



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE FITOQUÍMICOS CON ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA.

Tesis que para obtener el título de:
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
ETZHEL ALEXIS MENDOZA GARCÍA

DIRECTORA: DRA. NORMA ANGÉLICA CABALLERO CONCHA
CODIRECTOR: DR. FRANCISCO JAVIER MELÉNDEZ BUSTAMANTE

OCTUBRE 2024



Agradecimientos.



A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP) por el apoyo a través del proyecto: Aplicación de Métodos Computacionales en Compuestos Anti-Tuberculosis Derivados de Fitoquímicos (proyecto 100256733-VIEP2024).



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.

Dedicatoria.

Al momento de escribir esta dedicatoria me di cuenta de lo bendecido que soy y sobre todo lo mucho que tengo que agradecer, principalmente a Dios por las personas que ha puesto en mi vida. Gracias por ser y estar conmigo.

Este trabajo se lo dedico a mi familia y amigos.

A mis papás por todo su apoyo, por estar conmigo en todo este trayecto, por su paciencia amor y comprensión. Los amo infinitamente, gracias.

A mi Mamá Lupe por siempre estar para mí, por preocuparte y ocuparte de mí, sin duda esto no lo hubiera logrado sin tu apoyo. Gracias mami.

A mis hermanos por estar conmigo en todo este viaje, por ser mis confidentes, entenderme y soportarme, gracias chiquillos.

A mi familia por todo el soporte y apoyo que me dieron a lo largo de esta etapa. Por estar al pendiente de mí, apoyarme y motivarme. Sobre todo, a mi madrina Alejandra y a mi tía Adriana, gracias no solo ser mis tías sino también mis amigas, gracias por su cariño y amor.

A mis amigos, por todas las risas, por escucharme y motivarme. Este camino lo hicimos juntos, gracias por crecer conmigo ¡Éxito en todo lo que viene!

A mis asesores, Dr. Paco, Dra. Maru, en especial a la Dra. Norma, por adoptarme en su laboratorio, por guiarme, enseñarme y aguantarme todo este tiempo. Gracias por su confianza y su paciencia.

A la Dra. Andrea Moreno-Ceballos (Andy). Sin duda este trabajo no hubiera sido posible sin ti, gracias por la paciencia, por compartir tu conocimiento conmigo y sobre todo por tu amistad ¡Te deseo todo el éxito del mundo!

Trabajos presentados

Programa de investigación “Haciendo Ciencia en la BUAP primavera 2023” con el proyecto “Estudio computacional de fitoquímicos con actividad anticancerígena” 21/03/2023 - 23/06/2023

Congreso “10 Aniversario Licenciatura en Biotecnología BUAP” con el proyecto “Estudio computacional de fitoquímicos con actividad anticancerígena” 24/10/2023 – 26/10/2023

Furo virtual “LatinXChem” con el proyecto “*Computational analysis of phytochemicals with anticancer activity*” 14/10/2024 – 16/10/2024

Resumen

Las xantonas son metabolitos secundarios presentes en la planta *Garcinia mangostana*, mejor conocida como mangostán, las cuales han mostrado propiedades anticancerígenas con un mecanismo de acción poco claro. En este trabajo de tesis se utilizó la técnica computacional de acoplamiento molecular para valorar la viabilidad acerca del mecanismo anticancerígeno de estos fitoquímicos mediante la inhibición de CDK2 y de esta manera sentar una base sólida en el diseño de nuevos inhibidores de la familia de proteínas CDK en la lucha contra el cáncer de mama.

Se compararon los resultados de afinidad de seis xantonas hacia CDK2 utilizando diferentes programas de acoplamiento molecular: ArgusLab, Glide, *Induced Fit Docking* (IFD) y el método MM/GBSA. Las diferencias observadas en los valores de afinidad se deben a los distintos enfoques teóricos, algoritmos y funciones de puntuación empleados por cada programa. Cada uno aporta información complementaria, lo que subraya la importancia de usar enfoques múltiples para obtener una evaluación más completa de las interacciones ligante-receptor. Se analizaron los complejos resultantes mostrando que los tres mejores inhibidores (mangostenol, γ -mangostin y α -mangostin) que muestran una buena estabilidad por sus interacciones estables y favorables, facilitadas por la presencia de grupos hidroxilo y metoxi en sus estructuras, mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno e interacciones electroestáticas con los aminoácidos reportados en la literatura como indispensables para la inhibición de esta enzima. Las técnicas de la química y biología computacional son invaluable en el desarrollo de nuevos fármacos que combatan cualquier tipo de cáncer y en particular el cáncer de mama.

Abstract

Xanthenes are secondary metabolites present in the plant *Garcinia mangostana*, better known as mangosteen, which have shown anticancer properties with an unclear mechanism of action. In this thesis work, the computational technique of molecular docking was used to assess the feasibility of the anticarcinogenic mechanism of these phytochemicals through CDK2 inhibition and thus lay a solid foundation for the design of new inhibitors of the CDK family of proteins in the fight against breast cancer.

The affinity results of six xanthenes towards CDK2 were compared using different molecular docking programs: ArgusLab, Glide, *Induced Fit Docking* (IFD) and the MM/GBSA method. The observed differences in affinity values are due to the different theoretical approaches, algorithms and scoring functions employed by each program. Each provides complementary information, underscoring the importance of using multiple approaches to obtain a more complete assessment of ligand-receptor interactions. The resulting complexes were analyzed showing that the three best inhibitors (mangostenol, -mangostin and -mangostin) showing good stability due to their stable and favorable interactions, facilitated by the presence of hydroxyl and methoxy groups in their structures, through hydrogen bridge type interactions and electrostatic interactions with the amino acids reported in the literature as indispensable for the inhibition of this enzyme. The techniques of computational chemistry and biology are invaluable in the development of new drugs to combat any type of cancer, particularly breast cancer.

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	5
1.1 Perspectiva terapéutica en el cáncer de mama	5
1.2 Fitomedicina, flavonoides y su papel en la salud	7
1.3 <i>Garcinia mangostana</i> (<i>Clusiaceae</i>)	8
1.4 Xantonas	10
1.5 Dianas terapéuticas	16
<i>Ciclina Dependiente de Cinasas 2 (CDK2)</i>	18
1.6 Métodos computacionales en el diseño de fármacos	18
Capítulo 2. Planteamiento del problema y justificación, hipótesis y objetivos	21
2.1 Planteamiento del problema y Justificación	21
2.2 Hipótesis	21
2.3 Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Capítulo 3. Marco teórico	23
3.1 Fundamentos de la teoría cuántica y molecular	23
3.2 Ecuación de Schrödinger	23
3.3 Acoplamiento molecular	24
3.4 Algoritmos	26
<i>Coincidencia de formas "Shape Matching"</i>	26
<i>Construcción incremental "Incremental Construction"</i>	26
<i>El Recocido Simulado "Simulated annealing"</i>	27
<i>Simulaciones Monte Carlo (MC)</i>	27
<i>Programación evolutiva "Evolutionary Programming"</i>	28
<i>Algoritmos Genéticos "Genetic Algorithm"</i>	28
3.5 Función de puntuación	29
3.6 Programas computacionales de Docking Molecular	31
<i>ArgusLab</i>	31
<i>Glide</i>	31
<i>Induced Fit Docking (IFD)</i>	32
Método MM/GBSA	34
Capítulo 4: Metodología	36

4.1	Selección de xantonas.....	36
4.2	Obtención de las estructuras moleculares.....	37
4.3	Optimización de la geometría molecular.....	39
4.4	Acoplamiento molecular.....	41
	<i>ArgusLab</i>	41
	<i>Glide</i>	42
	<i>Induced Fit Docking (Schrödinger)</i>	43
	Método MM/GBSA.....	44
	Capítulo 5: Discusión de resultados	44
5.1	Optimización de la geometría molecular.....	44
5.2	Acoplamiento Molecular.....	46
	<i>ArgusLab</i>	46
	<i>Glide</i>	50
5.4	<i>Induced Fit Docking (Schrödinger)</i>	54
5.5	Método MM/GBSA (Schrödinger).....	59
	Capítulo 6: Conclusiones	64
	Referencias	66

Tabla de abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANS	(fluoróforo 8-anilino-1-naftaleno sulfonato)
AKT	Proteína cinasa B
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas (<i>Cyclin Dependent Kinases</i>)
CDK2/4/6	Cinasas dependientes de ciclinas 2/4/6
COX-2	Ciclooxigenasa-2
E2F	Familia de factores de transcripción que desempeña un papel crucial en la replicación del ADN
Eq	Ecuación
ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)
ERBB2	Gen codificante para HER2
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HER2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)

IFD	<i>Induced Fit Docking</i>
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Ki-67	Proteína utilizada como marcador de proliferación celular en cáncer de mama y otros tipos de cáncer.
mTOR	Objetivo de rapamicina en mamíferos (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasas (<i>Phosphoinositide 3-Kinases</i>)
PR	Receptor de Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)
RMSD	Desviación Cuadrática Media (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
TNBC	Cáncer de mama triple negativo (<i>Triple Negative Breast Cancer</i>)
X1	α -mangostin
X2	γ -mangostin
X3	Mangostenol
X4	Garcinon D

X5 Tovophyllin A

X6 Gartanin

Introducción

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial [1] y se caracteriza por una proliferación descontrolada de células debido a alteraciones en el ADN [2] lo que conduce a la formación de tumores [3]. Una de las proteínas clave en la regulación del ciclo celular es la enzima CDK2 (cinasa dependiente de ciclina 2), que desempeña un papel esencial en la transición de la fase G1 a la fase S, controlando la replicación del ADN [4]. Las mutaciones en CDK2, así como en las vías reguladas por ciclinas, pueden contribuir significativamente al desarrollo y progresión del cáncer de mama [5]. En condiciones normales, CDK2 forma complejos con ciclinas, como la ciclina E y A, que son necesarias para la progresión del ciclo celular. Sin embargo, las mutaciones en los genes que codifican CDK2 o en sus reguladores, como las proteínas inhibidoras p21 y p27, pueden causar una activación descontrolada de la enzima [4], [6], permitiendo que las células proliferen sin control, incluso cuando deberían detenerse o someterse a apoptosis. En subtipos agresivos de cáncer de mama, como el cáncer triple negativo, se ha observado una sobreactivación de CDK2, lo que sugiere su papel crucial en la resistencia a tratamientos y en la progresión de la enfermedad [7], [8].

