógeno y de halógeno, que aunque no caen en los dominios de PAS-A y PAS-B estabilizan al complejo. En la

Figura 24C2 se observan cambios conformacionales importantes en la conformación del ligante, con un valor de 3.32 Å.

La **Figura 24A3** muestra los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 β /4ZP4. Ambos acoplamiento muestran poses idénticas, donde el ligante interactúa con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 24B3**, se observa que las interacciones más relevantes son de tipo π - σ con Val-133 en el dominio PAS-A y dos interacciones de puente de halógeno con Asn-260 y Val-261 en el dominio PAS-B. Se obtuvo una energía de interacción de -8.6 kcal/mol en ambos acoplamiento. En la **Figura 24C3** se observa que el ligante no tuvo cambios conformacionales, con un valor de RMSD de 0.0006 Å.

En la **Figura 24A4** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 β /4ZP4. Al igual que para PT2399, se obtuvieron poses idénticas, pero en este caso la interacción del ligante es únicamente con aminoácidos del dominio PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D, se observa que las interacciones más relevantes son de tipo π -alquilo con Lys-52 y de tipo π - σ con Leu-63. En la **Figura 24C4** se observa que no hubo cambios conformacionales en el ligante, obteniéndose un valor de RMSD de 0.0006 Å.

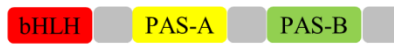
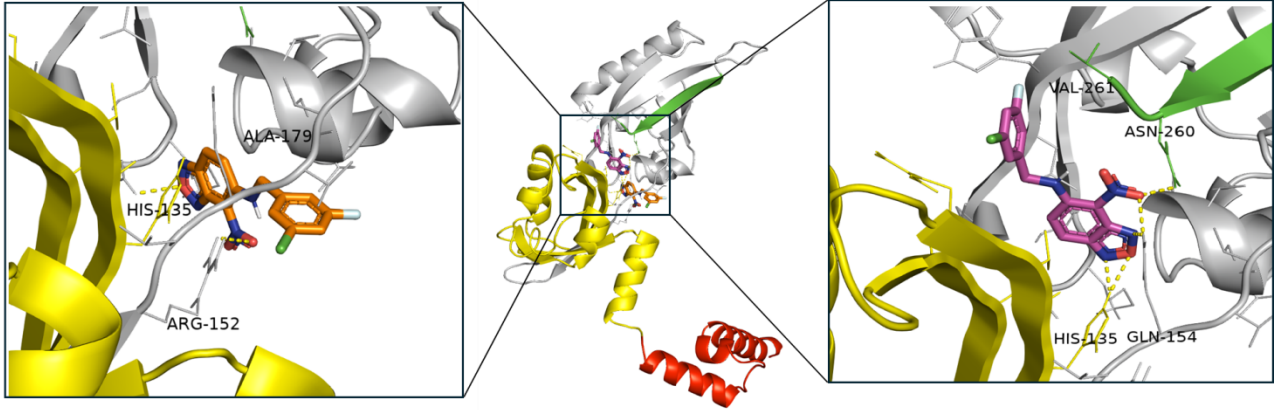
En general, de la **Figura 24** se puede observar que en los acoplamiento con HIF-1 β /4ZP4, los ligantes 0X3 (semiflexible), PT2385 (ambos acoplamiento) y PT2977 (ambos acoplamiento) interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A, mientras 0X3 (rígido) y PT2399 (ambos acoplamiento) interactuaron con ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de puente de hidrógeno o halógeno, excepto en PT2977. De los cuatro complejos con HIF-1 β /4ZP4, la mejor energía de interacción se obtuvo en el complejo 4ZP4-PT2399 (-8.6 kcal/mol) en ambos acoplamiento, como se observa en la **Tabla 10**.

HIF-1 β (4ZP4)/OX3

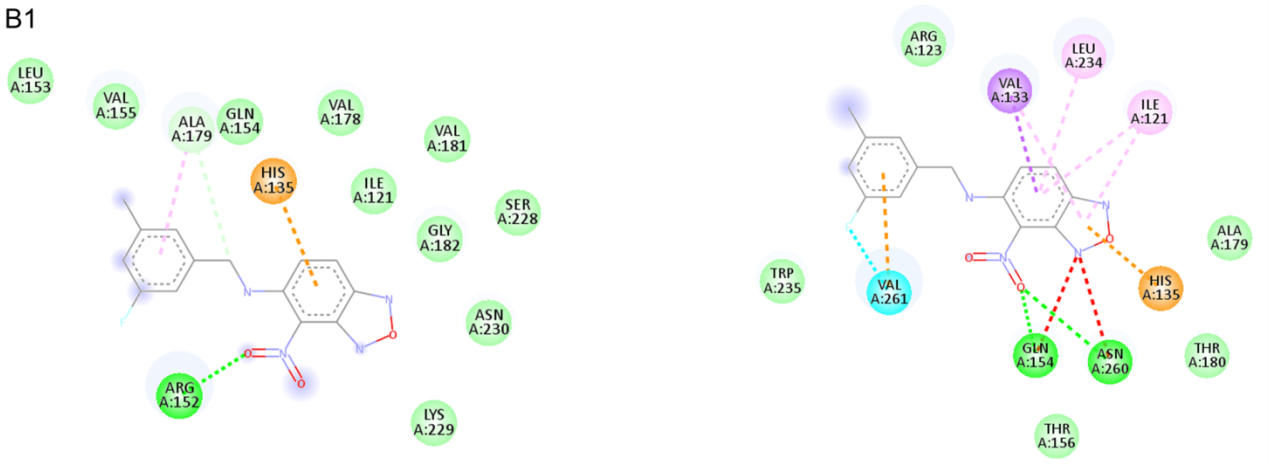
Semiflexible

Rígido

A1



B1



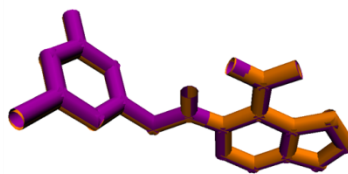
-7.5 kcal/mol

- Carbono-hidrógeno
- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- π -alquilo
- π -catión

-8.0 kcal/mol

- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- Donador - donador desfavorable
- π -catión
- π -anión
- π - σ
- π -alquilo

C1



RMSD: 1.48 Å

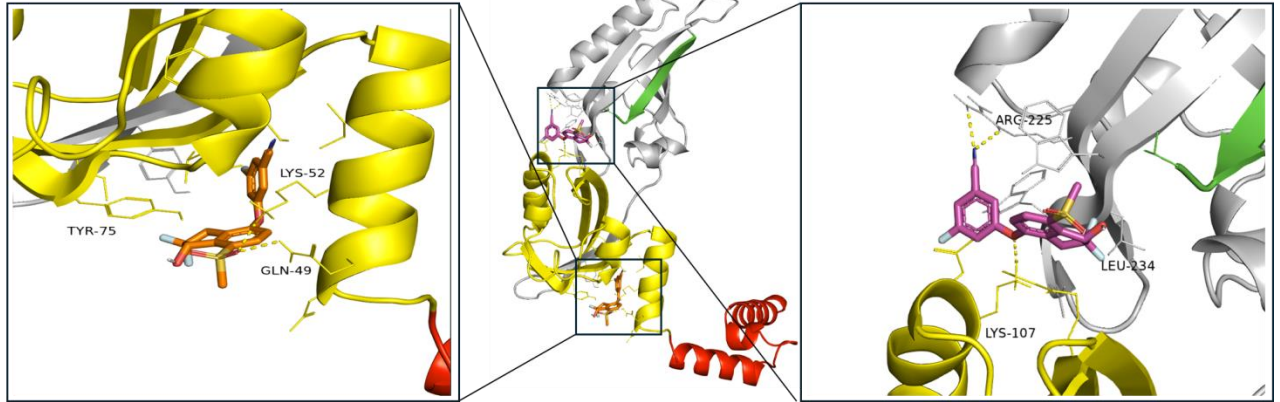
- Ligante flexible
- Ligante rígido

HIF-1 β (4ZP4)/PT2385

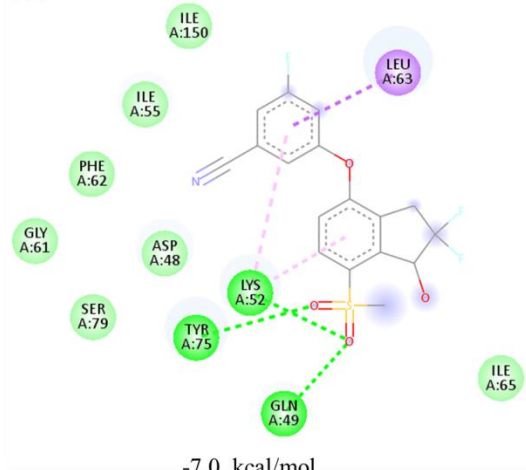
Semiflexible

Rígido

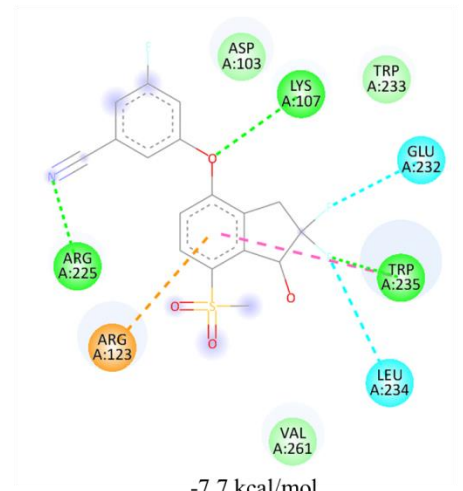
A2



B2

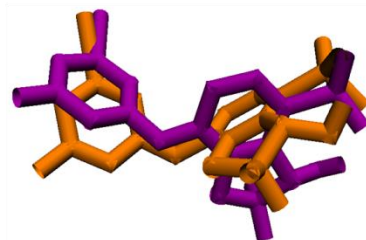


- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- π - σ
- π -alquilo



- Carbono-hidrógeno
- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- π - π
- π -catión