El cáncer de mama en mujeres representa uno de los problemas más relevantes de salud pública en México y a nivel mundial con más de 2.26 millones de nuevos casos [1], cifras del GLOBOCAN (Observatorio Mundial del Cáncer) en el año 2022 se reportó una incidencia mundial de 9 664 889 de mujeres de entre 0 a 85 años, de los cuales el cáncer de mama representa la neoplasia con mayor incidencia con el 23.8% (2 296 840 casos) (Figura 1) y mayor mortalidad con un 15.4% (666 103 muertes) (Figura 2) [9].

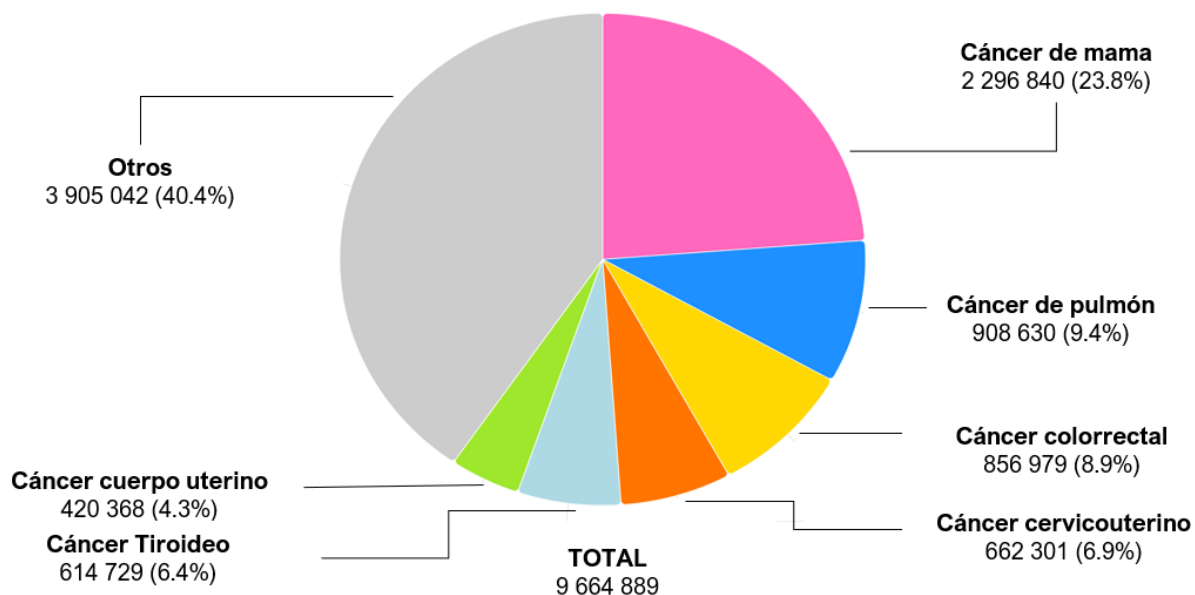


Figura 1. Incidencia debido a los distintos tipos de cáncer a nivel mundial 2022 GLOBOCAN (Elaboración propia con los datos extraídos de <https://gco.iarc.who.int>)

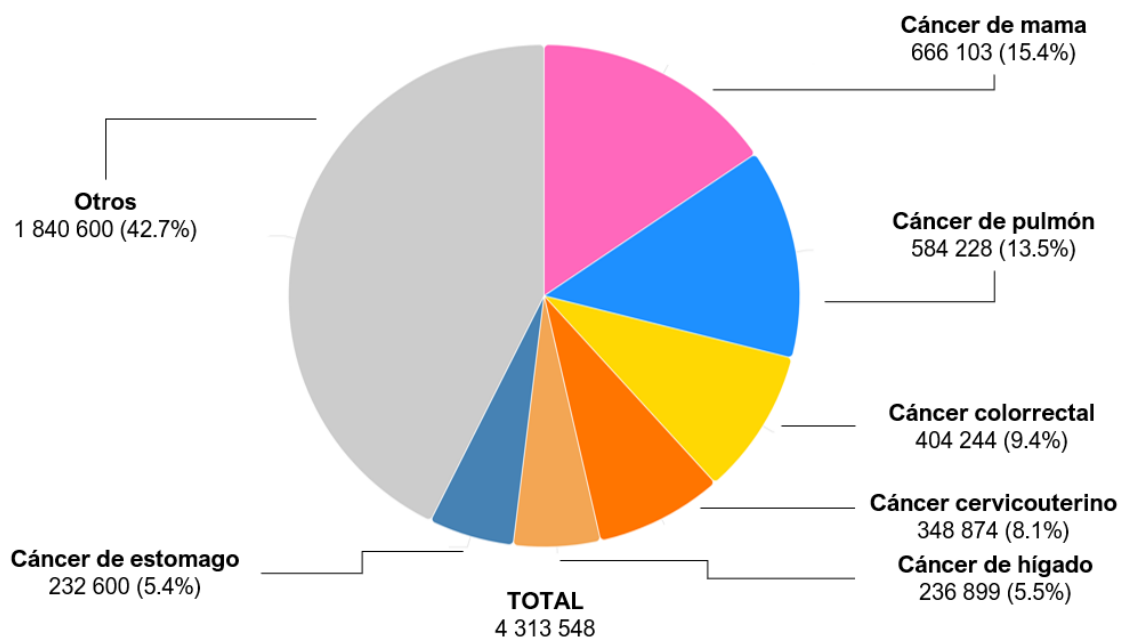


Figura 2. Mortalidad debido a los distintos tipos de cáncer a nivel mundial 2022 GLOBOCAN (Elaboración propia con los datos extraídos de <https://gco.iarc.who.int>)

De acuerdo con los datos reportados para México por el instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), se ha observado un aumento en la mortalidad por cáncer de mama en mujeres con 5 602 defunciones asociadas a tumores malignos de mama reportado en 2010, mientras que en 2021 se registraron 7 896 defunciones [10], presentando un aumento del 40.95% de 2010 a 2021.

Actualmente, se cuenta con diversos métodos de prevención y diagnóstico [11] sin embargo, la incidencia de este cáncer no se ha minimizado y sigue constituyendo un problema de salud pública con un tratamiento emergente para detener el progreso de esta [1], [9].

Es bien conocido que el desarrollo de nuevos fármacos implica la inversión de recursos económicos y sobre todo de tiempo. Los métodos computacionales son parte esencial para la disminución de ambas inversiones, simplificando en gran medida la síntesis de compuestos prueba y el tiempo de ejecución [12].

Como parte a la solución del problema de cáncer de mama, este trabajo de investigación sea dividido en los siguientes capítulos:

- Capítulo 1. **Antecedentes.** En este capítulo se contextualiza el trabajo dando una breve descripción del cáncer de mama, su prevalencia y su impacto en la salud mundial, la necesidad de nuevas terapias, la función biológica de la enzima CDK2, su relevancia en el ciclo celular y su implicación biológica en la patología del cáncer de mama. También se proporciona una introducción a los fitoquímicos (xantonas) provenientes de la fruta *Garcinia mangostana*, sus estructuras químicas y propiedades farmacológicas, y además una revisión breve de la literatura sobre el uso de estos compuestos en el tratamiento de células cancerosas. Por último, se aborda una breve introducción sobre la técnica computacional conocida como acoplamiento molecular.
- Capítulo 2: **Planteamiento y justificación, hipótesis, objetivos generales y específicos.** En este capítulo se destaca la alteración del ciclo celular y la importancia de los inhibidores CDK en el tratamiento del cáncer de mama resistente a terapia hormonal. Se propone a un grupo de xantonas con posible afinidad significativa por la enzima CDK2, es decir, con actividad inhibitoria que

resultará ser una base en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a blancos terapéuticos novedosos para tratar el cáncer de mama. Se plantea como objetivo general describir, mediante la técnica computacional de acoplamiento molecular, el complejo xantona-CDK2. Los específicos incluyen el análisis del acoplamiento, determinación del mejor sitio de unión y la comparación de los diferentes programas de acoplamiento.

- Capítulo 3: **Marco teórico.** En este capítulo se proporcionan los conceptos fundamentales para contextualizar la presente investigación. Se aborda la comprensión de la alteración del ciclo celular del cáncer de mama, así como la relevancia de la enzima CDK2 en esta patología, se revisan estudios previos que han demostrado las propiedades inhibitorias de las xantonas en cinasas dependientes de ciclinas sobre todo resaltando las propiedades anticancerígenas en líneas celulares de cáncer de mama. Se aborda el papel del acoplamiento molecular “*Docking*” como una herramienta computacional esencial para la simulación de interacciones entre moléculas.
- Capítulo 4: **Metodología.** En este capítulo se detalla la metodología utilizada en el acoplamiento de las 6 xantonas con la enzima CDK2, así como las bases de datos de donde se recuperaron cada estructura.
- Capítulo 5: **Discusión y resultados.** Se exponen los resultados generados durante la investigación con las 6 xantonas y se realiza el análisis de los resultados obtenidos.
- Capítulo 6: **Conclusiones.** Se hace una recapitulación de los resultados más relevantes obtenidos durante esta investigación.
- Referencias. **Se enlistan las referencias utilizadas en el presente trabajo.**

Capítulo 1. Antecedentes

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se clasifica en tres subtipos principales según los receptores hormonales (ER y PR) y HER2: luminal ER positivo y PR positivo (luminal A y B), HER2 positivo y cáncer de mama triple negativo (TNBC) [13]. Es crucial realizar una evaluación diagnóstica estandarizada de estos receptores hormonales y del HER2, siguiendo ciertas pautas internacionales para determinar estos subtipos [11]

Los tipos de cáncer de mama con receptores hormonales positivos, como los subtipos luminales A y B, representan aproximadamente del 60% al 75% de todos los casos de cáncer de mama y muestran una buena respuesta a la terapia hormonal, tanto en situaciones de tratamiento adyuvante como en casos metastásicos [14]. Sin embargo, aunque algunos pacientes inicialmente no responden (resistencia primaria), prácticamente todos los demás desarrollan resistencia a la terapia hormonal en algún momento (resistencia secundaria) [15], [16]. Esto conduce finalmente, después de utilizar regímenes adicionales basados en terapia hormonal, a la necesidad de recurrir a tratamientos basados en quimioterapia.

1.1 Perspectiva terapéutica en el cáncer de mama.

En la última década, los ensayos clínicos han contribuido a la implementación de nuevas y diversas estrategias terapéuticas innovadoras en la práctica médica. Estas estrategias consisten en la combinación de nuevas terapias específicas con tratamientos hormonales, tanto para el cáncer de mama metastásico sensible a hormonas como para el resistente a hormonas [15], [17]. Algunas de estas nuevas terapias específicas incluyen el uso de everolimus, un inhibidor de mTOR, al igual que los inhibidores de CDK4/6, en combinación con terapias hormonales [18]. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*FDA*, por sus siglas en inglés) ha autorizado el uso de tres inhibidores de CDK4/6 altamente efectivos y selectivos, los cuales se toman por vía oral (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) y sirven para tratar el cáncer de mama avanzado o metastásico en combinación con una terapia hormonal específica [19]

Para hacer frente al aumento de casos de cáncer de mama, se están investigando nuevos métodos terapéuticos y el desarrollo de medicamentos contra esta enfermedad. Los inhibidores de la cinasas dependiente de ciclina (CDK), que son sustancias similares a purinas y pirimidinas, han demostrado ser eficaces en el tratamiento este tipo de cáncer debido a sus funciones específicas en la desregulación del cáncer y su potencial terapéutico innovador [19]

Las vías de señalización de CDK4/6-RB1, así como PI3K/AKT/mTOR desempeñan un papel fundamental en el estímulo del crecimiento en el cáncer de mama metastásico HR+ y HER2-. Uno de los mecanismos conocidos de resistencia a la inhibición de CDK4/6 es la activación de la ciclina D1/CDK2 dependiente de PI3K (Figura 3). Este complejo puede fosforilar pRb, lo que lleva a la entrada en la fase S independientemente de la presencia de CDK4/6 [20] Braal et al. 2020 proponen una estrategia para superar esta resistencia bloqueando la activación de la ciclina D1 mediante la inhibición de PIK3CA, la cual ha demostrado ser efectiva en experimentos con líneas celulares [20] De manera similar, los inhibidores de mTORC1/2 han mostrado ser potentes para restaurar la sensibilidad a los inhibidores de CDK4/6 en líneas celulares de cáncer de mama ER+ resistentes [21].

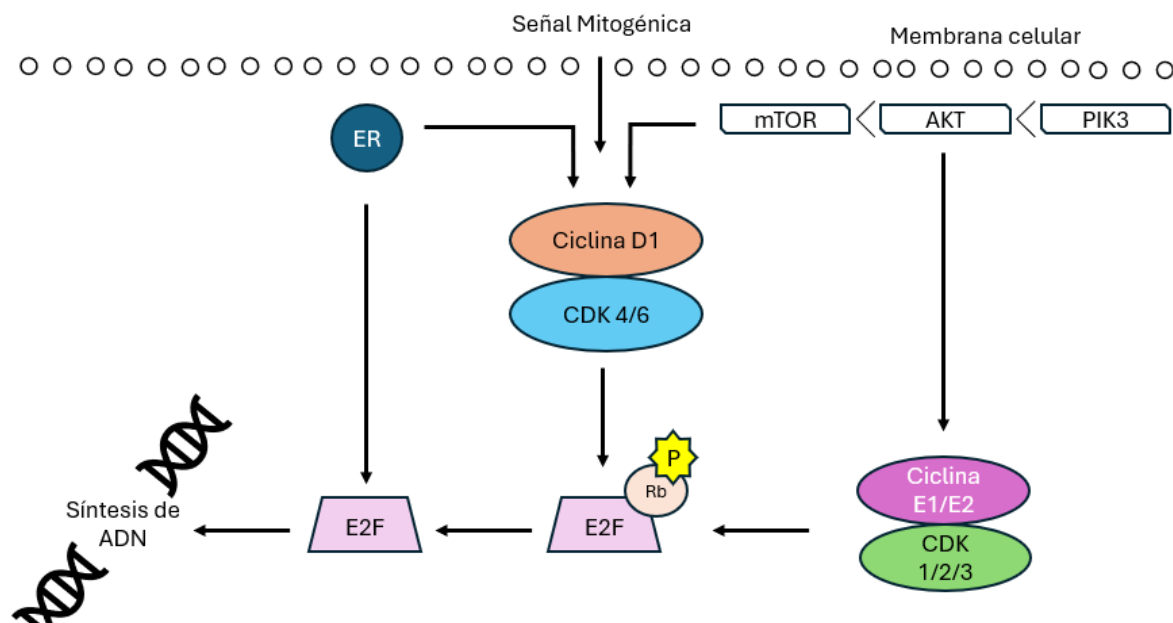


Figura 3. Los inhibidores de CDK4/6 funcionan interrumpiendo el complejo CDK4/6-ciclina D1, normalmente fosforila la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb). Esto impide que el factor de transcripción E2F quede disponible, bloqueando así la transición de la célula

de la fase G1 a la fase S y evitando su división [20]. Este proceso involucra otras proteínas importantes como AKT, el receptor de estrógenos (ER), HER2, y las cinasas PIK3 fosforilada. Imagen recreada Braal et al. (2021) [20].

Dado el considerable potencial de estos compuestos, existe una fuerte confianza para que en el futuro se identifiquen nuevos inhibidores de CDK que puedan ampliar las alternativas terapéuticas para abordar el cáncer de mama [22].

1.2 Fitomedicina, flavonoides y su papel en la salud

Tras el descubrimiento de la penicilina durante la segunda guerra mundial, hubo un aumento significativo en los esfuerzos de las compañías farmacéuticas para encontrar nuevos compuestos con actividad biológica [23], es decir, moléculas naturales con potencial terapéutico especialmente para ser usados en la medicina. Los metabolitos son compuestos bioactivos utilizados en la producción de medicamentos y productos químicos. [24]. Sus aplicaciones farmacéuticas abarcan diversas funciones, como analgésicos, antibacterianos, antivirales, antitumorales, fungicidas e inmunoestimulantes [25]. En el siglo pasado, los productos derivados de metabolitos secundarios han sido una fuente primordial de diversidad química que ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos. Tanto los compuestos naturales como sus análogos sintéticos han demostrado éxito en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades humanas en casi todos los campos terapéuticos [23].

Los fitoquímicos, un tipo de metabolitos secundarios, son compuestos químicos producidos por las plantas que no son esenciales para su crecimiento o desarrollo, sin embargo, pueden tener una variedad de funciones en las plantas, como protección contra enfermedades, insectos y estrés ambiental [23]. Algunos ejemplos comunes de fitoquímicos incluyen flavonoides, carotenoides, polifenoles, terpenos y xantonas [26].

En específico, los flavonoides (Figura 4) son reconocidos por los efectos positivos que producen en la salud [27], [28]. Son esenciales en una variedad de aplicaciones, incluyendo nutraceuticos, productos farmacéuticos, medicinales y cosméticos, lo anterior debido a que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas, así como su capacidad para regular la función

enzimática celular [27], estas propiedades bioactivas se asocian con su habilidad para eliminar radicales libres, reducir la inflamación, activar enzimas de fase II (Glutathion S-transferasa, Sulfuriltransferasa, UDP-glucuronosiltransferasa [29]) así como limitar la proliferación, adhesión e invasión de células. Además, estos compuestos pueden inducir la diferenciación celular, detener el ciclo celular y promover la apoptosis. [30]. También influyen en el metabolismo de hormonas esteroides y estrógenos al regular moléculas importantes como COX-2, iNOS, quinona reductasa, catalasa y glutatión peroxidasa, así como oncogenes, genes supresores de tumores, receptores de factores de crecimiento, tioredoxina reductasa y timidilato sintasa [31].

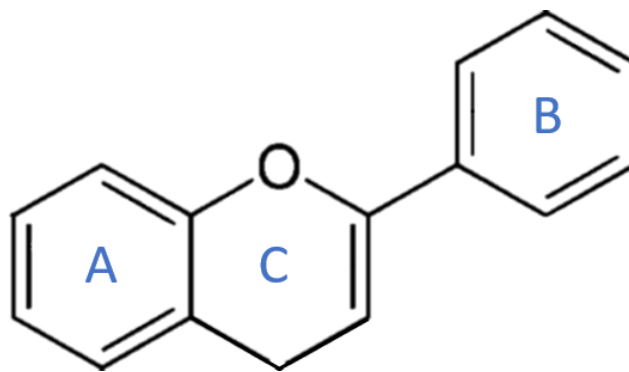


Figura 4. Estructura general de un flavonoide

1.3 *Garcinia mangostana* (*Clusiaceae*)

El *Garcinia mangostana*, comúnmente conocido como mangostán, es una fruta tropical que pertenece a la familia *Clusiaceae*, es nativa del sureste asiático [32]. En el género *Garcinia*, se han clasificado aproximadamente 400 especies que varían desde árboles de hoja perenne hasta arbustos y la especie *Garcinia mangostana* se distribuye naturalmente en regiones como Malasia, Indonesia, Tailandia, Myanmar, Sri Lanka, India y Filipinas [32]. El fruto del mangostán es esférico, con un diámetro de 3.4 - 7.5 cm, y se caracteriza por su cáscara de color púrpura oscuro a rojo púrpura (Figura 5). Esta cáscara tiene un grosor de 6 - 10 mm, contiene látex amarillo amargo y un jugo que tiñe de color púrpura. Lo más destacado son sus arilos, que constituyen

4-8 segmentos de pulpa blanca, jugosa y suave (Figura 5), con un sabor ligeramente ácido [33].