C2



- Ligante flexible
- Ligante rígido

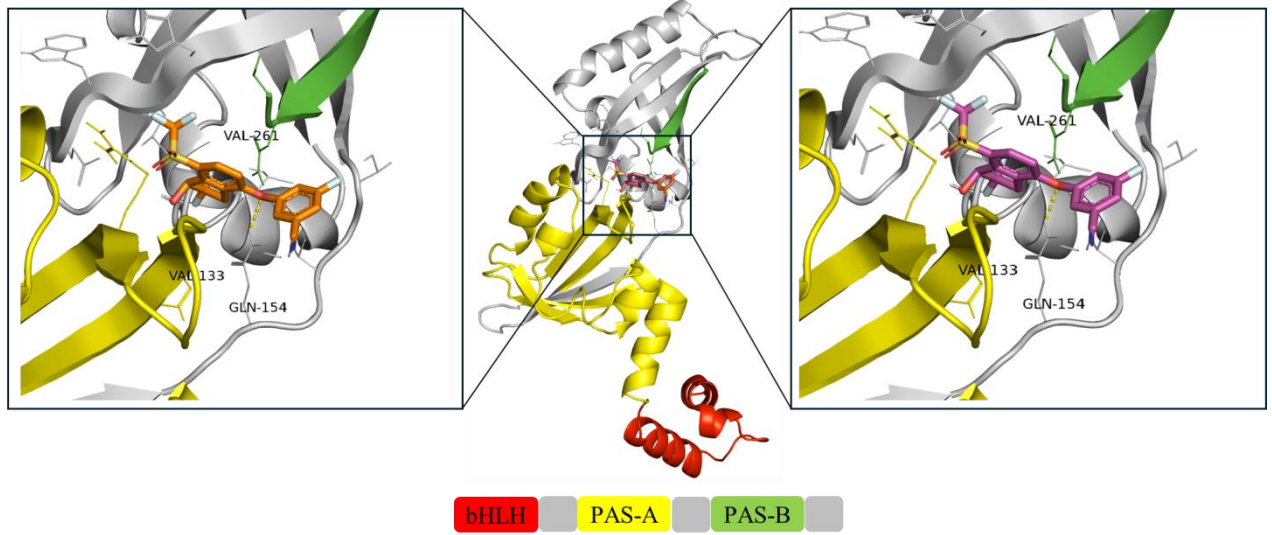
RMSD: 3.32 Å

HIF-1 β (4ZP4)/PT2399

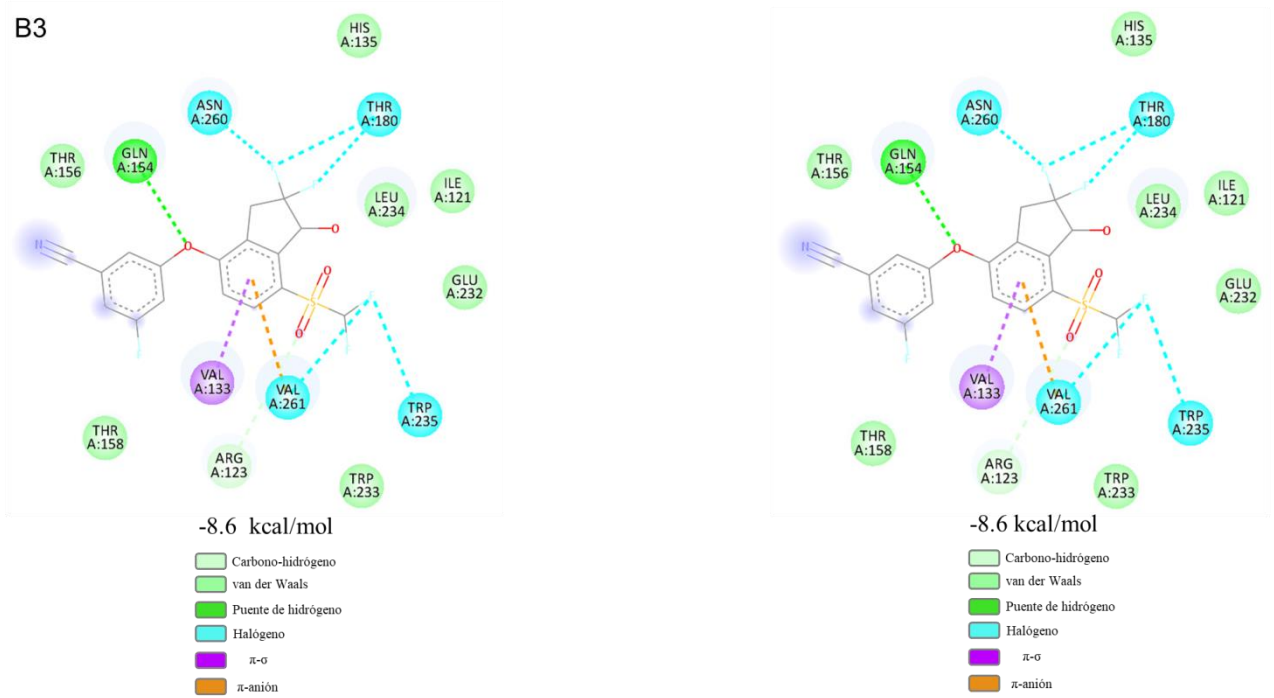
Semiflexible

Rígido

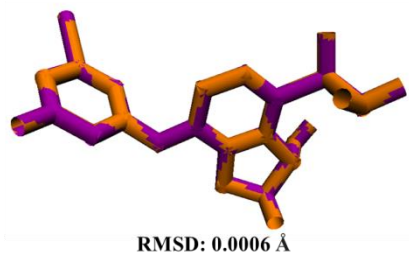
A3



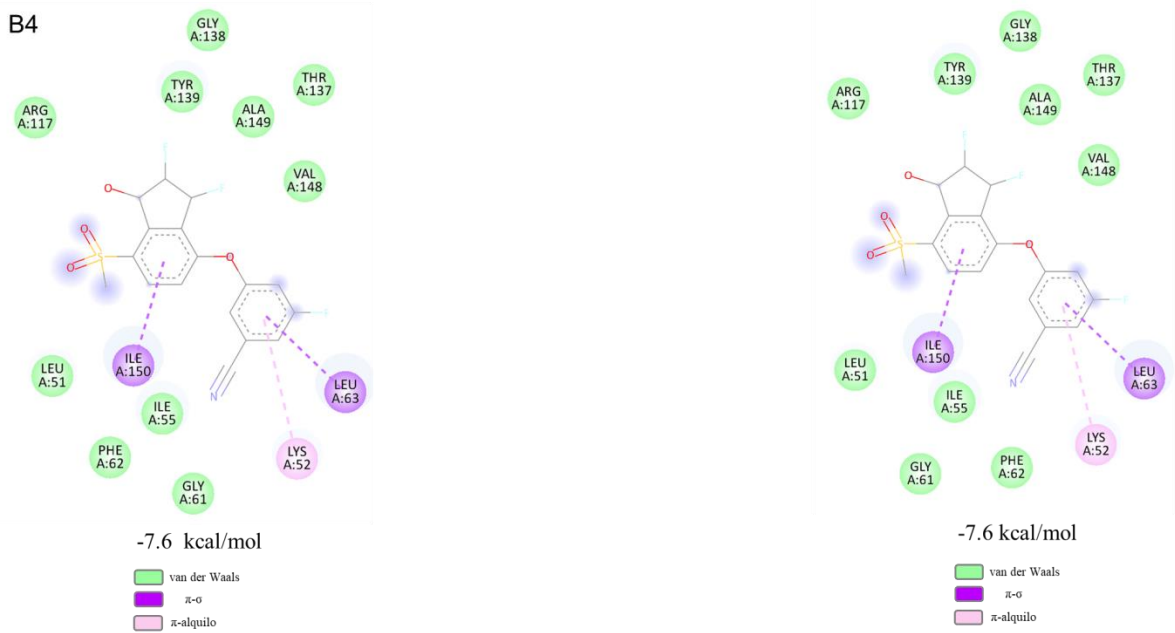
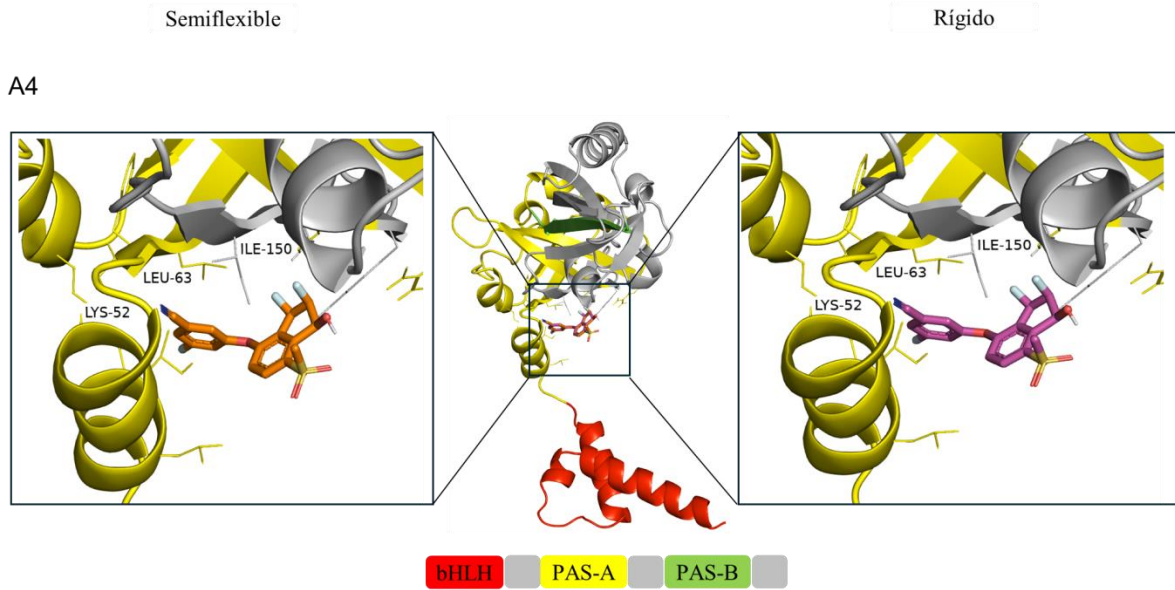
B3



C3



HIF-1 β (4ZP4)/PT2977



C4

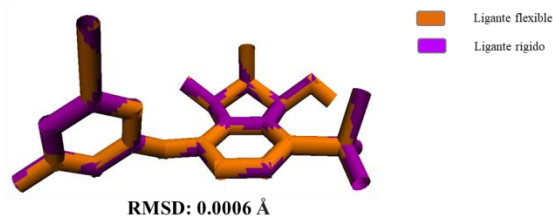


Figura 24. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el *template* 4ZP4.

En la **Figura 25A1** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de 0X3 con HIF-1 β /7V7L. Se obtienen poses muy similares dentro de los dominios de PAS-A (64-138) y PAS-B (252-280), ver **Figura 19** y **Tabla 8**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 25B1**, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de tipo puente de hidrógeno con Asn-81 en PAS-A e interacciones de tipo π - π y π -alquilo con Phe-262 en PAS-B. Mientras que en el acoplamiento rígido, se observaron dos interacciones de tipo π -alquilo con Pro-78 y una interacción de puente de hidrógeno con Asn-81, en PAS-A, e interacción π -alquilo con Phe-262 del dominio PAS-B. Se obtuvo el mismo valor de energía de interacción de -7.7 kcal/mol. En la **Figura 25C1** se observa que el ligante no varía conformacionalmente, con un valor de RMSD de 0.0007 Å.

En la **Figura 25A2** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 β /7V7L. Se observan poses diferentes, pero ambas con el ligante interactuando en ambos dominios de PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 25B2**, en el acoplamiento semiflexible se observan principalmente interacciones de tipo π -alquilo con Pro-78 y π -amida con Thr-77 en el dominio de PAS-A, mientras que en el dominio de PAS-B se observa una interacción de puente de hidrógeno con Gln-263 y π -anión con Asp-268. Por otro lado, en el acoplamiento rígido, las interacciones más relevantes son de tipo π -alquilo con Pro-78 y de puente de halógeno con Val-79, ambas en PAS-A, mientras que en PAS-B se observan tres interacciones más de puente de halógeno con Asn-264, Pro-265 y Asp-268. Estas interacciones de puente de halógeno en el dominio PAS-B le confieren al sistema una mayor estabilidad en el acoplamiento rígido con una energía de interacción de -8.8 kcal/mol, respecto a la energía de -7.9 kcal/mol obtenida en el acoplamiento semiflexible. En la **Figura 25C2** se observa que el ligante tiene un valor de RMSD de 3.3584 Å, debido a las diferencias conformacionales del ligante.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 β 7V7L se muestran en la **Figura 25A3**. En este caso se observan poses idénticas para ambos acoplamiento. El ligante interactúa con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 25B3**, se observan dos interacciones de halógeno con Pro-78 y Val-79, una interacción π -azufre con Cys-127 y una interacción de tipo π -alquilo con Val-136 en el dominio de PAS-A, mientras que en PAS-B se observan tres interacciones de

punto de halógeno con Thr-261, Gln-263 y Asp-268. En ambas cosas se obtuvo una energía de -8.7 kcal/mol. En la **Figura 25C3** se observa que el ligante no sufrió cambios conformacionales, con un valor de RMSD de 0.0005 Å.

Un comportamiento similar a PT2399, se observa para los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 β /7V7L, como se muestra en la **Figura 25A4**, donde las poses de ambos acoplamiento son idénticas y de igual forma interactúan con aminoácidos de ambos dominios, PAS-A y PAS-B. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 25B4**, se observan una interacción de punto de hidrógeno con Asn-81 y una interacción de punto de halógeno con Pro-78, ambas en el dominio de PAS-A, adicionalmente, se observan tres interacciones más de punto de halógeno con Asn-264, Pro-265 y Asp-268 del dominio PAS-B. La energía de interacción es de -8.5 kcal/mol en ambos acoplamiento. En la **Figura 25C4** se observa que al igual que para PT2399 no hubo cambios conformacionales del ligante, con un valor de RMSD de 0.0008 Å.

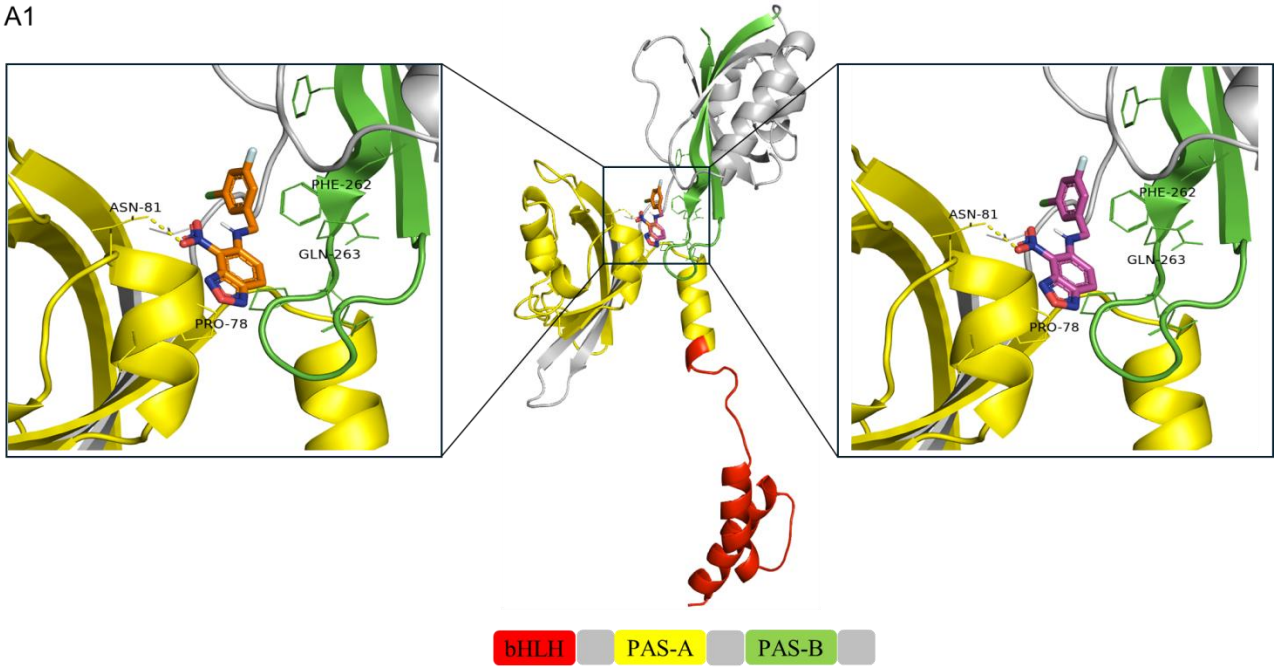
En general, de la **Figura 25** se puede observar que en los acoplamiento con HIF-1 β /7V7L, todos los ligantes interactuaron con aminoácidos de ambos dominios PAS-A y PAS-B, tanto en el acoplamiento semiflexible como rígido. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de punto de hidrógeno o halógeno y de tipo π -alquilo. Con el ligante PT2399 se observó una interacción π -azufre que no había sido observada en los casos anteriores. De los cuatro complejos con HIF-1 β /7V7L, se obtuvieron las mejores energías de interacción los complejos 7V7L-PT2385 (rígido) con -8.8 kcal/mol, 7V7L-PT2399 (ambos acoplamiento) con -8.7 kcal/mol y 7V7L-PT2977 (ambos acoplamiento) con -8.5 kcal/mol, como se observa en la **Tabla 10**.

HIF-1 β (7V7L)/0X3

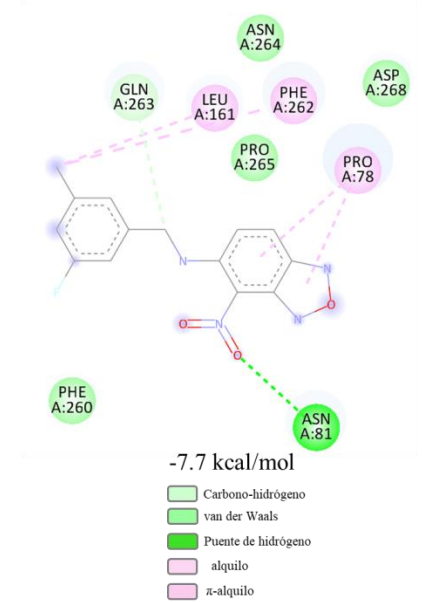
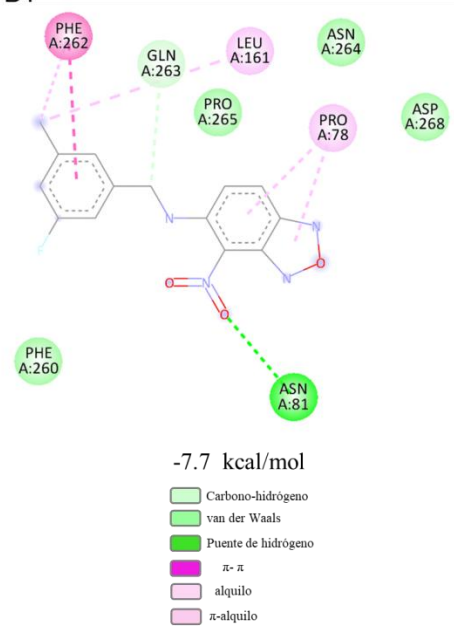
Semiflexible

Rígido

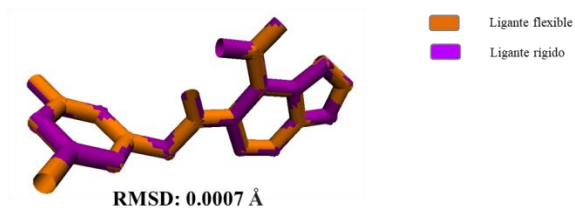
A1



B1



C1

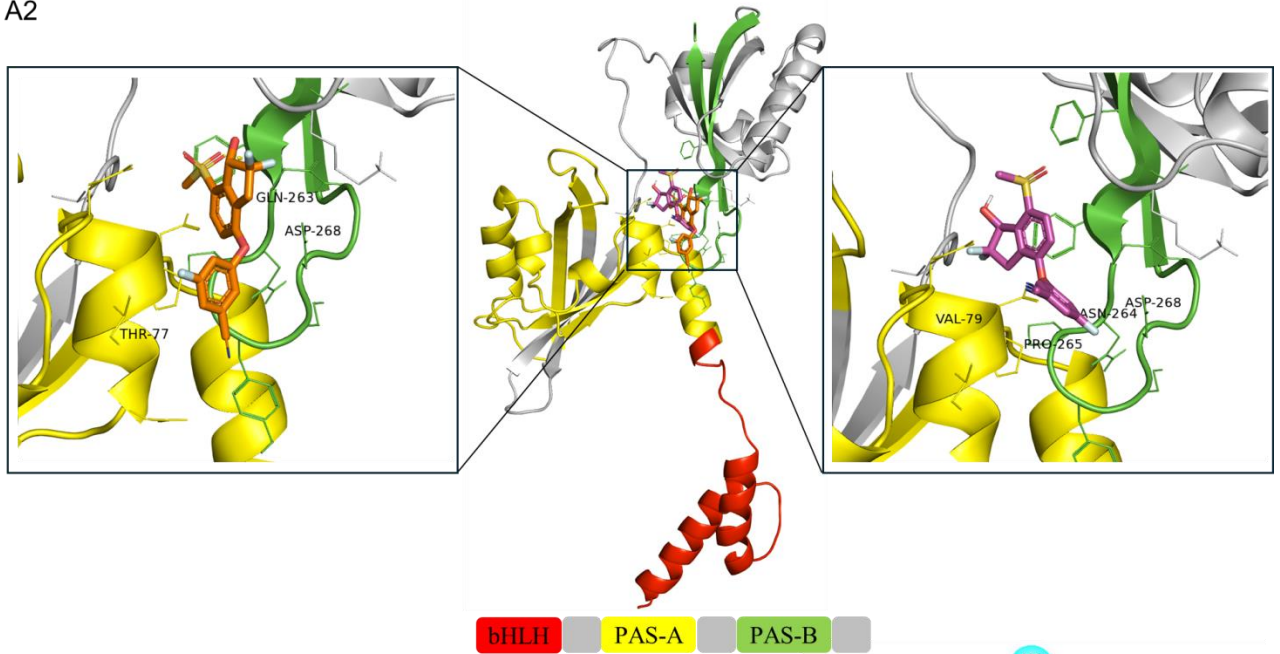


HIF-1 β (7V7L)/PT2385

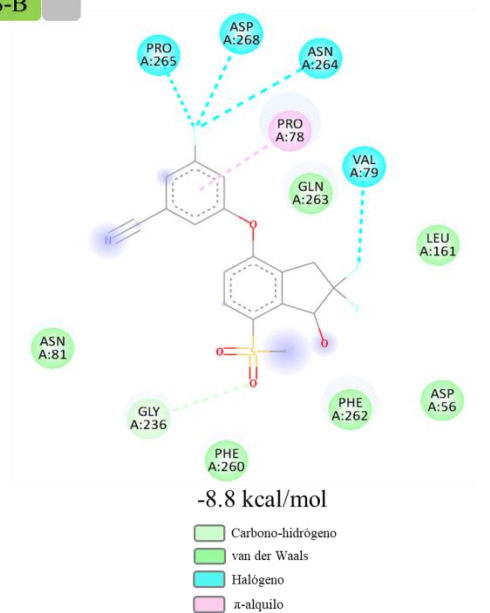
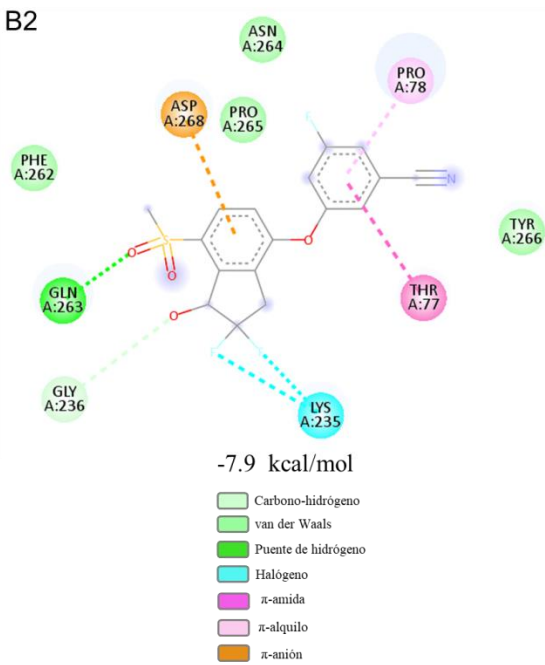
Semiflexible

Rígido

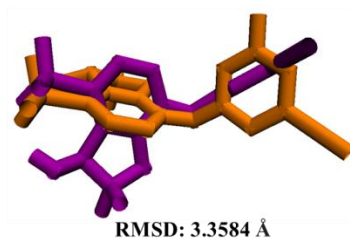
A2



B2



C2



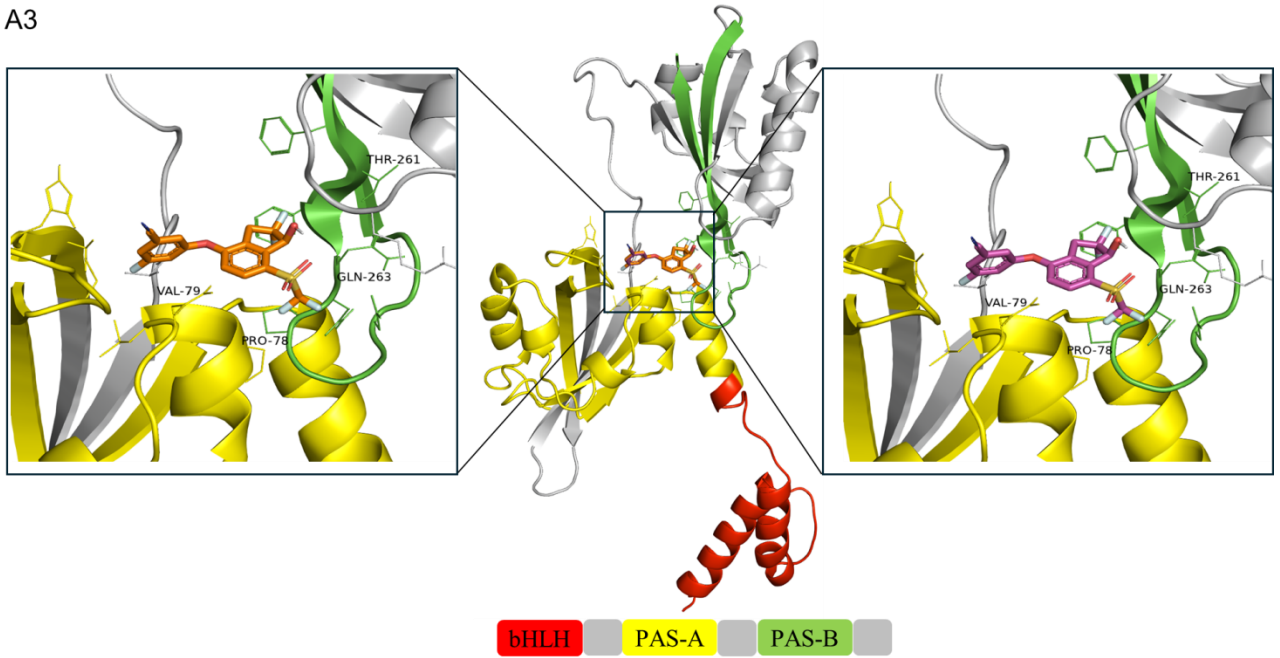
■ Ligante flexible
■ Ligante rígido

HIF-1 β (7V7L)/PT2399

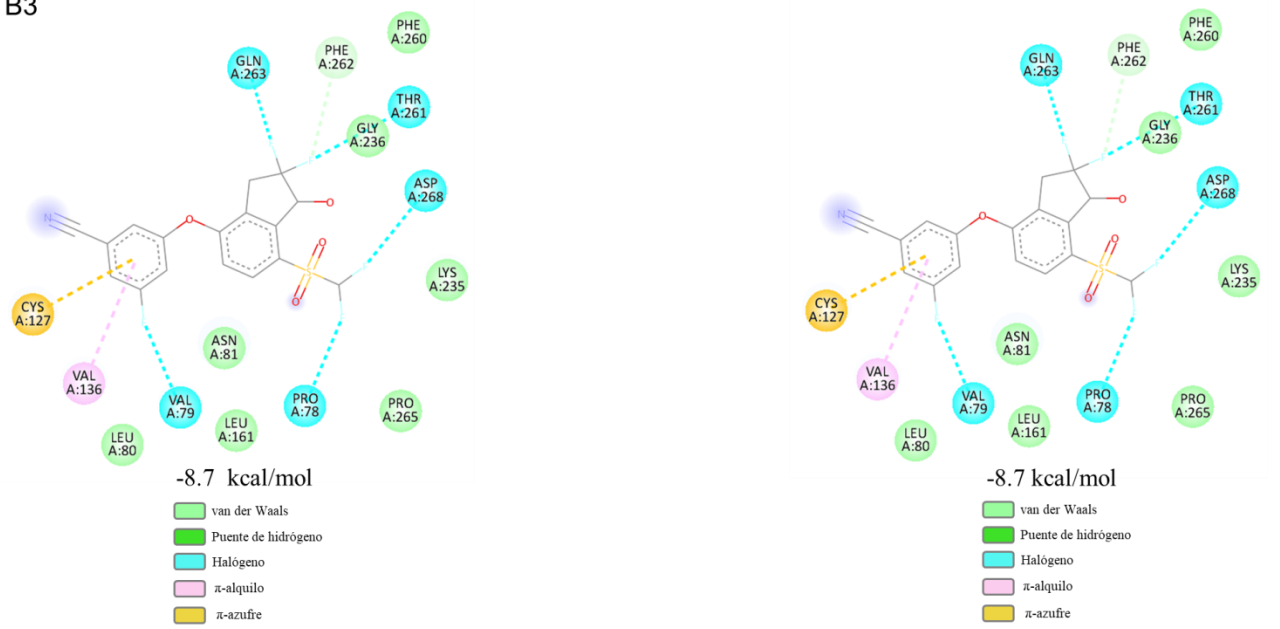
Semiflexible

Rígido

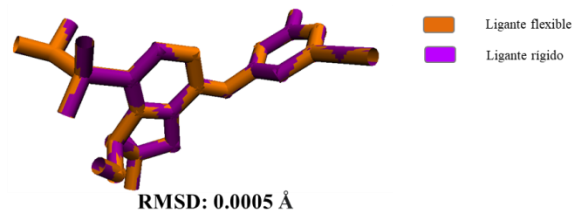
A3



B3



C3



HIF-1 β (7V7L)/PT2977

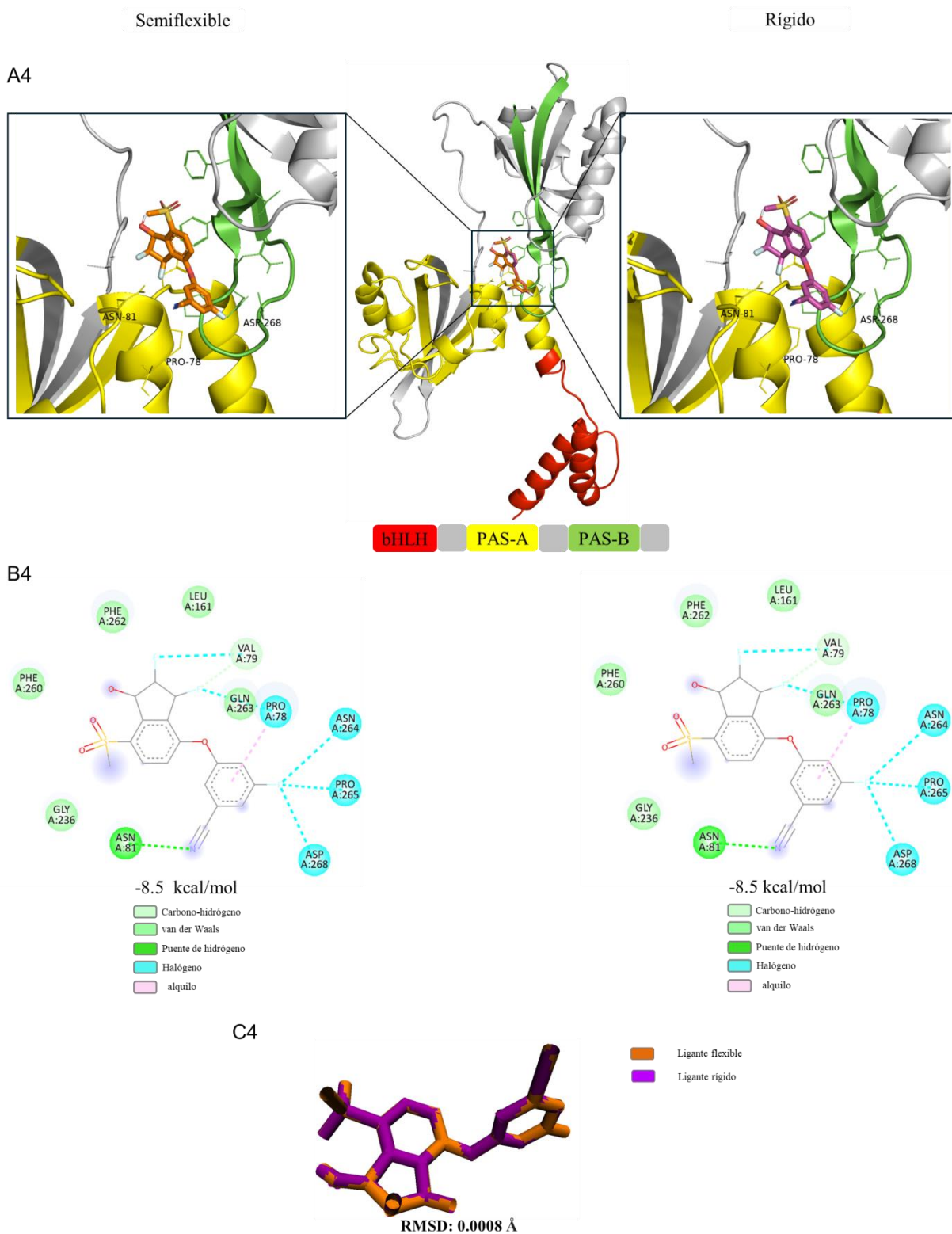


Figura 25. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el *template* 7V7L.

La **Figura 26A1** muestra los acoplamiento semiflexible y rígido de 0X3 con HIF-1 β /5Y7Y. En ambos acoplamiento se obtienen poses idénticas con interacciones en el dominio de PAS-A (49-141) para 5Y7Y, ver **Figura 19** y **Tabla 8**. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 26B1**, se observan tres interacciones de tipo π -alquilo con Lys-64, Ile-67 y Leu-75. Se obtuvo una energía de interacción de -7.7 kcal/mol en ambos acoplamiento. En la **Figura 26C1** se observa que no hubo cambios conformacionales en el ligante, con un valor de RMSD de 0.0006 Å.

En la **Figura 26A2** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 β /5Y7Y. Se obtienen poses diferentes, aunque ambas caen dentro de la misma región del dominio PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 26B2**, en el acoplamiento semiflexible se observan dos interacciones de puente de hidrógeno con Leu-75 y Ser-89, y dos interacciones de tipo π -alquilo con Lys-64 e Ile-67. Mientras que en el acoplamiento rígido, se observa una interacción de puente de hidrógeno con Leu-75, dos interacciones de puente de halógeno con Asp-60 y Leu-63, una interacción π -catión con Lys-64 y una interacción π - π con Tyr-87. Este mayor número de interacciones en el dominio PAS-A, observadas en el acoplamiento rígido, le confiere una mejor energía de interacción de -8.2 kcal/mol, respecto al acoplamiento semiflexible con energía de -7.4 kcal/mol. En la **Figura 26C2** se observan cambios conformacionales significativos en el ligante, con un valor de RMSD de 2.6097Å.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 β /5Y7Y se muestran en la **Figura 26A3**. Se observan poses similares y se encuentran dentro del dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 26B3**, se observa una interacción de tipo π -alquilo con Lys-64 y dos interacciones de puente de hidrógeno con Ser-89 y Leu-75. Se observan otras interacciones relevantes de puente de halógeno e hidrógeno pero que no involucran a los aminoácidos del dominio PAS-A. La energía de interacción calculada es de -9.4 kcal/mol en ambos casos. En la **Figura 26C3** se observan ligeros cambios conformacionales en el ligante, con un valor de RMSD de 1.7287 Å.

En la **Figura 26A4** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 β /5Y7Y. Se observan poses idénticas en ambos casos. Las interacciones relevantes de PT2977 se llevan a cabo con aminoácidos del dominio PAS-A. En el diagrama de

interacciones 2D de la **Figura 26B4**, se observan interacciones de tipo π -catión con Lys-64, π - π con Tyr-87 y de puente de hidrógeno y π -alquilo Leu-75. Se obtiene una energía de interacción de -8.0 kcal/mol en ambos casos. En la **Figura 26C4** se observa que el ligante no sufre cambios conformacionales como lo indica el valor de RMSD de 0.0006 Å.

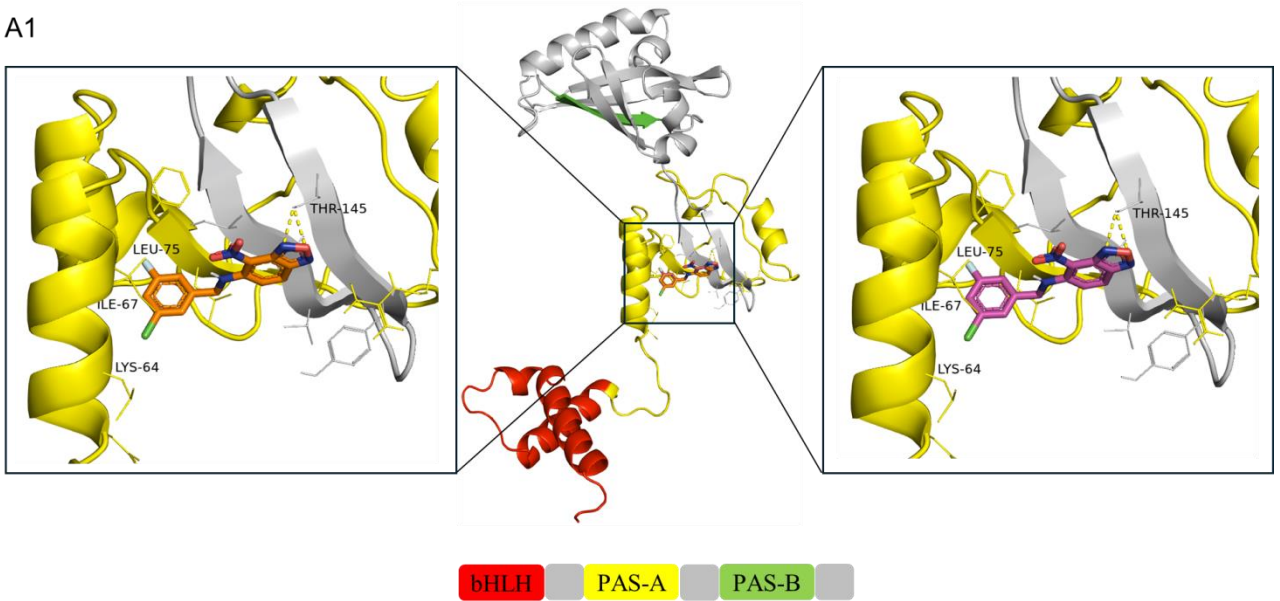
En general, de la **Figura 26** se puede observar que en los acoplamiento con HIF-1 β /5Y7Y, todos los ligantes interactuaron con aminoácidos del dominio PAS-A, tanto en el acoplamiento semiflexible como rígido. En la mayoría de los casos se observaron interacciones de puente de hidrógeno o halógeno, excepto para el ligante 0X3. De los cuatro complejos con HIF-1 β /5Y7Y, se obtuvo la mejor energía de interacción en el complejo 5Y7Y-PT2399 con -9.4 kcal/mol en ambos acoplamiento, como se observa en la **Tabla 10**. En este complejo aunque solamente se observan dos interacciones de puente de hidrógeno y una interacción π -alquilo con aminoácidos del dominio PAS-A, existen otras interacciones de hidrógeno y halógeno que estabilizan al complejo.