Figura 5. *Mangostán (Garcinia mangostana)*. Imagen recuperada de Wang et al. (2022) [34]

Durante siglos, el mangostán ha sido considerado como “la reina de las frutas” apreciado en el sureste asiático, no solo por su delicioso sabor, sino también por sus propiedades medicinales [35]. Los habitantes de estas regiones han utilizado tradicionalmente el pericarpio de esta fruta tropical en la curación de heridas y el tratamiento de diversas infecciones cutáneas [35]. Este fruto exhibe prominentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El uso del mangostán en la medicina tradicional abarca el tratamiento de una variedad de afecciones, incluyendo tumores, diabetes, infecciones bacterianas, hipertensión y artritis, lo que subraya su potencial en aplicaciones médicas y farmacológicas [36]. El mangostán se caracteriza por su rica composición en compuestos bioactivos, entre los que destacan las xantonas y las antocianinas, cuya extracción se realiza principalmente del pericarpio [37].

Se ha logrado aislar más de 60 variantes de xantonas de las raíces de la planta, en tanto que componentes como la α -mangostin, γ -mangostin, gartanin, han sido identificados en el pericarpio y la corteza. Además, en esta misma parte de la fruta se encuentran xantonoides y una diversidad de otros fitoquímicos [32].

En la literatura científica, se han realizado diversas revisiones que examinan las propiedades medicinales del mangostán. Estas revisiones han destacado sus efectos anticancerígenos y antibiofilm, así como sus propiedades antioxidantes, antiperiodontíticas y antidiabéticas, reafirmando así su relevancia en el campo de la investigación biomédica [36].

1.4 Xantonas

Son metabolitos secundarios que comúnmente se encuentran en plantas superiores, hongos y líquenes [38]. La xantona con el nombre IUPAC de 9 H -xanten-9-ona es un compuesto heterocíclico con una estructura de dibenzo- γ -pirona, con un carácter básico y fórmula molecular de $C_{13}H_8 O_2$. La numeración y designación de los anillos A y B (Figura 6), provienen de las vías biosintéticas de los compuestos de plantas superiores [39].

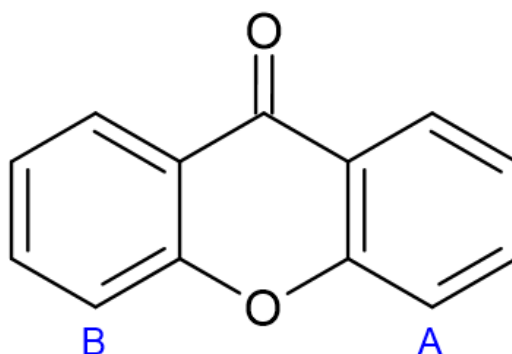
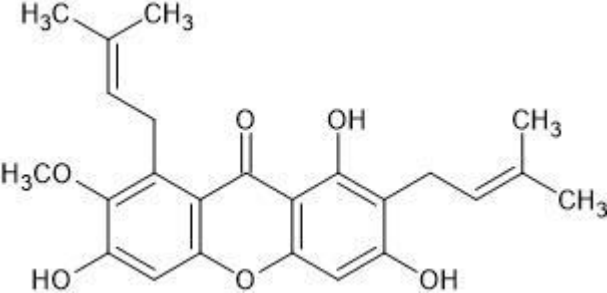
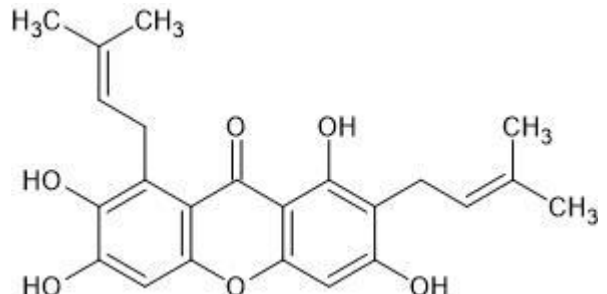
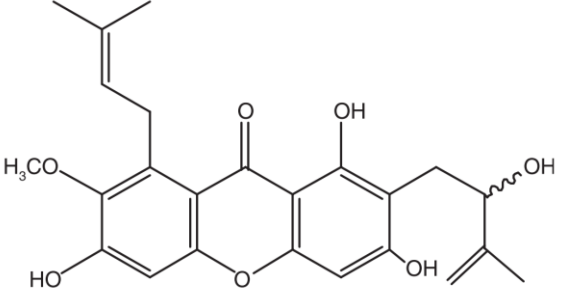


Figura 6. Estructura general de una xantona

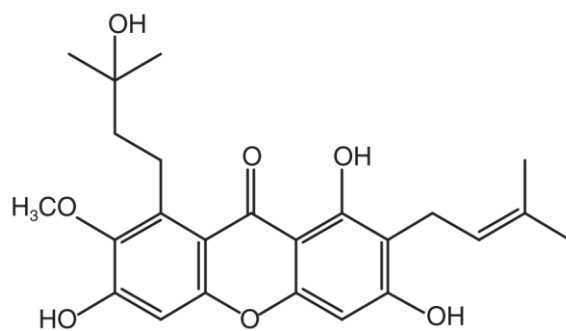
Evans et al. 1998, menciona que el núcleo de la xantona puede considerarse como una “estructura privilegiada” debido a su capacidad para unirse a múltiples clases de receptores de proteínas no relacionados como ligantes de alta afinidad [40]. Su capacidad para interferir con una variedad de objetivos biológicos incluyendo: la inhibición de la monoaminoxidasa, efectos antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos, hepatoprotectores y actividad antifúngica [41], [42], se debe a algunas características moleculares particulares como la presencia de un sistema de anillos tricíclicos heteroaromáticos predominantemente planos y rígidos, un grupo carbonilo en el anillo central que permite varias interacciones y un grupo éter biarílico que contribuye al sistema electrónico de la molécula. [38], [42].

Aunque las estructuras y los perfiles cromatográficos son similares a los de los flavonoides (ver Figura 4 y 6), las xantonas solo se encuentran en un número limitado de especies. Por ejemplo, las xantonas se pueden extraer de unas 20 familias de plantas superiores, siendo la mayoría de ellas parte de las familias *Clusiaceae*, *Hypericaceae* y *Gentianaceae* y en menor medida de la familia *Calophyllaceae* [43]. Las xantonas preniladas (Tabla 1) se encuentran principalmente en diversas especies de *Garcinia Clusiaceae* y en ocasiones, las xantonas se hallan como los compuestos principales con múltiples grupos hidroxilo, pero en su mayoría son éteres mono o polimetilados, o se presentan en forma de glucósidos[44].

Tabla 1
 Algunas xantonas preniladas extraídas del Mangostán (*Garcinia mangostana*).

Nombre del compuesto	Estructura química 2D	Parte de la planta donde fue extraído	Referencia
α -mangostin		Pericarpio, Fruto entero, Tallo, Arilos, Semilla	[45], [46]
γ -mangostin		Pericarpio, Fruto entero, Tallo	[45], [46]
Mangostenol		Fruto entero, Tallo	[45], [46]

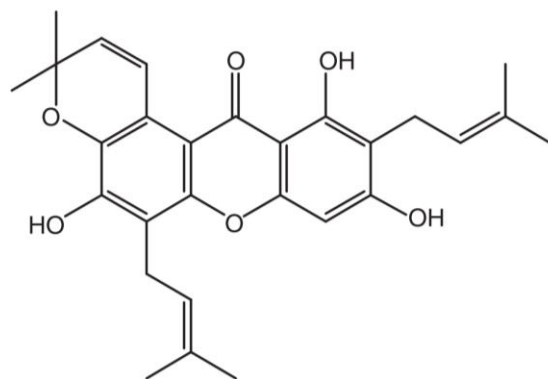
Garcinon D



Pericarpio,
Fruto entero,
Tallo

[45], [46]

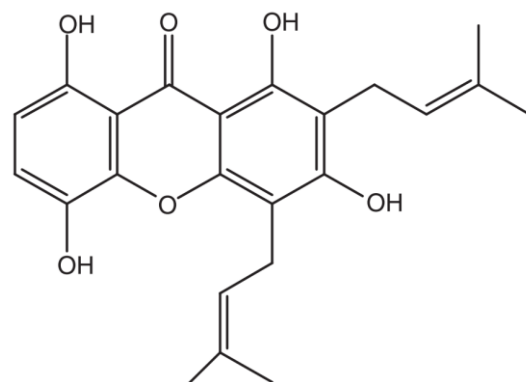
Tovophyllin A



Pericarpio

[47]

Gartanin



Pericarpio, Fruto
entero

[45], [46]

α -mangostin

El α -mangostin se encuentra en el pericarpio del mangostán en una concentración de 78%. Estudios recientes han comprobado que la α -mangostin provoca la interrupción del ciclo de crecimiento celular y la muerte programada de diversas células cancerosas en el cuerpo humano. De igual manera se mencionó que el α -mangostin reduce significativamente el desarrollo de tumores al igual que la propagación de células cancerosas en un modelo de ratones con cáncer de mama [48].

γ -mangostin

γ -mangostin es un compuesto derivado de la xantona que se extrae de la cáscara de la fruta. En investigaciones previas, respaldan sus propiedades antiinflamatorias y su capacidad para combatir tumores cerebrales, además de investigaciones con el objetivo de analizar los efectos del γ -mangostin en la apoptosis de las células de adenocarcinoma colorrectal HT29 [49].