HIF-1 β (5Y7Y)/OX3

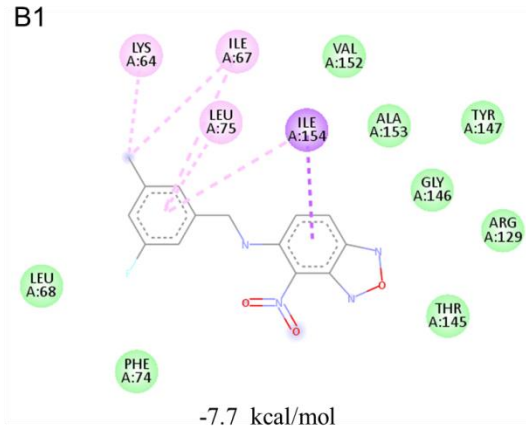
Semiflexible

Rígido

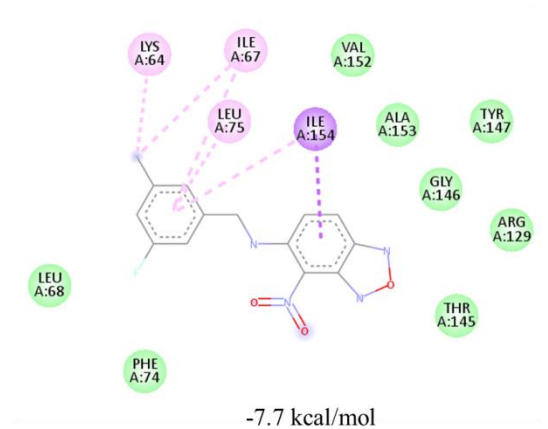
A1



B1

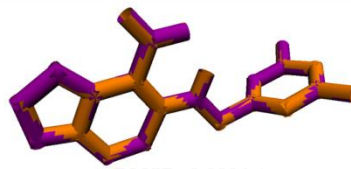


van der Waals
 π - σ
 alquilo
 π -alquilo



van der Waals
 π - σ
 alquilo
 π -alquilo

C1



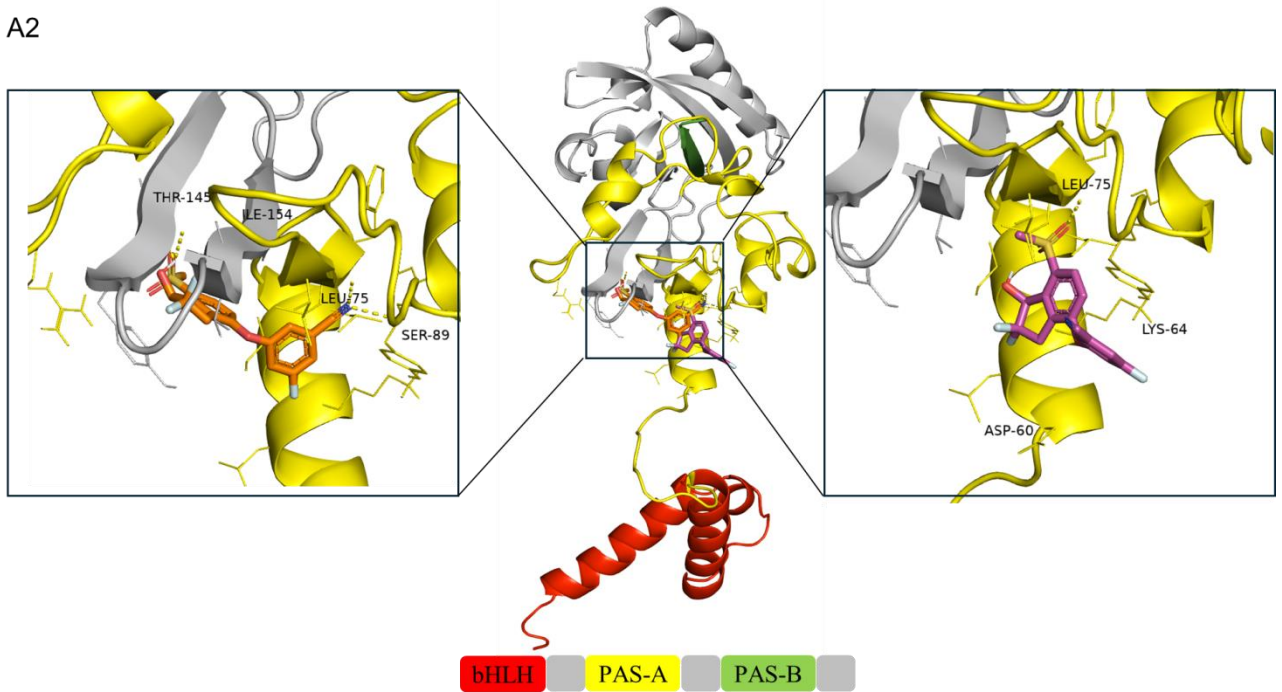
Ligante flexible
 Ligante rígado

HIF-1 β (5Y7Y)/PT2385

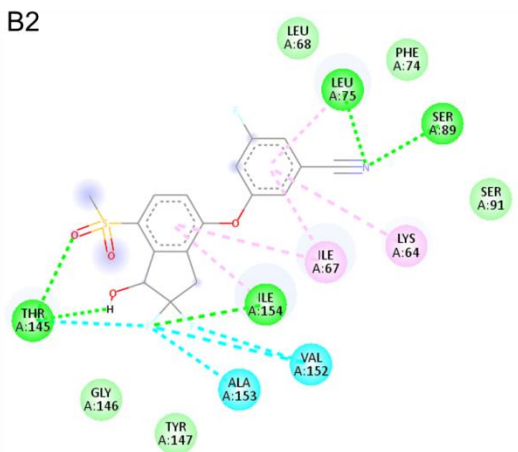
Semiflexible

Rígido

A2

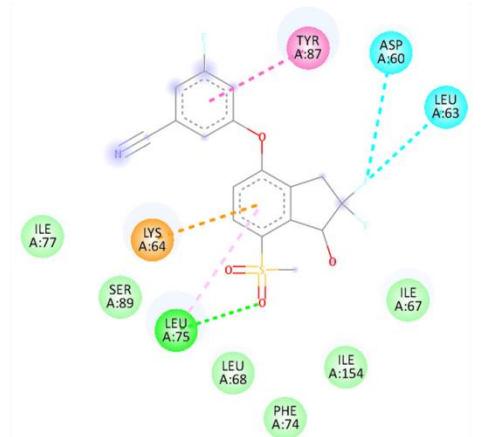


B2



-7.4 kcal/mol

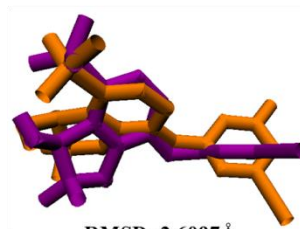
- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- π -alquilo



-8.2 kcal/mol

- van der Waals
- Puente de hidrógeno
- Halógeno
- π -alquilo
- π - π
- π -catión

C2



RMSD: 2.6097Å

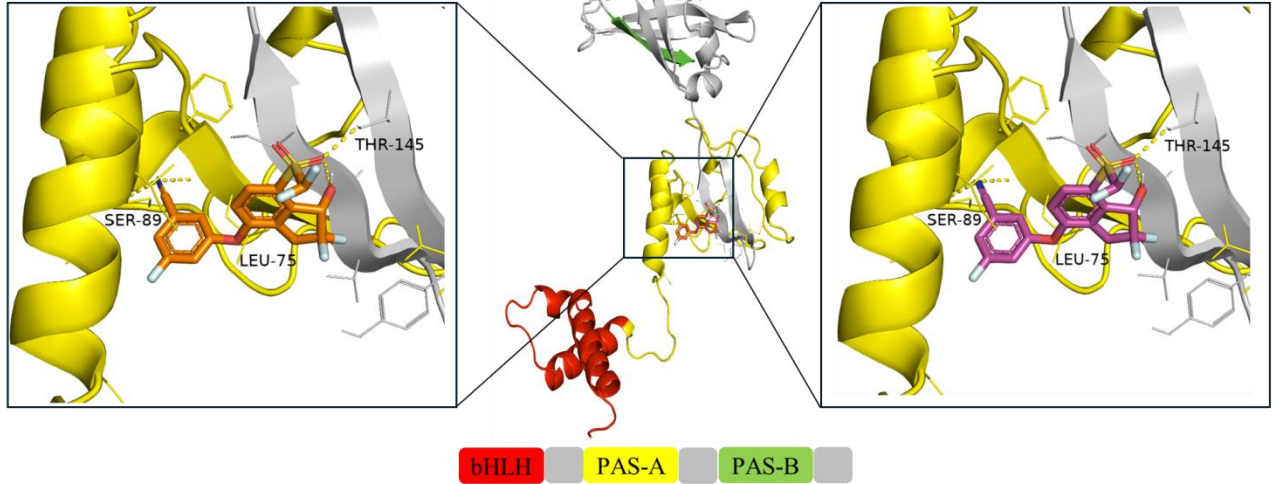
- Ligante flexible
- Ligante rígido

HIF-1 β (5Y7Y)/PT2399

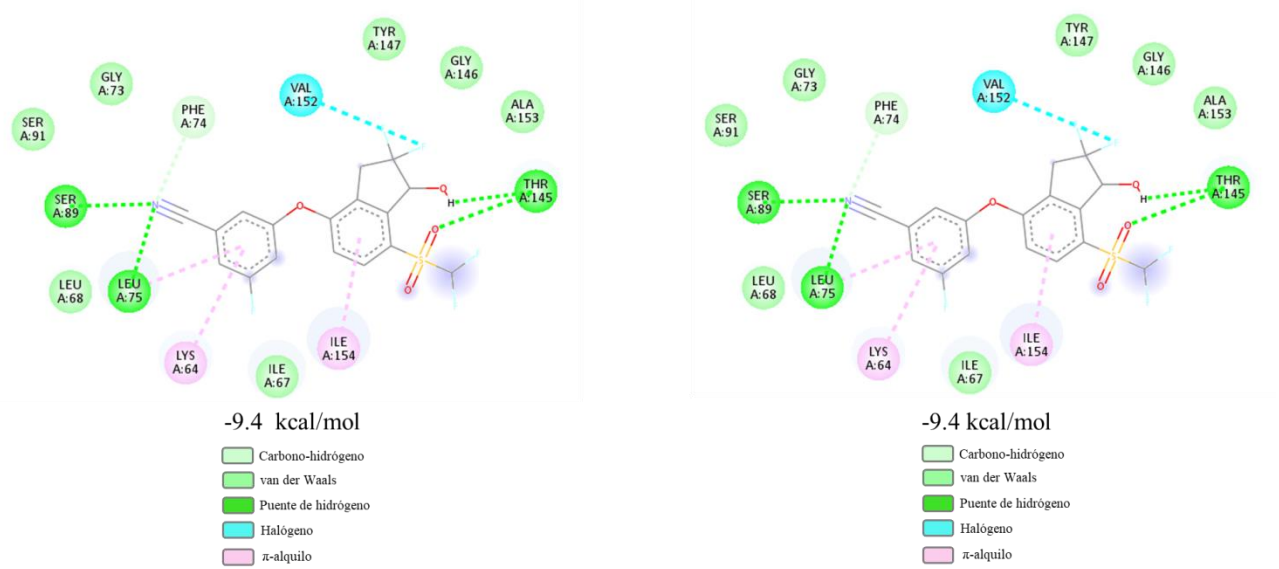
Semiflexible

Rígido

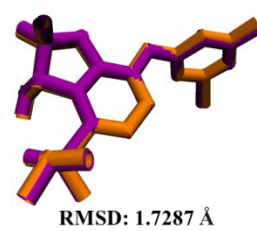
A3



B3



C3



Ligante flexible
Ligante rígido

HIF-1 β (5Y7Y)/PT2977

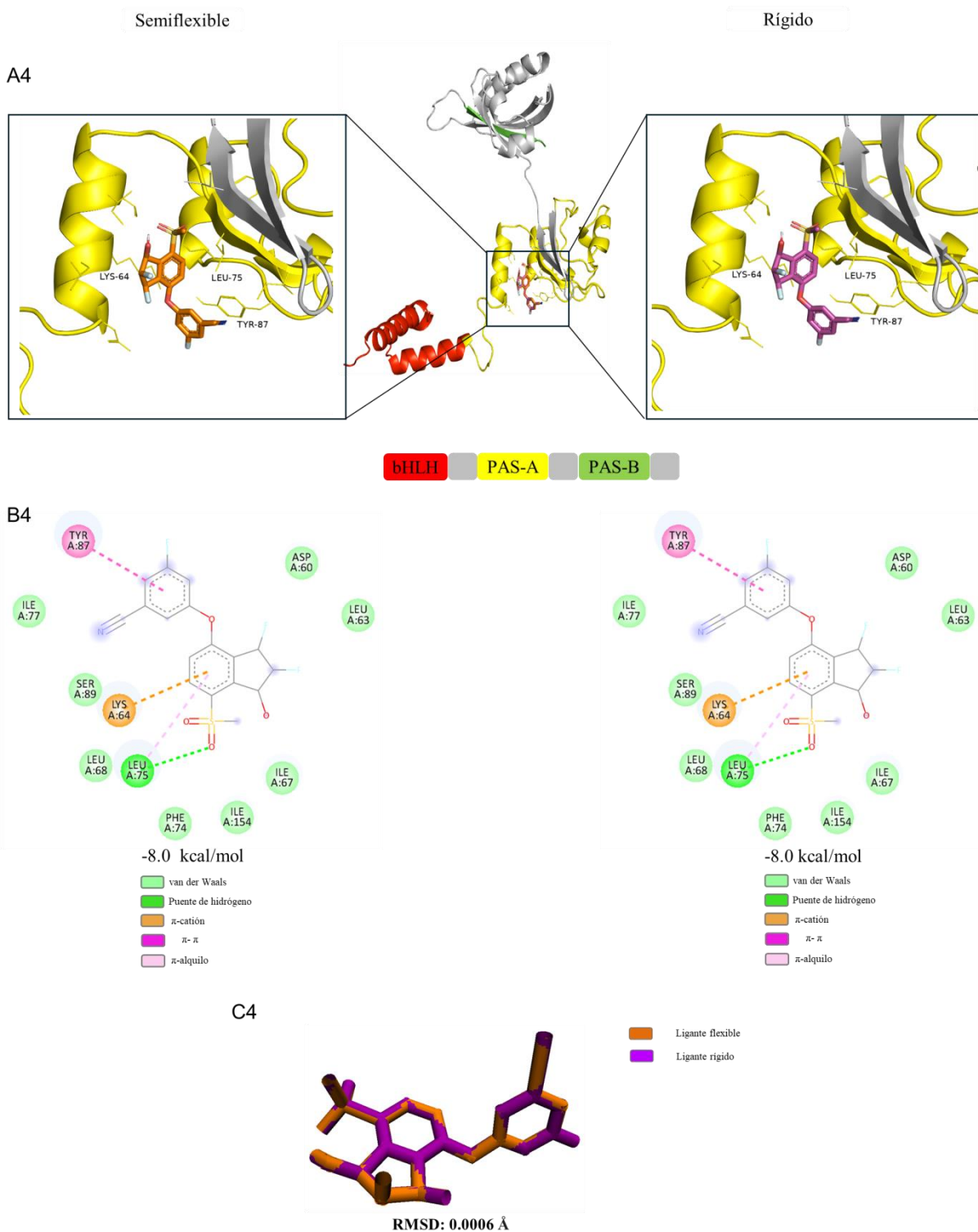


Figura 26. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el *template* 5Y7Y.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de 0X3 con HIF-1 β /5V0L se muestran en la **Figura 27A1**. Se observa que tienen poses idénticas y que en ambos casos el ligante interactúa con aminoácidos del dominio PAS-A (63-155) y con un aminoácido del dominio bHLH (1-62), para 5V0L, ver **Figura 19** y **Tabla 8**. Si bien el dominio bHLH no tiene ninguna relación reportada en el proceso de dimerización para la formación del complejo HIF-1, es importante debido a que activa los genes del elemento de respuesta a hipoxia (HRE), convirtiéndola en una vía interesante de explorar. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 27B1**, se observa que el aminoácido perteneciente al dominio bHLH es Lys-60, el cual interactúa con 0X3 mediante una interacción de tipo π -alquilo. Las interacciones más relevantes que involucran a aminoácidos del dominio PAS-A son 5 interacciones de tipo π -alquilo con Lys-73, Ile-76 y Leu-84, π -anión con Asp-69 y de puente de hidrógeno con Leu-84. Se obtiene una energía de interacción de -7.7 kcal/mol en ambos acoplamiento. En la **Figura 27C1** se observa que el ligante no tuvo cambios conformacionales, con un valor de RMSD es de 0.01 Å.