Mangostenol

See et. al 2020 realizaron un estudio donde cuatro xantonas (α -mangostin, β -mangostin, mangostenol y mangaxantona B), tres benzofenonas (mangafenona, benthamianona y congestiflorona), y un esteroide (estigmasterol) extraídos de las cortezas del tallo de *Garcinia mangostana* para identificar su acción anticancerígena en líneas celulares de cáncer de mama. α -mangostin, β -mangostin, mangaxantona B y mangafenona mostraron una notable citotoxicidad en células MCF-7 y MDA-MB-231. Mangostenol mostró un efecto menos potente en comparación con los demás compuestos, necesitando concentraciones más altas de las requeridas para inhibir el crecimiento de las células cancerosas [50].

Garcinon D

Nauman et. al 2021 examinaron nueve xantonas distintas con el fin de identificar posibles efectos tóxicos en las células 22Rv1 (células de cáncer de próstata) y MDA-MB-231 (células de cáncer de mama). Todos estos compuestos disminuyeron la viabilidad celular en ambas líneas celulares. Posteriormente, se llevó a cabo un

ensayo bioquímico para determinar la capacidad de inhibir la CDK2/CiclinaE1 [51] Garcinon D mostró una actividad moderada frente a las enzimas CDK2 y CDK4, lo que indica la posibilidad de funcionar como inhibidor de CDK con amplio rango de acción [51].

Tovophyllin A

La Tovophyllin A es una xantona que se extrae de la cáscara de *Garcinia mangostana* y que presenta varias propiedades beneficiosas. El-Agamy et. al 2019 realizaron pruebas con dos dosis diferentes de Tovophyllin A en ratones para evaluar su efecto sobre lesión pulmonar aguda inducida por lipopolisacáridos. Por otra parte, evaluaron efectos citotóxicos en células de carcinoma epitelial de pulmón (A549) y mama (MCF7). Concluyeron que Tovophyllin-A reduce el estrés oxidativo y la inflamación en el tejido pulmonar [52].

Gartanin

Liu et. al 2013 realizaron un estudio donde se demostró que las xantonas del mangostán, especialmente gartanin y α -mangostin, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas en diferentes etapas del cáncer de vejiga urinaria humana. Además, se observó que el tratamiento con gartanin en líneas celulares de cáncer de vejiga resultó en la supresión de la expresión de proteínas como p70S6 y 4E-BP1, lo que indicaría la inhibición de la vía mTOR. Los resultados sugieren que el gartanin tiene un potencial prometedor como agente con múltiples objetivos en la quimioprevención del cáncer de vejiga urinaria humana, ya que afecta a múltiples vías involucradas en el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas [53].

1.5 Dianas terapéuticas

El proceso de crecimiento y división celular se lleva a cabo mediante un conjunto altamente regulado de eventos conocido como ciclo celular [54]. En las últimas décadas, se han identificado los componentes fundamentales de esta maquinaria, en su mayoría a través de investigaciones genéticas y estudios bioquímicos en levaduras [55].

El ciclo celular consta de cuatro etapas claramente definidas: La fase de crecimiento 1 (G1), la fase de replicación o síntesis de ADN (S), la fase de crecimiento 2 (G2) y la fase mitótica (M). La progresión a través de estas fases se encuentra bajo el control de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), cuyas actividades se regulan positivamente gracias a las ciclinas asociadas y se regulan negativamente mediante inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI). Además, la división celular está supervisada por puntos de control en el ciclo celular que vigilan el orden, la integridad y la precisión de los eventos clave en el ciclo celular (Figura 7) [56].

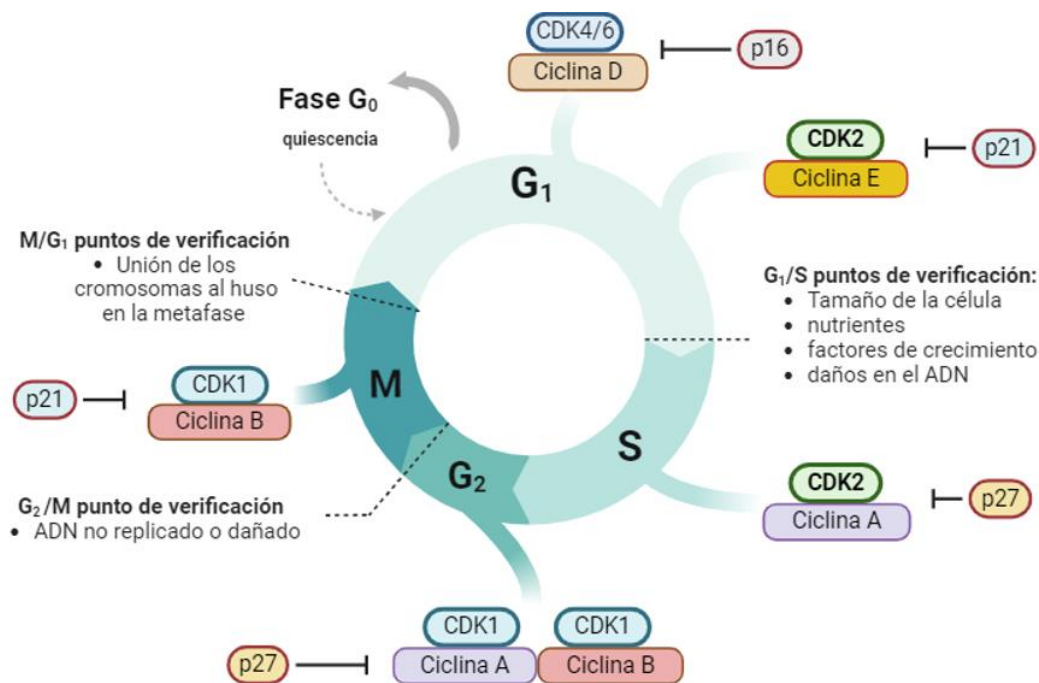


Figura 7. Fases del ciclo celular en las que se muestran las enzimas CDK implicadas.

Imagen recreada Bury et al. (2021)

El ciclo celular representa un proceso irreversible que sigue una secuencia precisa de eventos regulados por tres puntos de control cruciales. La regulación de estos complejos mecanismos del ciclo celular se ha investigado en levadura y mamíferos, identificando más de 20 cinasas dependientes de ciclinas (CDK). De estas, las CDK1, 2, 4 y 6 desempeñan un papel esencial en la progresión del ciclo celular, un proceso que sufre alteraciones significativas en células cancerosas. Imagen recreada por el autor [4].

La activación de las CDK está condicionada por la síntesis y degradación de las ciclinas que las regulan. La entrada en la fase G1 del ciclo celular se inicia mediante factores de crecimiento que estimulan la activación de las ciclinas D1, D2 y D3, las cuales se asocian con CDK4 o CDK6. El aumento de la actividad de la ciclina D-CDK4/6 resulta en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) y la inactivación de p53, lo que a su vez libera E2F del complejo pRB-E2F. Esta liberación desactiva el punto de control de restricción G1, que detiene el ciclo celular cuando se detecta una escasa disponibilidad de nutrientes. La activación de la ciclina E-CDK2 permite la transcripción de genes necesarios para ingresar a la fase S. Durante esta fase, la ciclina A-CDK2 impulsa la progresión, mientras que la ciclina A-CDK1 lo hace en la fase G2. Finalmente, la regulación de la fase de salida de la mitosis se lleva a cabo mediante la ciclina B-CDK1. Además de las CDK, otras cinasas como las cinasas tipo Polo 1 (PLK1) y las cinasas Aurora A/B, desempeñan un papel esencial en la progresión a través de la mitosis, la segregación cromosómica y la citocinesis (Figura 7) [4], [22].

La causa del cáncer suele ser el resultado de una combinación de factores genéticos y epigenéticos que causan una alteración en las redes moleculares, proteínas, ARN y ADN, favoreciendo el crecimiento y la multiplicación de las células [57]. La supervivencia, el crecimiento y la propagación de las células cancerosas dependen de procesos como la diferenciación celular, la proliferación y mecanismos angiogénicos y apoptóticos, que son regulados por diversas proteínas cinasas y vías de señalización [58] Entre las proteínas CDK identificadas hasta el momento, cuatro (CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6) desempeñan roles importantes en la regulación del ciclo celular. La interacción periódica de una ciclina con su subunidad catalítica conduce a la activación de la CDK y a la fosforilación de varias proteínas objetivo que

son necesarias para la progresión del ciclo celular. Las CDK regulan las transiciones en el ciclo celular mediante la fosforilación y la posterior desactivación de la proteína retinoblastoma (pRb), que actúa como un supresor de tumores evitando la progresión del ciclo celular. Por lo tanto, la desactivación de la proteína pRb permite que las células avancen libremente en el ciclo celular dando lugar a ciclos de multiplicación celular y, eventualmente, al desarrollo de células cancerosas [22], [59].

Ciclina Dependiente de Cinasas 2 (CDK2)

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son miembros de la familia de cinasas de proteínas serina/treonina, cuya actividad cinasa depende de la unión con una ciclina. Juegan un papel importante en diversos procesos de la biología celular, incluyendo la regulación del ciclo celular (CDKs 1, 2, 3, 4 y 6), así como en la regulación de la transcripción (CDKs 7, 8, 9, 12 y 13) mediante la fosforilación de la cola C terminal de la ARN polimerasa II [60]. Estas enzimas catalizan la fosforilación de residuos de serina o treonina cerca de un residuo de prolina. CDK2, poseen una estructura primaria que se divide en varios dominios, estos dominios incluyen un bucle rico en glicina, un segmento clave para la unión inicial de ATP/ADP, y regiones conservadas que participan en la activación de la cinasa y en la especificidad del sustrato [61]. Esta especificidad varía entre CDKs, ya que algunas tienen una gama más amplia de sustratos que otras. La estructura de las CDKs permite la interacción con ciclinas activadoras y la fosforilación de una variedad de sustratos que son fundamentales para diferentes fases del ciclo celular [62].