En la **Figura 27A2** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2385 con HIF-1 β /5V0L. Se observan poses similares, donde el ligante está interactuando con aminoácidos del dominio PAS-A y también se observa una interacción con el dominio bHLH, al igual que con el complejo con 0X3, sólo que en este caso es una interacción débil de tipo van der Waals. Para las interacciones que involucran al dominio de PAS-A, en el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 27B2**, en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de tipo π -alquilo con Lys-73, un puente de halógeno con Gly-82, un puente de hidrógeno con Leu-84 y una interacción π -azufre con Tyr-155. Mientras que en el acoplamiento rígido se observan dos interacciones π -alquilo con Lys-73 y Leu-84, y la misma interacción π -azufre con Tyr-155 que en acoplamiento semiflexible. Se obtienen energías de interacción de -8.0 kcal/mol y de -8.8 kcal/mol, para los acoplamiento semiflexible y rígido, respectivamente, a pesar de que en el acoplamiento semiflexible se observa una interacción de puente de halógeno y de hidrógeno. En la **Figura 27C2** se observan cambios conformacionales importantes en el ligante, con un valor de RMSD de 3.26 Å.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con HIF-1 β /5V0L se observan en la **Figura 27A3**. Se observan poses idénticas, que se encuentran en el dominio de PAS-A y

bHLH. La interacción en el dominio bHLH, al igual que para PT2385 es una interacción débil de tipo van der Waals. Para las interacciones que involucran al dominio de PAS-A, en el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 27B3**, se observan interacciones de tipo π -alquilo con Lys-73, de puente de hidrógeno con Leu-84 y π -azufre con Tyr 155. También se observan puentes de halógeno con Val-170 y Ala-171, no son aminoácidos que pertenecen al dominio de PAS-A, sin embargo estas interacciones estabilizan al complejo, obteniéndose una energía de interacción de -9.8 kcal/mol en ambos casos. En la **Figura 27C3** se observa que el ligante no presenta cambios conformacionales y se obtuvo un valor de RMSD de 0.0005 Å.

En la **Figura 27A4** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2977 con HIF-1 β /5V0L. Se muestran poses idénticas con interacciones formadas con aminoácidos del dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 27B4**, en el acoplamiento semiflexible se muestran dos interacciones de tipo π -alquilo con Lys-73 y Leu-84, y un puente de hidrógeno con Leu-84. Mientras que en el acoplamiento rígido, además de las mismas interacciones observadas en el acoplamiento semiflexible, se observa un puente de halógeno con Asp-69. Sin embargo, esta interacción no afecta el valor de la energía de interacción, ya que es muy similar en ambos casos, con valor de -7.9 kcal/mol y -8.0 kcal/mol, para los acoplamiento semiflexible y rígido, respectivamente. En la **Figura 27C4** no se observaron cambios en la conformación del ligante, con un valor de RMSD de 0.0006 Å.

En general, de la **Figura 27** se puede observar que en los acoplamiento con HIF-1 β /5V0L, el cual solamente tiene dominio PAS-A, todos los ligantes mostraron interacción con aminoácidos de este dominio en ambos acoplamiento, además en el caso de los ligantes 0X3, PT2385 y PT2399, mostraron interacción con el dominio de bHLH, sin embargo estas interacciones fueron de tipo π -alquilo con 0X3 y de van der Waals con PT2385 y PT2399. En todos los casos se observaron interacciones de tipo π -alquilo y de puente de hidrógeno, excepto para el ligante PT2385 en el acoplamiento rígido. De los cuatro complejos con HIF-1 β /5V0L, se obtuvo la mejor energía de interacción en el complejo 5V0L-PT2399 con -9.8 kcal/mol en ambos acoplamiento, como se observa en la **Tabla 10**. En este complejo las

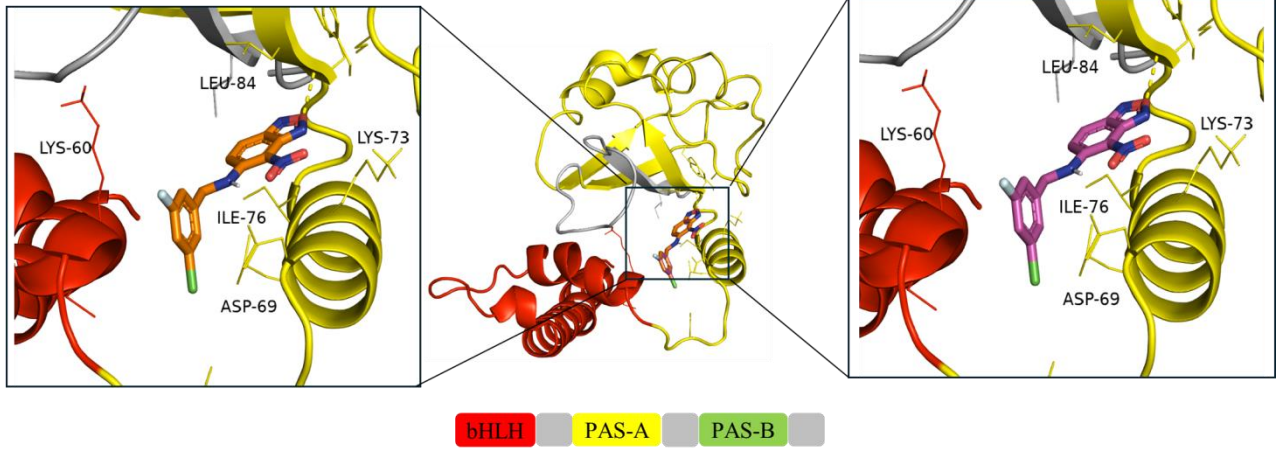
interacciones de puente de hidrógeno y la π -azufre le confieren una gran estabilidad al complejo.

HIF-1 β (5V0L)/0X3

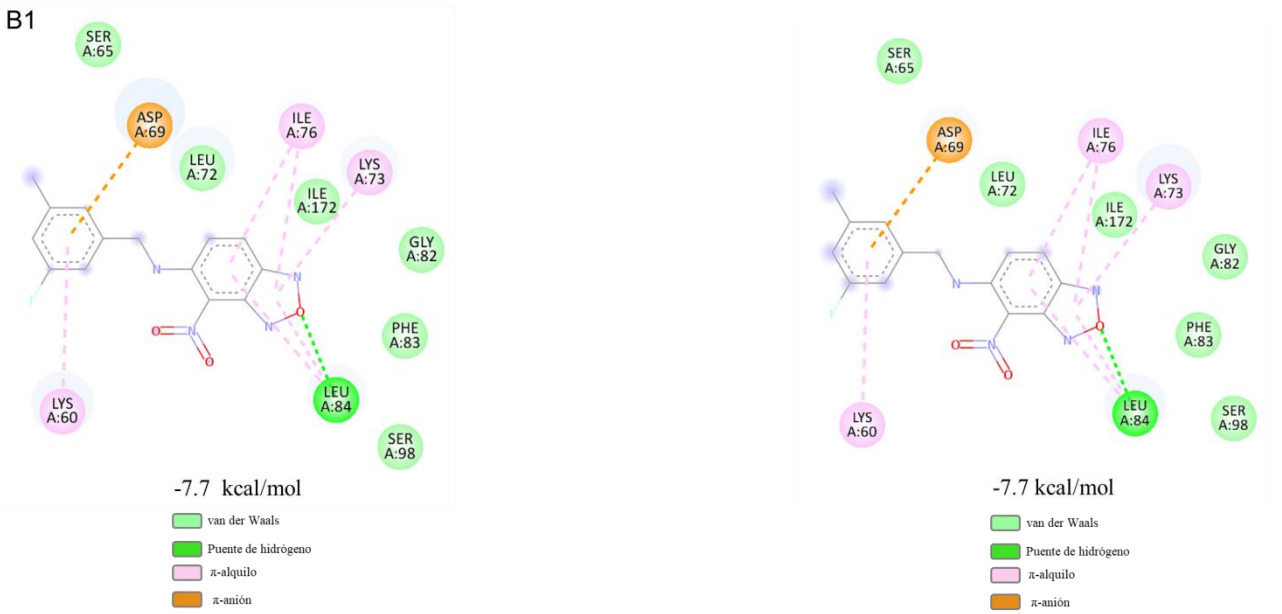
Semiflexible

Rígido

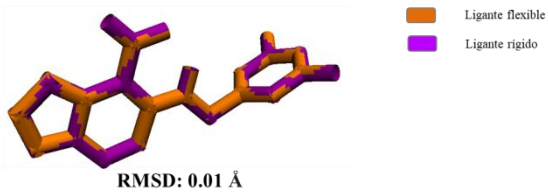
A1



B1



C1

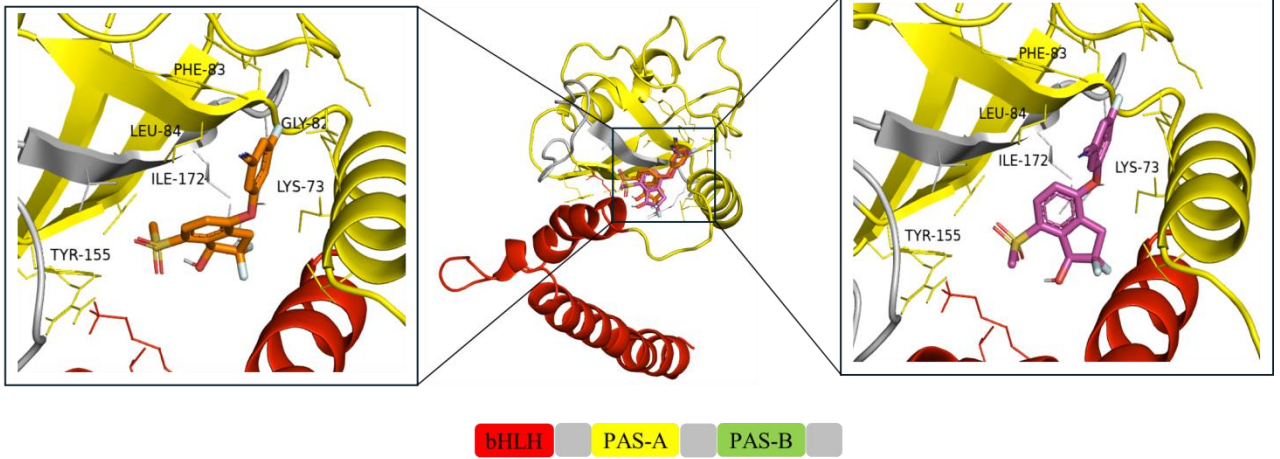


HIF-1 β (5V0L)/PT2385

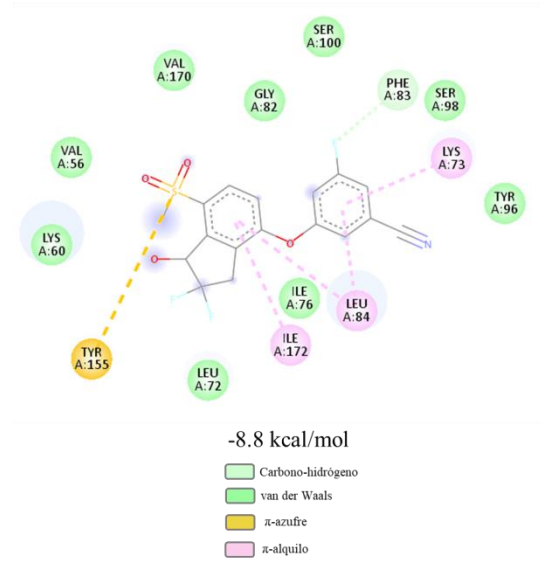
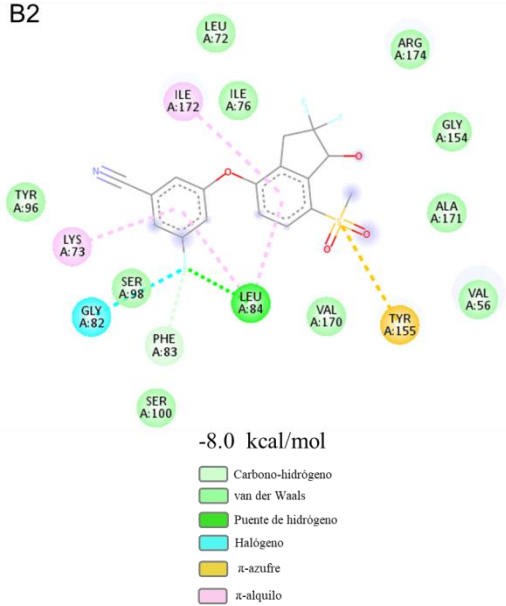
Semiflexible

Rígido

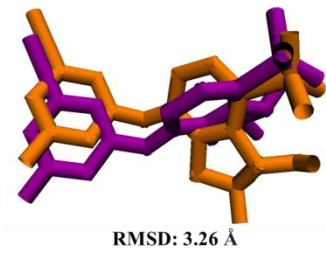
A2



B2



C2



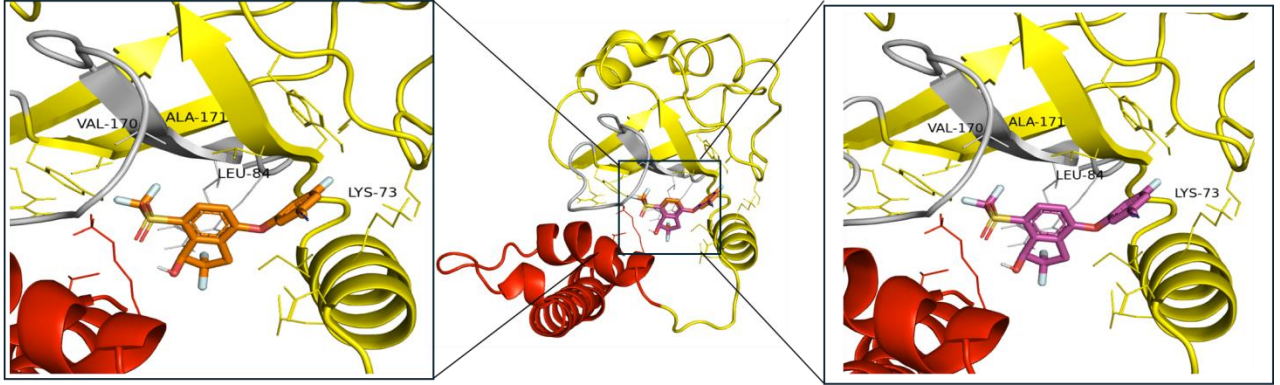
■ Ligante flexible
■ Ligante rígido

HIF-1 β (5V0L)/PT2399

Semiflexible

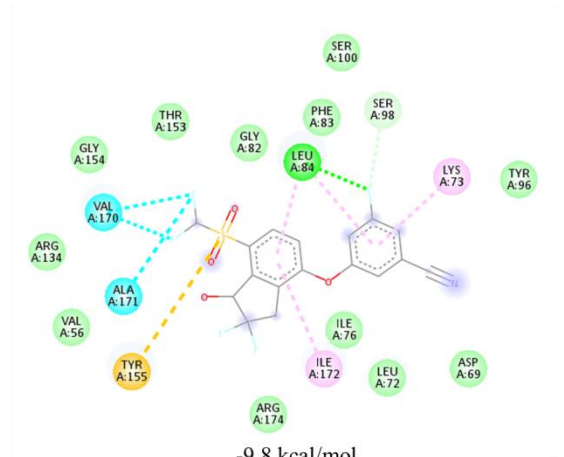
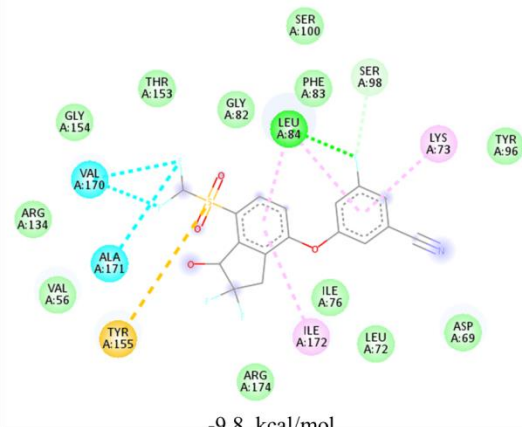
Rígido

A3



bHLH PAS-A PAS-B

B3



■ Carbono-hidrógeno
■ van der Waals
■ Puente de hidrógeno
■ Halógeno
■ π -azufre
■ π -alquilo

■ Carbono-hidrógeno
■ van der Waals
■ Puente de hidrógeno
■ Halógeno
■ π -azufre
■ π -alquilo