1.6 Métodos computacionales en el diseño de fármacos

El descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso costoso y complejo, lo cual lo convierte en una tarea desafiante que requiere la participación de enfoques multidisciplinarios [63]. El diseño de fármacos asistido por computadora tiene gran importancia en la investigación y desarrollo de medicamentos. Este enfoque abarca diversas disciplinas científicas como el modelado molecular, la quimioinformática y la química teórica [64]. Sin embargo, la aplicación efectiva de estas técnicas no es trivial y no se debe asumir que los medicamentos se pueden diseñar simplemente utilizando herramientas computacionales, estos métodos pueden acelerar el procesamiento de datos, la elección de métodos, el análisis y la interpretación de los resultados

requieren un esfuerzo laborioso y deben validarse con pruebas experimentales (Figura 8) [64], [65].

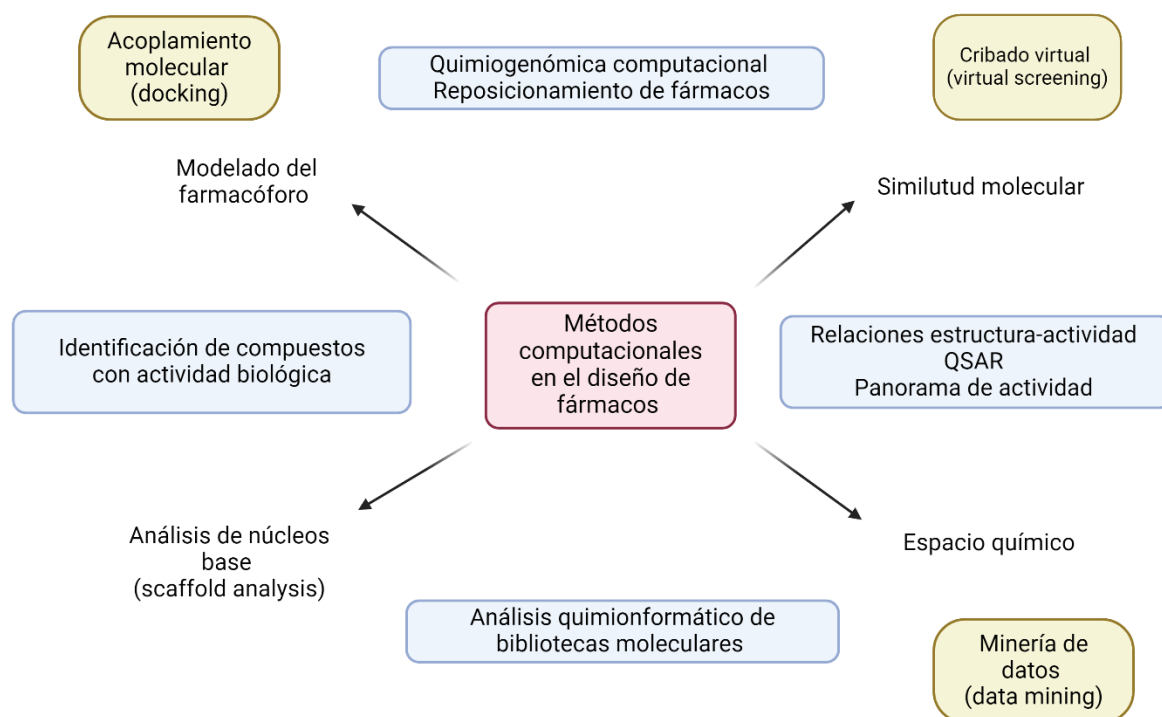


Figura 8. Diagrama de los métodos computacionales comúnmente utilizados en el diseño de fármacos. Imagen de elaboración propia.

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) es una técnica computacional que ayuda a entender cómo interactúan dos moléculas (proteína-ligante) creando un modelo de unión. Esta técnica es muy útil en la investigación de nuevos fármacos, especialmente para ver cómo una molécula pequeña se une a una macromolécula [66]. En la mayoría de los programas de acoplamiento molecular, la mecánica molecular es fundamental. Este enfoque utiliza principios de la física clásica para describir sistemas con múltiples átomos. Para hacer que las predicciones de la mecánica molecular coincidan más estrechamente con los datos experimentales, se emplean parámetros como cargas, ángulos geométricos y de torsión obtenidos de experimentos [67].

Estas simulaciones se basan en la analogía de una “llave y cerradura” (Figura 9). El objetivo principal es ajustar la posición de la “llave” (el ligante) en la “cerradura” (el bolsillo de unión del ligante en la proteína). Desde una perspectiva computacional, se considera el acoplamiento proteína-ligante como un problema de optimización, donde se pretende buscar la ubicación más adecuada para el ligante entre diversas opciones posibles.

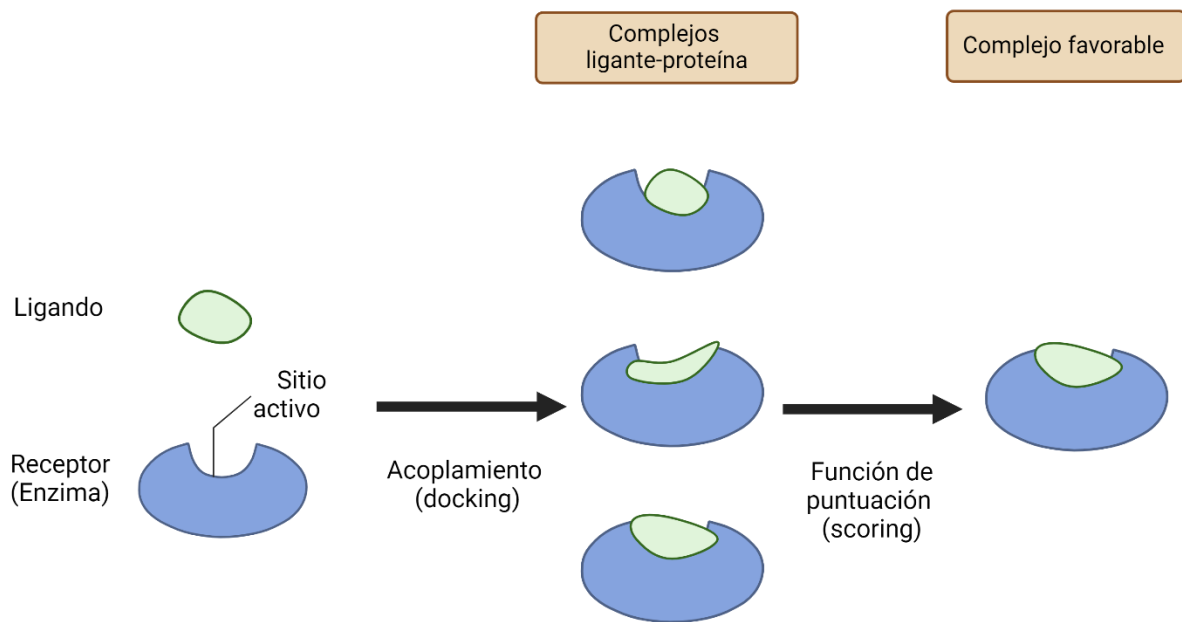


Figura 9. Analogía esquemática del complejo ligante-proteína en el acoplamiento molecular. Imagen de elaboración propia.

Capítulo 2. Planteamiento del problema y justificación, hipótesis y objetivos.

2.1 Planteamiento del problema y Justificación

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial. La alteración del ciclo celular, a través de la vía de la ciclina D/CDK/pRb, es un fenómeno común en el cáncer de mama. Esto respalda la búsqueda de medicamentos dirigidos a la maquinaria que controla el ciclo celular, como los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6. Hasta ahora, la FDA ha aprobado tres inhibidores (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) para tratar el cáncer de mama metastásico con receptores hormonales positivos (HR+) y HER2 negativo [20]. Estos fármacos han demostrado ser efectivos en la mejora de los resultados clínicos, pero la resistencia al tratamiento ya sea innata o adquirida, puede reducir su eficacia. La investigación clínica y traslacional se enfoca ahora en comprender los mecanismos de sensibilidad y resistencia a los inhibidores de CDK4/6 y en desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar los resultados en pacientes [19], [22].

Experimentalmente se han demostrado las propiedades inhibitorias de las xantonas en proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK2/4/6) y, si bien es conocida su actividad anticancerígena en diferentes líneas celulares (MDA-MB231, MCF-7, 22Rv1) aún se desconoce el mecanismo por el cual actúan estas moléculas [48], [50], [51], [52].

2.2 Hipótesis

Las xantonas extraídas de *Garcinia mangostana* poseen una afinidad de unión significativa hacia las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) particularmente CDK2, sugiriendo que su actividad anticancerígena la obtienen inhibiendo el ciclo celular. Esto será comprobado mediante el uso de diversos programas de acoplamiento molecular, al obtener valores de las energías libres de unión para identificar a la xantona más prometedora para el diseño de nuevos inhibidores de CDK en la lucha contra el cáncer de mama resistente a terapia hormonal.

2.3 Objetivos

Objetivo general

Analizar el acoplamiento molecular de las seis xantonas propuestas con la proteína CDK2 para evaluar su potencial como agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama resistente a la terapia hormonal.

Objetivos específicos

- Analizar el tipo de interacciones relevantes para la formación del complejo xantona-CDK2.
- Determinar, analizar y discutir los mejores sitios de unión entre las diferentes moléculas de xantonas con la proteína CDK2, así como los valores de energía libre al obtener los complejos formados ligante-receptor.
- Comparar los resultados obtenidos con los diferentes programas de acoplamiento molecular mediante el análisis de los algoritmos y sus funciones de puntuación.

Capítulo 3. Marco teórico

3.1 Fundamentos de la teoría cuántica y molecular

La forma en la que actúan las moléculas está determinada por partículas más pequeñas que los átomos. Para entender cómo trabajan estas partículas se hace uso de la mecánica cuántica.

Los métodos de la mecánica cuántica utilizan la solución de la ecuación de Schrödinger para entender el comportamiento de los átomos y moléculas. Esto nos permite calcular las estructuras tridimensionales, la energía y la función de onda de las moléculas basándonos en sus componentes básicos, como los electrones y los núcleos [68]. Gracias al creciente desarrollo en los programas computacionales y en el hardware, ahora es posible hacer cálculos en sistemas como las biomoléculas, aunque con algunas simplificaciones.