C3



■ Ligante flexible
■ Ligante rígido

RMSD: 0.0005 Å

HIF-1 β (5V0L)/PT2977

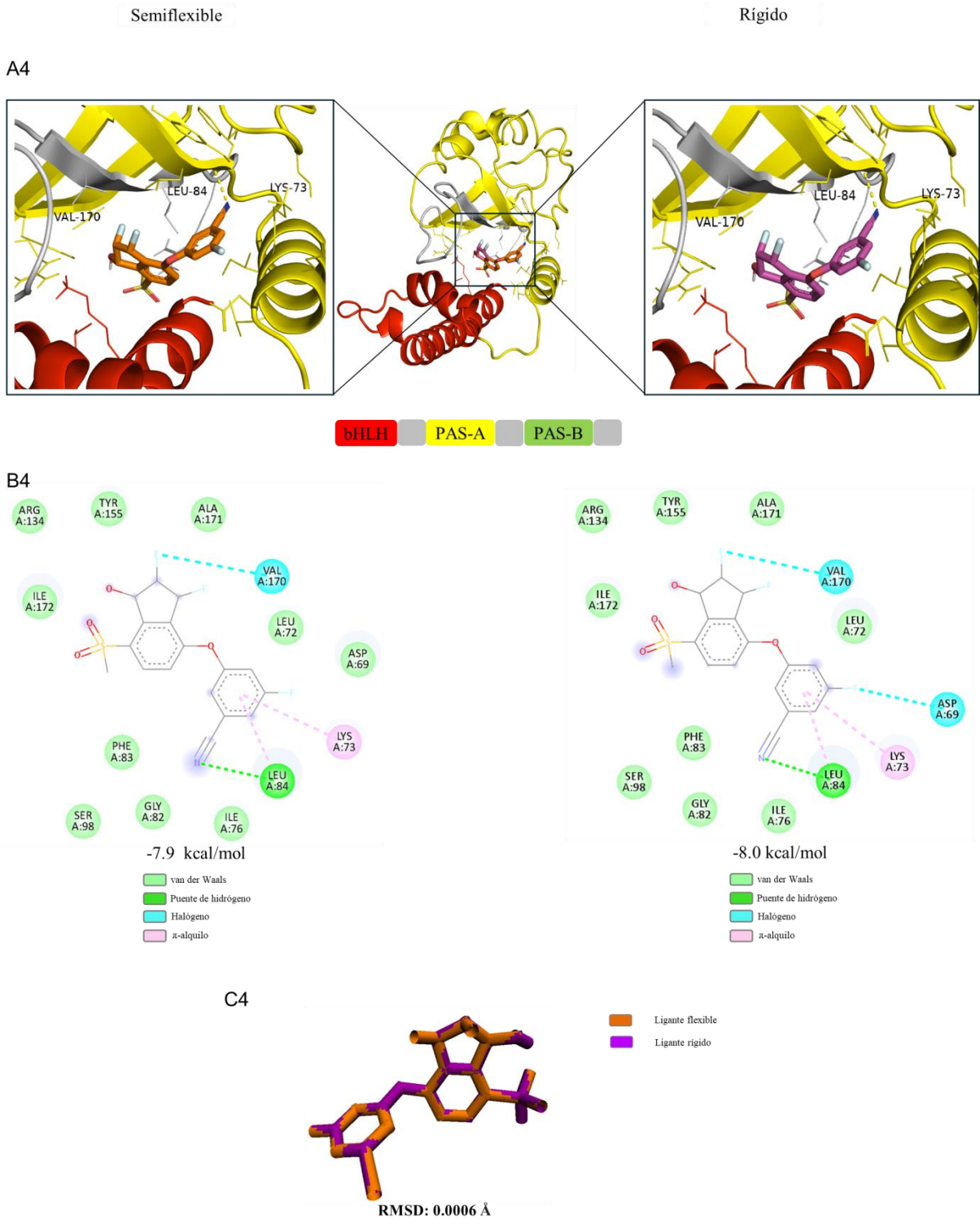


Figura 27. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el *template* 5V0L.

En la **Figura 28A1** se muestran los acoplamiento semiflexible y rígido de 0X3 con el modelado múltiple de HIF-1 β /M_M. Se observa que se encontraron poses diferentes en los dos acoplamiento, pero ambas dentro del dominio de PAS-A (46-138) para el *template* de modelado múltiple, M_M, ver **Figura 19** y **Tabla 8**. En la **Figura 28B1** en el diagrama de interacciones 2D, en el acoplamiento semiflexible se observa una sola interacción de tipo π - π con Phe-88. Mientras que en el acoplamiento rígido, se observan interacciones dos interacciones de tipo π -alquilo con Pro-83 y Pro-133. Con este modelo se obtuvieron las energías más altas con valores de -4.7 kcal/mol y -5.1 kcal/mol, para los acoplamiento semiflexible y rígido, respectivamente. En la **Figura 28C1** se observan ligeros cambios conformacionales del ligante 0X3, con un valor de RMSD de 1.2447 Å.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2385 con el modelado múltiple de HIF-1 β /M_M se muestran en la **Figura 28A2**. Se observan poses diferentes, interactuando con aminoácidos del dominio PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 28B2**, se observa que en el acoplamiento semiflexible existen dos interacciones de puente de hidrógeno con Val-70 y Ser-85, dos interacciones de tipo π - π con Phe-88 y una interacción de tipo π -azufre con Tyr-71. En el acoplamiento rígido, también se observan dos interacciones de puente de hidrógeno pero con aminoácidos diferentes, Arg-68 y Gly-89, además de un puente de halógeno con Val-69. En este caso no se observa interacción de tipo π -azufre como en el acoplamiento semiflexible. Como en el caso anterior, también se obtuvieron energías de interacción altas en ambos acoplamiento con valor de -5.6 kcal/mol, a pesar de presentar interacciones de puente de hidrógeno, halógeno o π -azufre. El ligante sufre cambios conformacionales relevantes, como se observa en la **Figura 28C2**, con un valor de RMSD de 3.3443 Å.

Los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2399 con el modelado múltiple de HIF-1 β /M_M se muestran en la **Figura 28A3**. Se observan poses idénticas que se encuentran dentro del dominio de PAS-A. En el diagrama de interacciones 2D de la **Figura 28B3**, se observan dos interacciones de tipo puente de hidrógeno con Arg68 y Gly-89, dos de puente de halógeno con Val-70 y Gln-84, y una interacción de tipo π - π con Phe-88. A pesar de presentar estas interacciones relevantes de puente de hidrógeno y halógeno dentro del dominio de PAS-A, se obtuvo una energía de interacción alta de -6.1 kcal/mol en ambos casos. En la **Figura**

28C3 no se observaron cambios conformacionales en el ligante, con un valor de RMSD de 0.0007 Å.

Finalmente, los acoplamiento semiflexible y rígido de PT2977 con el modelado múltiple de HIF-1 β /M_M se muestran en la **Figura 28A4**. Se observan poses similares interactuando con aminoácidos del dominio PAS-A. El diagrama de interacciones 2D de la **Figura 28B4**, muestra en el acoplamiento semiflexible únicamente interacciones de tipo carbono-hidrógeno y van der Waals. Mientras que en el acoplamiento rígido, además de las interacciones carbono-hidrógeno y van der Waals observadas en el acoplamiento semiflexible, también existe una interacción de puente de halógeno con Ser-130. Sin embargo, esta diferencia en las interacciones observadas, no afecta el valor de la energía de interacción, la cual es de -5.5 kcal/mol, en ambos acoplamiento. En la **Figura 28C4**, se observa que el ligante presenta cambios conformacionales importantes, como lo indica el valor de RMSD de 3.1302 Å.

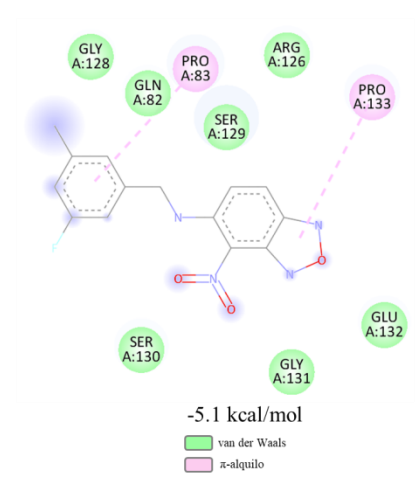
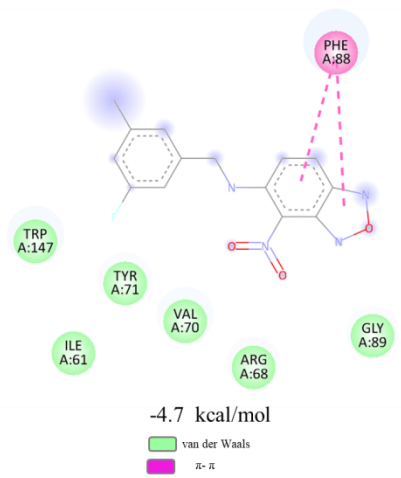
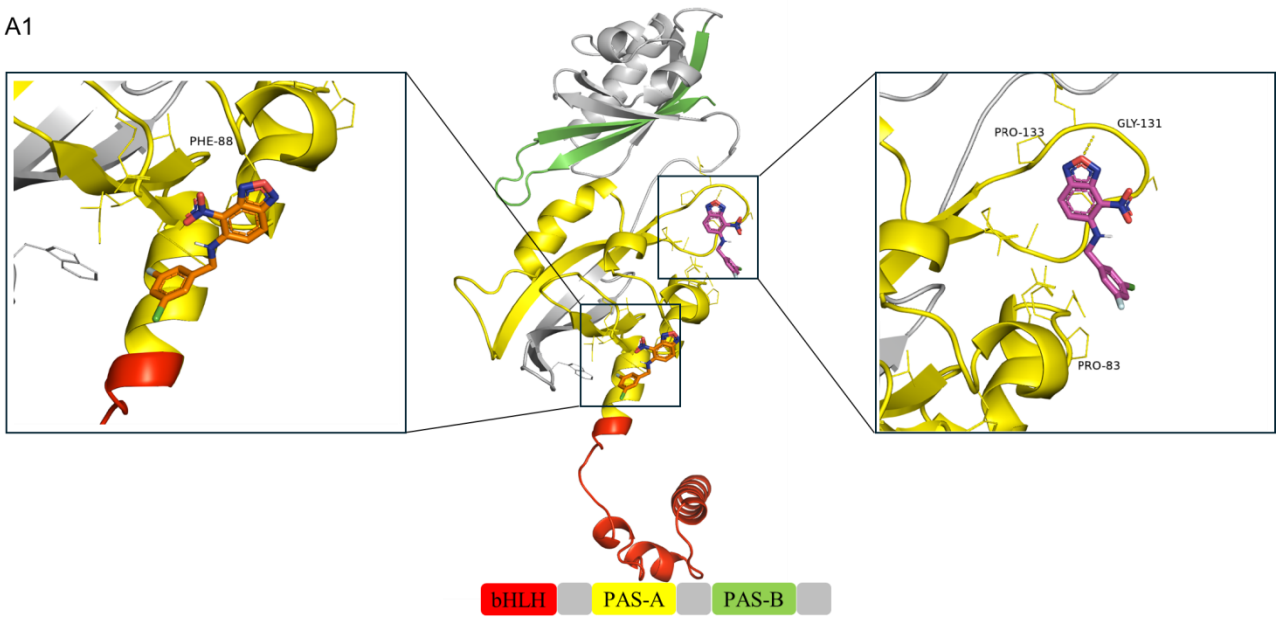
En general, de la **Figura 28** se puede observar que en los acoplamiento con el *template* de modelado múltiple HIF-1 β /M_M, todos los ligantes interactúan con aminoácidos del dominio PAS-A en ambos tipos de acoplamiento. Únicamente se observaron interacciones de puente de hidrógeno o halógeno con los ligantes PT2385 y PT2399. La interacción π -azufre solo se observó en el acoplamiento semiflexible con PT2385. A pesar de que en algunos casos se observaron estas interacciones relevantes, en los cuatro complejos con HIF-1 β /M-M, se obtuvieron los valores de energía de interacción más altos en un intervalo de -4.7 a -6.1 kcal/mol en ambos acoplamiento, como se observa en la **Tabla 10**.

HIF-1 β (M_M)/0X3

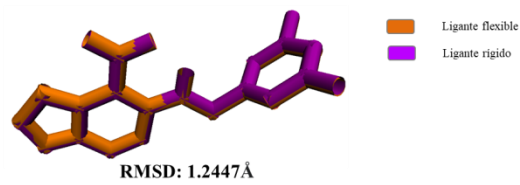
Semiflexible

Rígido

A1



C1

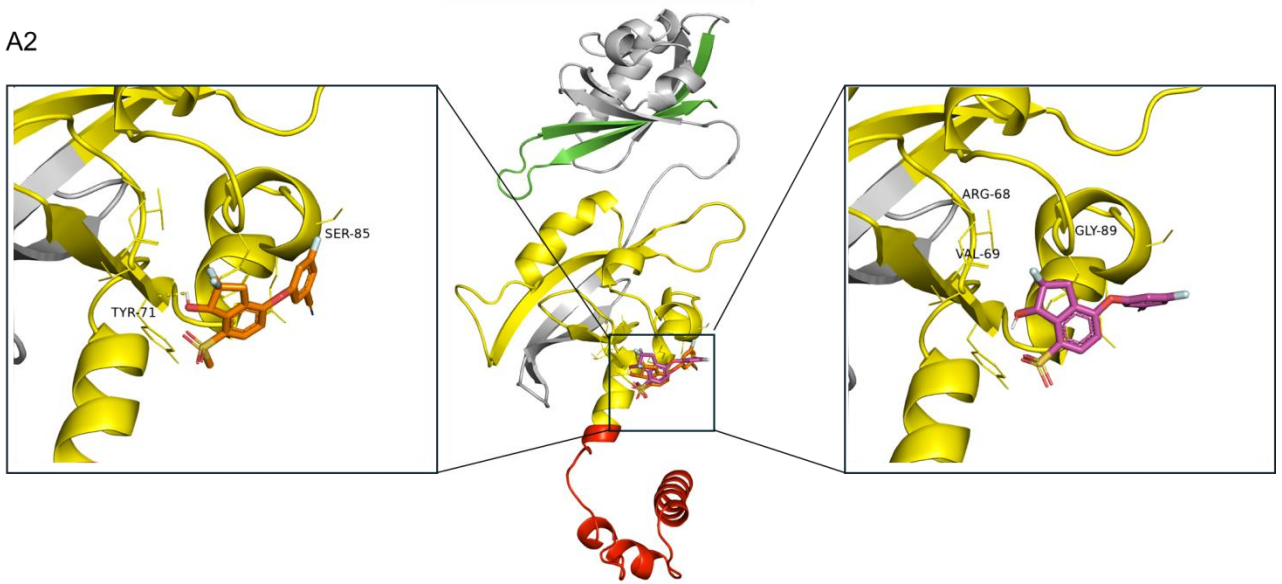


HIF-1 β (M_M)/PT2385

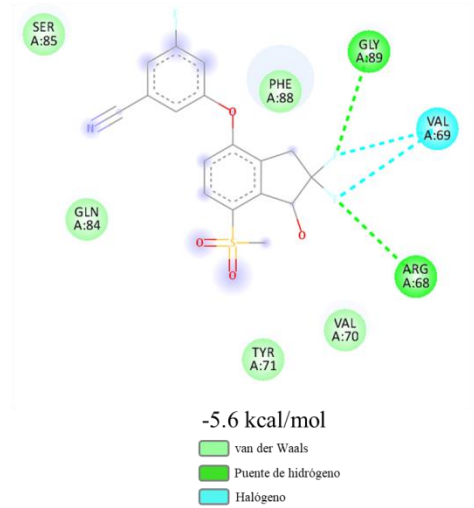
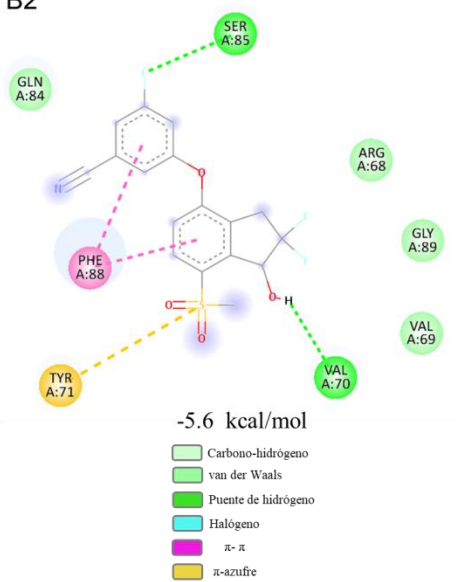
Semiflexible

Rígido

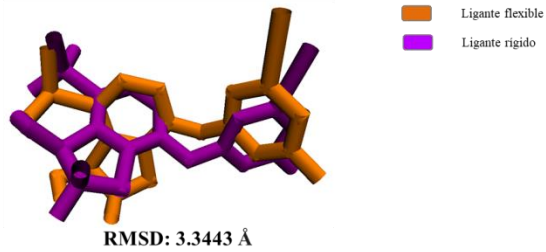
A2



B2



C2

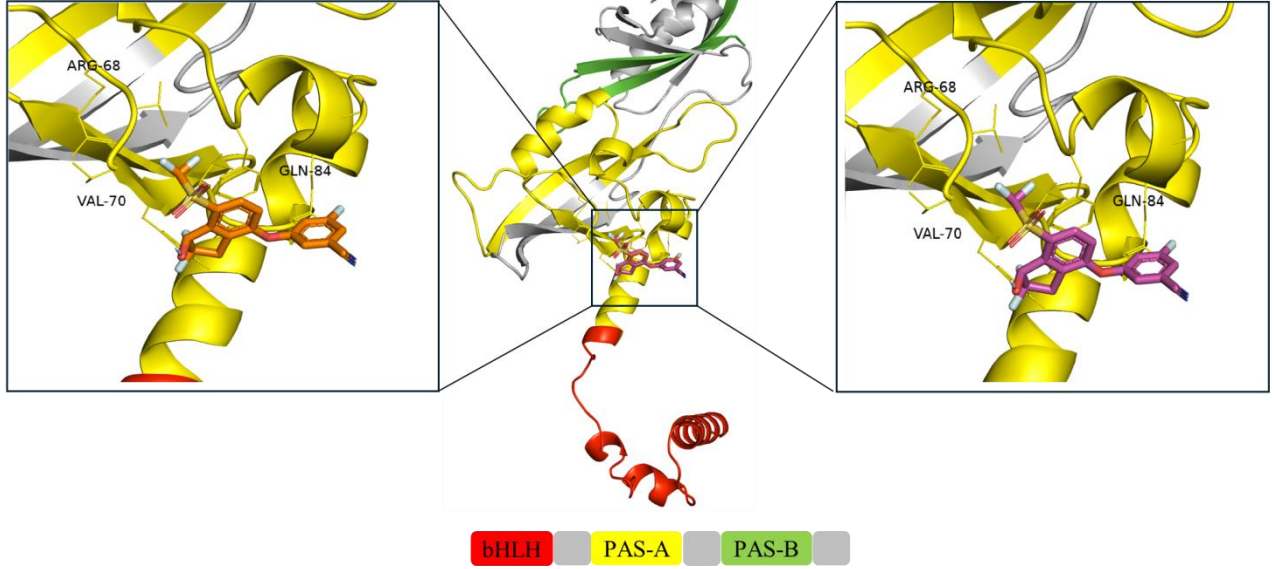


HIF-1 β (M_M)/PT2399

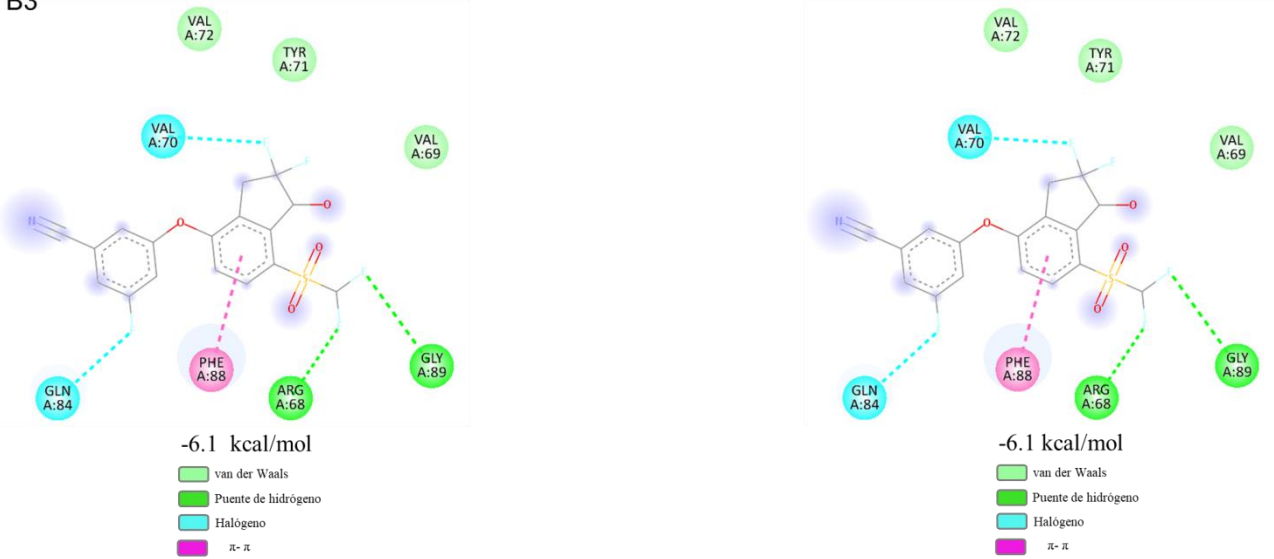
Semiflexible

Rígido

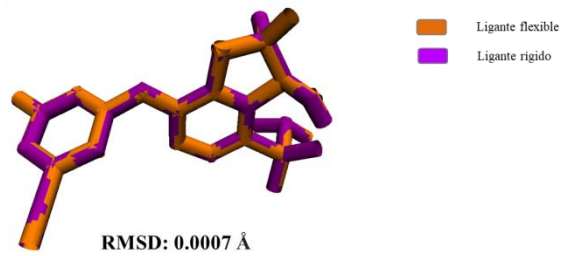
A3



B3



C3



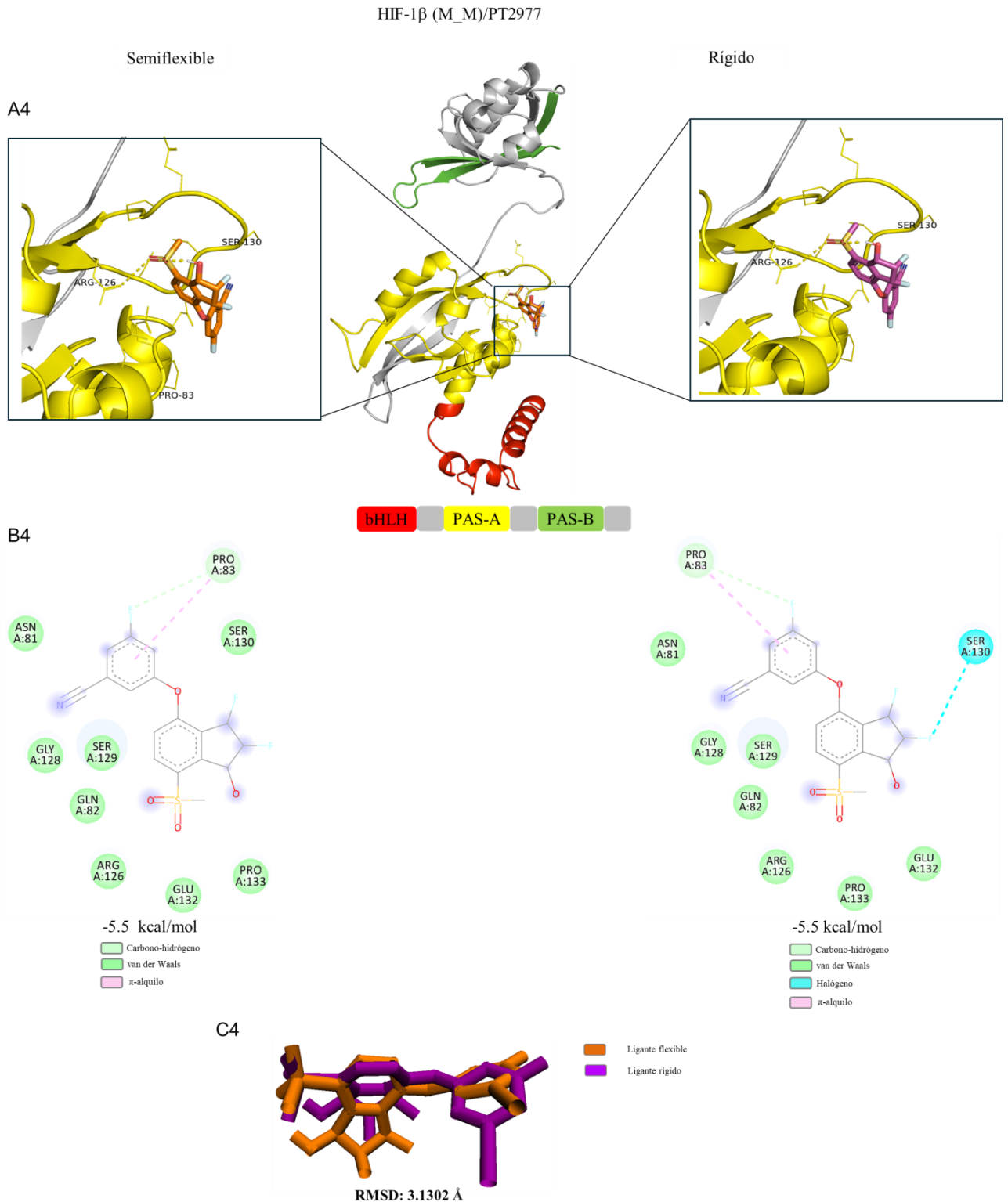


Figura 28. Representación gráfica 3D y diagrama de interacciones 2D del acoplamiento molecular de los inhibidores con HIF-1 β de humano con el *template* mixto.

En la **Tabla 10** se resumen las energías de interacción obtenidas en los cálculos de acoplamiento semiflexible y rígido para todos los complejos ligante-receptor con HIF-1 β . En general, se observa que las mejores energías de interacción se obtuvieron con el ligante PT-2399, al igual que en los acoplamientos con HIF-1 α . Los mejores valores de energías de interacción son de los complejos **5V0L-PT2399** (-9.8 kcal/mol) y **5Y7Y-PT2399** (-9.4 kcal/mol), obtenidas en ambos acoplamientos semiflexible y rígido. En este caso, los acoplamientos con el *template* de modelado múltiple dieron las peores energías de interacción, con valores muy altos con todos los ligantes en ambos acoplamientos.

Tabla 10. Energías de interacción (kcal/mol) entre las moléculas inhibitoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 β de humano usando acoplamiento semiflexible y rígido.

Complejo ligante-receptor	Acoplamiento semiflexible	Acoplamiento rígido
4ZP4-0X3	-7.5	-8.0
4ZP4-PT2385	-7.0	-7.7
4ZP4-PT2399	-8.6	-8.6
4ZP4-PT2977	-7.6	-7.6
7V7L-0X3	-7.7	-7.7
7V7L-PT2385	-7.9	-8.8
7V7L-PT2399	-8.7	-8.7
7V7L-PT2977	-8.5	-8.5
5Y7Y-0X3	-7.7	-7.7
5Y7Y-PT2385	-7.4	-8.2
5Y7Y-PT2399	-9.4	-9.4
5Y7Y-PT2977	-8.0	-8.0
5V0L-0X3	-7.7	-7.7
5V0L-PT2385	-8.0	-8.8
5V0L-PT2399	-9.8	-9.8
5V0L-PT2977	-7.9	-8.0
M_M-0X3	-4.7	-5.1
M_M-PT2385	-5.6	-5.6
M_M-PT2399	-6.1	-6.1
M_M-PT2977	-5.5	-5.5

En la **Tabla 11** se resumen los resultados de los cálculos de acoplamiento molecular de los cuatro inhibidores (OX3, PT2385, PT2399 y PT2977) con las estructuras modeladas de HIF-1 α / β . Es importante mencionar que en los acoplamientos con todos los modelos de HIF-1 α y de HIF-1 β , todas las poses se encontraron tanto en el dominio de PAS-A, en PAS-B o en ambos dominios. Esto indica que la interacción de los ligantes con aminoácidos de estos dominios de la proteína es el mecanismo más probable por el cual actúan para inhibir la dimerización de HIF-1. Se observa que en los acoplamientos con las estructuras modeladas de HIF-1 α , las interacciones se realizaron en PAS-A o bien en PAS-A y PAS-B, mientras que en los acoplamientos con las estructuras de HIF-1 β las interacciones se llevaron a cabo mayoritariamente en el dominio de PAS-A. En algunos casos de los acoplamientos con HIF-1 β , también se observaron interacciones débiles con el dominio bHLH. Los valores de energía de interacción en la mayoría de los casos fueron similares o iguales tanto en el acoplamiento semiflexible como en el rígido. En general, se obtuvieron mejores energías de interacción en los acoplamientos con HIF-1 α que con HIF-1 β . Las mejores energías de interacción se obtuvieron con el ligante PT2399 que contiene cinco átomos de flúor en su estructura. En los acoplamientos con mejores energías de interacción están involucradas mayoritariamente interacciones de puente de hidrógeno y de halógeno.

Tabla 11. Resumen del análisis de resultados de acoplamiento molecular de las moléculas de las moléculas inhibitoras y las diferentes estructuras modeladas de HIF-1 α/β de humano.

Complejo ligante-receptor	Poses 3D	RMSD (Å)	Energía (kcal/mol)	Dominios	Interacciones	Energía (kcal/mol)	Dominios	Interacciones
4ZP4-0X3	Similares	1.79	-9.0	PAS-A	π - σ , π -Alq(3), Hid, Hal	-7.6	PAS-A	π - σ , π -Alq(2), Hid(2)
4ZP4-PT2385	Diferentes	3.36	-7.1	PAS-A	Hid	-8.6	PAS-A	π -Alq(3)
4ZP4-PT2399	Idénticas	0.0	-8.8	PAS-A/B	Hid, Hal, π -Alq	-8.8	PAS-A/B	Hid, Hal, π -Alq
4ZP4-PT2977	Diferentes	1.72	-8.7	PAS-A	π - σ , Hid(2), π -Alq	-7.9	PAS-A/B	Hid(2), Hal, π -cat
4ZPR-0X3	Diferentes	1.63	-8.4	PAS-A	π -Alq(3)	-8.5	PAS-A	π - π , π -Alq(3)
4ZPR-PT2385	Diferentes	3.36	-8.4	PAS-A	π - π , π -Alq	-8.7	PAS-A/B	π - π , π -cat, Hid(2)
4ZPR-PT2399	Idénticas	0.0	-9.8	PAS-A	π -Alq(2), Hal	-9.8	PAS-A	π -Alq(2), Hal
4ZPR-PT2977	Idénticas	0.0	-8.0	PAS-A/B	π - π , Hid(3)	-7.9	PAS-A/B	π - π , Hid(2)
63ET-0X3	Idénticas	0.0	-8.2	PAS-A	π -Alq, desfav	-8.2	PAS-A	π -Alq, desfav
63ET-PT2385	Diferentes	2.28	-8.1	PAS-A	π -Alq, Hid	-9.1	PAS-A	Hid(3), Hal
63ET-PT2399	Idénticas	0.0	-9.5	PAS-A/B	Hid(2), Hal(2),	-9.4	PAS-A/B	Hal(2), Hid
63ET-PT2977	Diferentes	1.82	-9.1	PAS-A	Hid(2), Hal, π -Alq	-8.6	PAS-A	π - π , Hid, Hal(2), π -Alq
M_M-0X3	Diferentes	1.40	-7.8	PAS-A	π -Alq(3), π - π , Hal	-8.0	PAS-A/B	π -Alq(2), Hal, Hid(2)
M_M-PT2385	Diferentes	1.79	-7.4	PAS-B	Hal, Hid, π - π	-8.4	PAS-A	π -Alq, Hal(2), Hid
M_M-PT2399	Idénticas	0.0	-9.3	PAS-A/B	Hid(2), Hal(4)	-9.2	PAS-A/B	Hid(2), Hal(4)
M_M-PT2977	Idénticas	0.0	-8.5	PAS-A	π -Alq(2), Hal, π -cat	-8.5	PAS-A	π -Alq(2), Hal, π -cat
Complejo ligante-receptor	Poses 3D	RMSD (Å)	Energía (kcal/mol)	Dominios	Interacciones	Energía (kcal/mol)	Dominios	Interacciones
4ZP4-0X3	Diferentes	1.48	-7.5	PAS-A	π -cat	-8.0	PAS-A/B	π -cat, π -Alq, π - σ , Hid, Hal
4ZP4-PT2385	Diferentes	3.32	-7.0	PAS-A	π - σ , π -Alq, Hid(3)	-7.7	PAS-A	π -cat, Hid
4ZP4-PT2399	Idénticas	0.0	-8.6	PAS-A/B	π - σ , Hal(2)	-8.6	PAS-A/B	π - σ , Hal(2)
4ZP4-PT2977	Idénticas	0.0	-7.6	PAS-A	π -Alq y π - σ	-7.6	PAS-A	π -Alq y π - σ
7V7L-0X3	Idénticas	0.0	-7.7	PAS-A/B	Hid, π - π , π -Alq	-7.7	PAS-A/B	π -Alq(3), Hid
7V7L-PT2385	Diferentes	3.36	-7.9	PAS-A/B	π -Alq, π -Amid, Hid, π -Anión	-8.8	PAS-A/B	π -Alq, Hal(4)
7V7L-PT2399	Idénticas	0.0	-8.7	PAS-A/B	Hal(5), π -S, π -Alq	-8.7	PAS-A/B	Hal(5), π -S, π -Alq
7V7L-PT2977	Idénticas	0.0	-8.5	PAS-A/B	Hid, Hal(4)	-8.5	PAS-A/B	Hid, Hal(4)
5Y7Y-0X3	Idénticas	0.0	-7.7	PAS-A	π -Alq(3)	-7.7	PAS-A	π -Alq(3)
5Y7Y-PT2385	Diferentes	2.6	-7.4	PAS-A	Hid(2), π -Alq(2)	-8.2	PAS-A	Hid, Hal(2), π -cat, π - π
5Y7Y-PT2399	Similares	1.73	-9.4	PAS-A	π -Alq, Hid(2)	-9.4	PAS-A	π -Alq, Hid(2)
5Y7Y-PT2977	Idénticas	0.0	-8.0	PAS-A	π -cat, π - π , π -Alq, Hid	-8.0	PAS-A	π -cat, π - π , π -Alq, Hid
5V0L-0X3	Idénticas	0.0	-7.7	PAS-A	π -Alq(5), π -Anión, Hid	-7.7	PAS-A	π -Alq(5), π -Anión, Hid
5V0L-PT2385	Similares	3.26	-8.0	PAS-A	π -Alq, Hal, Hid, π -S	-8.8	PAS-A	π -Alq(2), π -S
5V0L-PT2399	Idénticas	0.0	-9.8	PAS-A	π -Alq, Hid, π -S	-9.8	PAS-A	π -Alq, Hid, π -S
5V0L-PT2977	Similares	0.0	-7.9	PAS-A	π -Alq(2), Hid	-8.0	PAS-A	π -Alq(2), Hid, Hal
M_M-0X3	Diferentes	1.25	-4.7	PAS-A	π - π	-5.1	PAS-A	π -Alq(2)
M_M-PT2385	Diferentes	3.34	-5.6	PAS-A	Hid(2), π - π (2), π -S	-5.6	PAS-A	Hid(2), Hal
M_M-PT2399	Idénticas	0.0	-6.1	PAS-A	Hid(2), Hal(2), π - π	-6.1	PAS-A	Hid(2), Hal(2), π - π
M_M-PT2977	Similares	3.13	-5.5	PAS-A	C-H, vdW	-5.5	PAS-A	C-H, vdW, Hal

CONCLUSIONES

Se realizaron cálculos de optimización de los inhibidores 0X3, PT2399, PT3485 y PT2977 (Belzutifán) usando dos niveles de teoría, B3LYP/6-31+G(d) y B3LYP/6-311+G(d, p). Se analizó el valor de RMSD de las moléculas optimizadas respecto a los valores reportados experimentalmente, donde se observó que no hubo variación significativa, con la mayor diferencia de 1 Å entre la estructura de PT2399 optimizada con el nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) y la estructura reportada experimentalmente. La comparación entre las estructuras moleculares optimizadas entre ambos niveles de teoría dieron valores menores a un 0.1 Å en la mayoría de los casos y con la mayor diferencia de 0.75 Å para PT2399, indicando que ambos niveles de teoría dan resultados similares en las estructuras optimizadas.