3.2 Ecuación de Schrödinger

La solución de la ecuación de Schrödinger es la forma de describir cómo se comportan los electrones y núcleos dentro de una molécula. En esta ecuación, el operador Hamiltoniano (\hat{H}) está representado por la suma dos operadores: el operador de la energía cinética (\hat{T}) y el operador de la energía potencial (\hat{V}) del sistema molecular (*Ecuación 1*), y que en unidades atómicas tiene la siguiente representación:

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

y donde μ y ν representan a los núcleos, mientras que i y j a los electrones, siendo el primer término correspondiente a la energía cinética de los electrones, el segundo es

la energía cinética de los núcleos, el tercero corresponde a las repulsiones entre los núcleos, el cuarto término corresponde a la energía potencial de las atracciones entre los electrones y el núcleo y el último término corresponde a las repulsiones entre los electrones, por lo tanto la ecuación de Schrödinger adquiere la siguiente forma:

$$\hat{H}\psi(\vec{r},\vec{R}) = E\psi(\vec{r},\vec{R}) \quad (2)$$

donde ψ es la función de onda que depende de un conjunto de componentes de vectores que describen la posición de cada partícula, \vec{r} la de los electrones y \vec{R} la de los núcleos (Ecuación 2). Por lo tanto, el objetivo de resolver la ecuación de Schrödinger es con la finalidad de obtener los niveles de energía y las funciones de onda de un sistema molecular estable [68].

3.3 Acoplamiento molecular

Esta técnica de modelado computacional nos permite predecir cómo una molécula pequeña (ligante) se unirá de manera preferente a una macromolécula (receptor) para formar un complejo estable [69]. Para predecir la estructura del complejo ligante-receptor se requieren pasos interconectados: En primer lugar, el muestreo de conformaciones del ligante en el sitio activo de la proteína; y en segundo la clasificación de las conformaciones resultantes mediante una función de puntuación [69]. Finalmente, según el puntaje obtenido mediante esta función de puntuación, se seleccionará las conformaciones más estables y se asume que es lo más cercano a lo que sucede de manera experimental. A partir de la orientación preferida de unión del ligante al receptor es posible estimar la energía libre de unión, así como la fuerza y la estabilidad del complejo [70].

Para lograr la mejor conformación posible de unión entre dos moléculas es necesario minimizar la energía libre del sistema (ΔG_{enlace}). Para calcular la energía libre de enlace, ΔG_{enlace} , se consideran factores como las energías libres de dispersión y repulsión (ΔG_{vdw}), enlaces de hidrógeno (ΔG_{H_enlace}), desolvatación (ΔG_{desolv}), electrostáticos (ΔG_{elec}), energía de torsión libre, (ΔG_{tor}), energía total final (ΔG_{total})

y energía no ligada al sistema (ΔG_{umb}) (Ecuación 3) [71]. Una representación esquemática del procedimiento para realizar un cálculo de un *Docking* molecular. (Figura 10)

$$\Delta G_{enlace} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{H_{enlace}} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{total} - \Delta G_{umb} \quad (3)$$

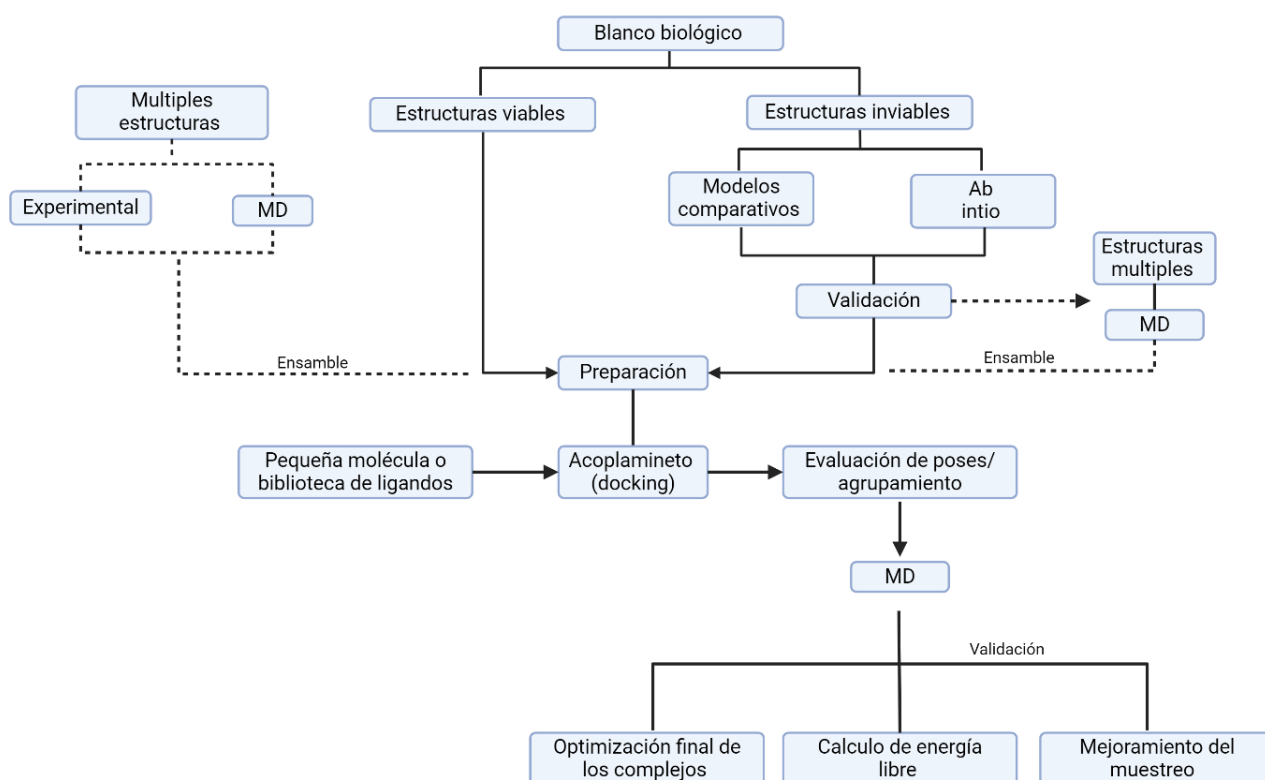


Figura 10. Diagrama general de la metodología del acoplamiento molecular (*Docking* molecular) Imagen de elaboración propia.

3.4 Algoritmos

Las simulaciones de acoplamiento molecular requieren velocidad y exactitud para lograr resultados exitosos [72]. Un algoritmo de acoplamiento molecular debe ser capaz de identificar nuevos compuestos prometedores en el proceso de cribado virtual o bien, replicar con alta precisión las conformaciones observadas en experimentos para la validación de los resultados del acoplamiento con base a datos obtenidos experimentalmente [73].

Coincidencia de formas “Shape Matching” (SM, por sus siglas en inglés).

SM analiza la superposición de la forma del ligante con la forma del sitio activo del receptor para predecir la conformación de la unión. Combinando aspectos como la complementariedad de formas y parámetros electrostáticos, ha demostrado alta precisión en simulaciones [74]. Este algoritmo es especialmente útil cuando se dispone de información limitada sobre la estructura del sitio activo del receptor, ya que se basa principalmente en la forma de las moléculas en lugar de en sus interacciones específicas. Además, este enfoque es computacionalmente eficiente y puede manejar de manera efectiva ligantes flexibles y sitios activos con conformaciones múltiples [75].

Construcción incremental “Incremental Construction” (IC, por sus siglas en inglés).

IC se basa en la construcción paso a paso de la conformación del ligante dentro del sitio activo del receptor. Tomando en cuenta la flexibilidad del ligante, los fragmentos rígidos se acoplan primero, actuando como anclas, y posteriormente se conectan con las partes más flexibles del ligante que poseen enlaces giratorios [74]. Este algoritmo es especialmente útil cuando se dispone de información detallada sobre la estructura del sitio activo del receptor, ya que permite explorar una amplia variedad de conformaciones del ligante dentro del sitio activo. Además, es capaz de manejar ligantes flexibles y sitios activos con conformaciones múltiples [76]

El Recocido Simulado “Simulated annealing” (SA, por sus siglas en inglés).

El algoritmo de Recocido Simulado (*Simulated Annealing*) es una técnica de optimización probabilística utilizada en algunos programas de acoplamiento molecular para explorar el espacio de búsqueda de conformaciones ligante-receptor y encontrar la conformación más estable desde el punto de vista conformacional. En SA, se simula un sistema biomolecular reduciendo gradualmente la temperatura en intervalos durante la simulación de cada conformación. Esto puede aumentar la precisión al considerar detalladamente los estados conformacionales y la flexibilidad en diferentes condiciones termodinámicas. Sin embargo, el acoplamiento mediante SA puede ser más lento debido a la necesidad de repetir el ciclo de recocido para cada ligante. Para reducir el costo computacional, se pueden aplicar filtros entre la colocación del ligante y los ciclos, descartando soluciones poco probables mediante cálculos de energía libre o verificaciones de choques estéricos y coincidencias de distancia [74].

Simulaciones Monte Carlo (MC)

Este tipo de simulaciones se originaron principalmente en el ámbito de la dinámica molecular y luego se expandieron a aplicaciones de acoplamiento flexible. Es eficiente para determinar constantes de unión en sistemas proteicos y útil para analizar sistemas biomoleculares bajo diversas condiciones termodinámicas. Sin embargo, no son adecuadas para procesos dependientes del tiempo. En acoplamiento flexible, el algoritmo MC posiciona aleatoriamente el ligante en el sitio receptor, evitando mínimos locales [74]. Este proceso se repite un gran número de veces, y la probabilidad de aceptar conformaciones de alta energía disminuye con el tiempo, lo que permite al algoritmo converger hacia la conformación de energía más baja [77].

Programación evolutiva “Evolutionary Programming” (EP, por sus siglas en inglés).