Los alineamientos de las estructuras de HIF-1 α con los *templates* 4ZP4, 4ZPR y 6E3T y de HIF-1 β con los *templates* 4ZP4, 7V7L, 5Y7Y y 5V0L, mostraron buenos resultados en los estadísticos de conservación y calidad, lo que indica que aunque hay modificaciones en las secuencias de aminoácidos las propiedades fisicoquímicas no cambian, por lo que no se espera un cambio estructural y funcional significativo de la estructura modelada. Por otro lado, en la estructura obtenida con los tres *templates* para HIF-1 α y cuatro *templates* para HIF-1 β en el modelado múltiple, se observaron valores más altos en los estadísticos de conservación y calidad, puesto que se utilizan todos los *templates* para generar el modelo final.

El complejo HIF-1 se forma a partir de la dimerización de los monómeros HIF-1 α y HIF-1 β mediante la interacción de los dominios de PAS-A y PAS-B, responsables para la formación del complejo que da respuesta a la condición de hipoxia en las células cancerígenas. Por lo que se propone que la interacción de los ligantes con aminoácidos de estos dominios de la proteína es el mecanismo por el cual actúan para inhibir la dimerización de HIF-1. Las mejores poses obtenidas de todos los acoplamiento moleculares, tanto con las estructuras modeladas de HIF-1 α como de HIF-1 β , mostraron interacciones con el dominio de PAS-A, PAS-B o en ambos dominios. En algunos casos, en los acoplamiento con HIF-1 β , también se observaron interacciones en el dominio bHLH. Se realizaron acoplamiento semiflexibles y rígidos, obteniendo valores de energía de interacción similares en la mayoría de los casos.

En general, se obtuvieron mejores energías de interacción en los acoplamientos con HIF-1 α que con HIF-1 β . En ambos casos, el ligante PT2399 que contiene cinco átomos de flúor en su estructura, fue el que dio mejores resultados en los acoplamientos moleculares, especialmente con las estructuras modeladas de HIF-1 α con los *templates* 4ZPR, 63ET y el modelado múltiple, y con las estructuras modeladas de HIF-1 β con los *templates* 5V0L y 5Y7Y. Las interacciones más relevantes observadas en los complejos ligante-proteína fueron de puente de hidrógeno y de halógeno.

Es importante resaltar que si bien la literatura menciona que los inhibidores tienen actividad para bloquear la dimerización de los monómeros de HIF-1 α/β , y pueden hacerlo interactuando en los dominios de PAS-A/B, también la unión de los inhibidores en residuos pertenecientes al dominio de bHLH puede evitar la formación del complejo de HIF-1.

Como perspectivas de este proyecto, es de interés realizar estudios de acoplamiento molecular proteína/proteína de los monómeros α/β , además de realizar simulaciones de dinámica molecular para conocer si hay alguna modificación conformacional que haga que los monómeros no se puedan dimerizar o si simplemente exista un impedimento estérico por parte de los ligantes al estar dentro de los bolsillos de PAS-A/B. También es de interés utilizar otros inhibidores modelados mediante técnicas de búsqueda virtual para probar que se dirijan a los dominios de PAS-A/B y se obtengan mejores energías de interacción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Semenza, G. L. (2010). Oxygen homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(3), 336-361.
2. Taylor, C. T., & McElwain, J. C. (2010). Ancient atmospheres and the evolution of oxygen sensing via the hypoxia-inducible factor in metazoans. *Physiology*, 25(5), 272-279.
3. Schönberger, T., Fandrey, J., & Prost-Fingerle, K. (2021). Ways into understanding HIF inhibition. *Cancers*, 13(1), 159.
4. Luo, W., & Wang, Y. (2019). Hypoxia mediates tumor malignancy and therapy resistance. *Hypoxia and Cancer Metastasis*, 1-18.
5. Batchelder, R. M., Wilson, W. R., Hay, M. P., & Denny, W. A. (1996). Oxygen dependence of the cytotoxicity of the enediyne anti-tumour antibiotic esperamicin A1. *The British Journal of cancer. Supplement*, 27, S52.
6. Gray, L. H., Conger, A., Ebert, M., Hornsey, S., & Scott, O. C. A. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*, 26(312), 638-648.
7. Huis in't Veld, R. V., Heuts, J., Ma, S., Cruz, L. J., Ossendorp, F. A., & Jager, M. J. (2023). Current Challenges and Opportunities of Photodynamic Therapy against Cancer. *Pharmaceutics*, 15(2), 330.
8. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51.
9. Ikeda, H., & Kakeya, H. (2021). Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with natural. *The Journal of Antibiotics*, 74(10), 687-695.
10. Ristow, M. (2006). Oxidative metabolism in cancer growth. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(4), 339-345.
11. Bacardí, K. R., & Castellanos, M. S. R. (2013). Virus oncogénicos. *Revista Cubana de Genética Comunitaria*, 7(2), 4-11.
12. Seyfried, T. N., & Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutrition & metabolism*, 7, 1-22.
13. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
14. Bertout, J. A., Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 967-975.
15. Rytönen, K. T., Williams, T. A., Renshaw, G. M., Primmer, C. R., & Nikinmaa, M. (2011). Molecular evolution of the metazoan PHD-HIF oxygen-sensing system. *Molecular biology and evolution*, 28(6), 1913-1926.
16. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51.

17. DeVita Jr, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21), 8643-8653.
18. Corrie, P. G. (2008). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 36(1), 24-28.
19. Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437-447.
20. Harris, A. L. (2002). Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews cancer*, 2(1), 38-47.
21. Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., & Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell*, 3(4), 347-361.
22. Barnett, G. C., West, C. M., Dunning, A. M., Elliott, R. M., Coles, C. E., Pharoah, P. D., & Burnet, N. G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 134-142.
23. Gray, L. H., Conger, A., Ebert, M., Hornsey, S., & Scott, O. C. A. (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*, 26(312), 638-648.
24. Nakaoka, H. J., Tanei, Z., Hara, T., Weng, J. S., Kanamori, A., Hayashi, T., ... & Sakamoto, T. (2017). Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin $\alpha 5 \beta 1$ and tumour growth. *Oncogenesis*, 6(5), e334-e334.
25. Maxwell, P. H., & Eckardt, K. U. (2016). HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nature Reviews Nephrology*, 12(3), 157-168.
26. Ma, Q., Reiter, R. J., & Chen, Y. (2020). Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions. *Angiogenesis*, 23, 91-104.
27. Bishop, T., & Ratcliffe, P. J. (2015). HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. *Circulation research*, 117(1), 65-79.
28. Fukai, K., Nakamura, A., Hoshino, A., Nakanishi, N., Okawa, Y., Ariyoshi, M., ... & Matoba, S. (2015). Pyk2 aggravates hypoxia-induced pulmonary hypertension by activating HIF-1 α . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 308(8), H951-H959.
29. Brown, J. M., & Wilson, W. R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 437-447 (24).
30. Luo, W., & Wang, Y. (2019). Hypoxia mediates tumor malignancy and therapy resistance. *Hypoxia and Cancer Metastasis*, 1-18.
31. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2: a006536 (como dice el paper) Dudley, A. C. (2012). Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(3). (20).
32. Chen, A., Sceneay, J., Gödde, N., Kinwel, T., Ham, S., Thompson, E. W., ... & Möller, A. (2018). Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene*, 37(31), 4214-4225.

33. Luo, W., & Wang, Y. (2019). Hypoxia mediates tumor malignancy and therapy resistance. *Hypoxia and Cancer Metastasis*, 1-18.
34. Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51.
35. Chao, Y. A. N. G., Zhong, Z. F., Sheng-Peng, W. A. N. G., Chi-Teng, V. O. N. G., Bin, Y. U., & Yi-Tao, W. A. N. G. (2021). HIF-1: Structure, biology and natural modulators. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 19(7), 521-527.
36. Burtscher, J., Hohenauer, E., Burtscher, M., Millet, G. P., & Egg, M. (2023). Environmental and behavioral regulation of HIF-mitochondria crosstalk. *Free Radical Biology and Medicine*, 63-67.
37. Joshi, E., Pandya, M., & Desai, U. (2023). Current Drugs and Their Therapeutic Targets for Hypoxia-inducible Factors in Cancer. *Current Protein & Peptide Science*, 24(6), 447-464.
38. Rashid, M., Zadeh, L. R., Baradaran, B., Molavi, O., Ghesmati, Z., Sabzichi, M., & Ramezani, F. (2021). Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene*, 798, 145796.
39. Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389.
40. Schönberger, T., Fandrey, J., & Prost-Fingerle, K. (2021). Ways into understanding HIF inhibition. *Cancers*, 13(1), 159.
41. Magliulo, D., & Bernardi, R. (2018). HIF- α factors as potential therapeutic targets in leukemia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(11), 917-928.
42. Lee, K., Zhang, H., Qian, D. Z., Rey, S., Liu, J. O., & Semenza, G. L. (2009). Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17910-17915.
43. Fox, S. B., Bragança, J., Turley, H., Campo, L., Han, C., Gatter, K. C., ... & Harris, A. L. (2004). CITED4 inhibits hypoxia-activated transcription in cancer cells, and its cytoplasmic location in breast cancer is associated with elevated expression of tumor cell hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer research*, 64(17), 6075-6081.
44. Schönberger, T., Fandrey, J., & Prost-Fingerle, K. (2021). Ways into understanding HIF inhibition. *Cancers*, 13(1), 159.
45. Latha, M. S., & Saddala, M. S. (2017). Molecular docking based screening of a simulated HIF-1 protein model for potential inhibitors. *Bioinformation*, 13(11), 388.
46. Motta, S., Minici, C., Corrada, D., Bonati, L., & Pandini, A. (2018). Ligand-induced perturbation of the HIF-2 α : ARNT dimer dynamics. *PLoS computational biology*, 14(2), e1006021.
47. Yazdani, B., Wing, P. A., Enguita, F. J., & Sirous, H. (2022). Identification of Novel Direct Small-Molecule Inhibitors against HIF-2A using Structure-based Virtual Screening and Molecular Dynamics Simulation. Preprints, 2022020349.

48. Sun, D. R., Wang, Z. J., Zheng, Q. C., & Zhang, H. X. (2018). Exploring the inhibition mechanism on HIF-2 by inhibitor PT2399 and OX3 using molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Recognition*, 31(10), e2730.
49. Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2019). Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, 9(4), 217.
50. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2023). Estadísticas “A Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer (4 de febrero).
51. Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.
52. Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An overview of cancer treatment modalities. *Neoplasia*, 1, 139-157.
53. Giorgi, C., Bonora, M., Missiroli, S., Poletti, F., Ramirez, F. G., Morciano, G., ... & Pinton, P. (2015). Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling. *Oncotarget*, 6(3), 1435.
54. Tolonen, J. P., Heikkilä, M., Malinen, M., Lee, H. M., Palvimo, J. J., Wei, G. H., & Myllyharju, J. (2020). A long hypoxia-inducible factor 3 isoform 2 is a transcription activator that regulates erythropoietin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 3627-3642.
55. Albanese, A., Daly, L. A., Mennerich, D., Kietzmann, T., & Sée, V. (2020). The role of hypoxia-inducible factor post-translational modifications in regulating its localisation, stability, and activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 268.
56. Luo, W., & Wang, Y. (2019). Hypoxia mediates tumor malignancy and therapy resistance. *Hypoxia and Cancer Metastasis*, 1-18.
57. Hohenberg, H., & Kohn, W. (1964) Inhomogeneous Electron Gas, *Physical Review*, 136, B864-B871. doi:10.1103/PhysRev.136.B864
58. Kohn, W., Sham, L. J. (1965) Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review.*, 140: 1133-1138.
59. Parr, R.G., Yang, W. (1989) Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford Univ. Press, New York.
60. Becke, A. D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exchange. *Journal of Chemical Physics*. 98: 5648-5652.
61. Binkley J.S., Pople J.A., Hehre W J. (1980) Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 21. Small Split-Valence Basis Sets for First-Row Elements, *J. Am. Chem. Soc.* 102: 939-947.
62. Hariharan, P. C., Pople, J. (1974). Accuracy of AH n equilibrium geometries by single determinant molecular orbital theory. *Mol. Phys.*, 27(1), 209-214.
63. Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. E., & Thornton, J. M. (1987). Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 326(6111), 347-352.
64. Baker, D. (2000). A surprising simplicity to protein folding. *Nature*, 405(6782), 39-42.

65. Sanchez, R., & Šali, A. (1997). Advances in comparative protein-structure modelling. *Current opinion in structural biology*, 7(2), 206-214.
66. Do, C. B., & Katoh, K. (2008). Protein multiple sequence alignment. *Functional Proteomics: Methods and Protocols*, 379-413.
67. Edgar, R. C., & Batzoglou, S. (2006). Multiple sequence alignment. *Current opinion in structural biology*, 16(3), 368-373.
68. Dias, R., de Azevedo, J., & Walter, F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, 9(12), 1040-1047.
69. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935-949.
70. Guedes, I. A., de Magalhães, C. S., & Dardenne, L. E. (2014). Receptor–ligand molecular docking. *Biophysical reviews*, 6, 75-87.
71. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
72. McNutt, A. T., Francoeur, P., Aggarwal, R., Masuda, T., Meli, R., Ragoza, M., ... & Koes, D. R. (2021). GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. *Journal of cheminformatics*, 13(1), 1-20.
73. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71575231> (último acceso 20 de diciembre de 2023).
74. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pt2385> (último acceso 20 de diciembre de 2023).
75. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pt2399> (último acceso 20 de diciembre de 2023).
76. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Belzutifan> (último acceso 20 de diciembre de 2023).
77. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., et al., Gaussian 16, Revision, B.01 2016; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, USA, 2016.
78. Dennington R, Keith T, Millam J. GaussView, Version 6.0. Semichem Inc. 2019. Shawnee Mission, KS.
79. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. (1996) VMD-Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*. 14, 33-38.
80. Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
81. Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., & Barton G. J. (2009) Jalview Version 2 -A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25, 1189-1191.

82. Webb, B., & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics* 54, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.37, 2016. doi:10.1002/cpbi.3
83. <https://www.rcsb.org/structure/4ZP4> (último acceso 29 de abril de 2024).
84. <https://www.rcsb.org/structure/4ZPR> (último acceso 29 de abril de 2024).
85. <https://www.rcsb.org/structure/6E3T> (último acceso 29 de abril de 2024).
86. <https://www.rcsb.org/structure/4ZP4> (último acceso 29 de abril de 2024).
87. <https://www.rcsb.org/structure/7V7L> (último acceso 29 de abril de 2024).
88. <https://www.rcsb.org/structure/5Y7Y> (último acceso 29 de abril de 2024).
89. <https://www.rcsb.org/structure/5V0L> (último acceso 29 de abril de 2024).
90. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tilack, A. F., Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61, 8, 3891-3898.