El algoritmo EP emplea modelos computacionales basados en procesos evolutivos naturales para solucionar problemas. Aunque existen diversos modelos, todos siguen el principio de imitar la evolución de las especies mediante selección, mutación y reproducción, dependiendo del desempeño de los individuos en un entorno específico. Para simular la conservación de las características más ventajosas, se utilizan operadores genéticos que son métodos computacionales de procesos naturales. En un contexto donde hay un problema con múltiples soluciones posibles, cada solución se evalúa y clasifica según ciertos parámetros. Solo las soluciones mejor clasificadas se mantienen para el siguiente ciclo de cálculo, repitiendo este proceso hasta encontrar una solución óptima. EP es un tipo de algoritmo heurístico, lo que significa que generalmente encuentra una de las mejores soluciones, pero puede quedarse atascado en soluciones óptimas locales sin alcanzar la mejor solución global [74], [78].

Algoritmos Genéticos “Genetic Algorithm” (GA, por sus siglas en inglés).

El algoritmo GA es una técnica clave en la Programación Evolutiva, utilizada para hallar la conformación más precisa y cercana al mínimo de energía global. GA se basa en la primicia del cruce de cromosomas (padres) para producir un nuevo cromosoma (descendiente) que puede heredar las mejores características de ambos padres. Este método se emplea en algoritmos de acoplamiento complejo, donde se consideran factores como tasas de mutación y cruce [74]. Una variante es el Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), este algoritmo alterna entre espacios genotípicos y fenotípicos, combinando la mutación y el cruce con la optimización de la función de energía. Este proceso se repite durante un número determinado de generaciones, y la población evoluciona hacia conformaciones de ligante que tienen una energía de interacción ligante-receptor más baja [72].

Tanto GA como LGA facilitan la identificación de las conformaciones óptimas de ligantes mediante la simulación de procesos evolutivos y la optimización de

parámetros energéticos, mejorando así la eficiencia y precisión en la búsqueda de conformaciones ideales para el acoplamiento molecular.

3.5 Función de puntuación

La efectividad de un acoplamiento radica en la precisión de la función de puntuación, que es crucial para guiar y definir las posiciones del ligante entre miles de configuraciones posibles [79]. Esta función ayuda a determinar el modo y sitio de unión del ligante, predecir la afinidad de unión e identificar potenciales fármacos para un objetivo proteico específico. Se evalúan tres aspectos principales: La geometría de acoplamiento, que tan bien el sistema puede colocar, reconocer la posición nativa y alineación de un ligante unido a su proteína. La utilidad del cribado, que describe el rendimiento de la clasificación de ligantes nativos de una proteína por encima de ligantes aleatorios. Y la precisión de puntuación, donde el sistema es capaz de clasificar correctamente los ligantes verdaderos por encima de los que no lo son [73].

Estas funciones de puntuación se pueden clasificar en cuatro categorías. Basada en la física, empíricas, basada en conocimiento y basada en aprendizaje automático. Las tres primeras se distinguen por los tipos de elementos característicos que emplean, usando principalmente métodos de regresión lineal. El cuarto tipo incorpora métodos de regresión no lineal a través del aprendizaje automático [79].

En las funciones de puntuación basadas en la física incluyen aquellas basadas en campos de fuerza, modelos de solvatación y métodos de mecánica cuántica. Estas funciones clásicamente calculan la energía de unión sumando interacciones de van der Waals y electrostáticas entre proteínas y ligantes, considerando principalmente la entalpía, pero no la entropía ni el efecto del disolvente, por lo que vuelve su rendimiento no lo suficientemente bueno [80]. Algunas de estas funciones basadas en los campos de fuerza han incorporado la entropía de torsión de los ligantes y los efectos de solvatación/desolvatación mediante modelos solventes explícitos e implícitos, pero de igual manera su precisión predicativa está sujeta significativamente a la función de la energía potencial [76]. De igual manera se han desarrollado

funciones físicas basadas en la mecánica cuántica para abordar retos como las interacciones covalentes y la transferencia de carga, aunque con un mayor costo computacional. Para equilibrar este costo y la precisión, se ha desarrollado el enfoque híbrido de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) [81], [82].

Las funciones de puntuación empíricas estiman la afinidad de unión en complejos proteína-ligante sumando factores energéticos clave como enlaces de hidrógeno y efectos hidrofóbicos. Estas funciones se optimizan usando conjuntos de datos con afinidades de unión conocidas y análisis de regresión lineal. Son comúnmente usados en programas de "*Docking*" de proteínas y ligantes [83], [84]. A diferencia de las funciones de puntuación basados en la física, las empíricas tienden a ser más eficientes en predecir la afinidad de unión y la postura del ligante con un costo computacional bajo. Sin embargo, no son tan adecuados para describir la relación entre la afinidad de unión y las estructuras cristalinas, y pueden presentar problemas de doble conteo [79].

Por otra parte, las funciones basadas en conocimiento están formuladas con el principio estadístico de Boltzmann. La mayor ventaja de esta función es el costo informático y la precisión predictiva en comparación con los métodos anteriores. En cuanto a las funciones basadas en aprendizaje automático, estas emplean una variedad de algoritmos de aprendizaje automático (máquina de vectores, una red neuronal o aprendizaje profundo), que por lo regular no son incorporados directamente al software ya que este tipo de función se basa en los datos de entrenamiento, por lo tanto, se recomienda un acoplamiento clásico para después utilizar una función de aprendizaje automático y mejorar la precisión [79].

3.6 Programas computacionales de Docking Molecular

ArgusLab

ArgusLab 4.0.1 [85] es un *software* de modelado molecular ideal para modelado básico, con el que se pueden realizar acoplamientos flexibles de ligantes. Esto se logra describiendo el ligante como un árbol de torsión y delimitando al sitio activo con una rejilla o cuadrícula. El ligante se coloca dentro de esta rejilla y se crean diferentes conformaciones energéticamente favorables mediante rotación. Estas conformaciones o posiciones son evaluadas con funciones de puntuación específicas. Las poses con menor energía se conservan para una minimización, reagrupación y clasificación [86].

Originalmente ArgusLab se diseñó como un programa de modelado molecular ofreciendo varias funciones incluyendo el acoplamiento molecular, utiliza el campo de fuerza UFF8 para sus cálculos moleculares y sus motores de acoplamiento son ArgusDock (algoritmo de búsqueda basado en la forma) y GA Dock (Algoritmo Genético), empleando AS score como función de puntuación para evaluar sus resultados. ArgusLab posee una interfaz gráfica de usuario GUI y es compatible con el sistema operativo Windows lo que lo convierte en un software de acoplamiento accesible especialmente para investigadores sin experiencia en UNIX [87], [88].

Glide

Glide de Schrödinger [89] es una herramienta para realizar acoplamientos de ligantes flexibles en una estructura de receptor rígido mediante una exploración rápida de los múltiples grados de libertad conformacional de los ligantes, así como sus orientaciones y posiciones.

Existen tres maneras en Glide para realizar acoplamiento, cada una con una manera distinta de analizar los grados de libertad y diferentes funciones de puntuación [90].

Cada uno de los modos de Glide crea una serie completa de posibles conformaciones para el ligante y utiliza varios filtros para evaluar rápidamente sus posibles orientaciones y posiciones [90], [91].

Emplea la función de puntuación “*Emodel*” para elegir entre diferentes complejos proteína-ligante de un mismo ligante y usa un “*GlideScore*” para clasificar compuestos, diferenciando los que se unen fuertemente (activos) de los que no (inactivos). *Emodel* se basa principalmente en la energía coulomb-vdW entre la proteína y el ligante. *GlideScore* es una función de puntuación empírica que se ha diseñado para separar eficazmente los compuestos con alta afinidad de unión de aquellos con poca o ninguna. Esta función incluye términos que representan aspectos físicos del proceso de unión, como interacciones lipofílicas, enlaces de hidrógeno, penalizaciones por enlaces rotativos, y la energía coulomb-vdW entre la proteína y el ligante. Adicionalmente, *GlideScore* cuenta con términos para los sitios hidrofóbicos, que implica la expulsión de moléculas de agua por el ligante en áreas donde abundan átomos lipofílicos de la proteína. La formación de enlaces de hidrógeno entre la proteína y el ligante en estas regiones hidrofóbicas es especialmente favorable para la unión [91]. Esta función de puntuación tiene dos modalidades, Standard Precision (SP) y *Xtra Precision* (XP). Se puede decir de una manera más resumida que la función SP *GlideScore* se aplica para ordenar los compuestos que han sido acoplados mediante los modos SP o HTVS de Glide y, por otra parte, XP Glide inicia con un proceso de acoplamiento similar al SP Glide, pero aparte hace un análisis más detallado de las posibles formas de unión del ligante, empleando un algoritmo de anclaje y crecimiento que explora más extensamente sus grados de libertad. La función de puntuación XP *GlideScore* se distingue por incluir elementos específicos que ayudan a identificar y valorar patrones estructurales claves en el proceso de unión [91].

Induced Fit Docking (IFD)

El “*Induced Fit Docking*” (Acoplamiento con Ajuste Inducido) de Schrödinger [92] tiene en cuenta los cambios conformacionales tanto en el ligante como en el receptor durante la formación de la unión. A diferencia de otros métodos de acoplamiento que asumen que tanto el ligante como el receptor son rígidos, el *Induced Fit Docking* permite que tanto el ligante como el receptor se ajusten para optimizar la interacción [93].

La modelización del acoplamiento mediante el ajuste inducido se destaca principalmente porque:

- Permite la creación de una estructura compleja y precisa para un ligante activo, especialmente en casos donde éste no se adapta adecuadamente a una estructura receptora preexistente y rígida.
- Facilita la identificación y recuperación de falsos negativos en procesos de cribado virtual. En estos casos, en lugar de utilizar una única conformación del receptor, se aplican múltiples conformaciones generadas a través de IFD, mejorando así la precisión del cribado.

El protocolo IFD es utilizado en los programas Glide y Prime para examinar minuciosamente los posibles modos de unión y los cambios conformacionales en los sitios activos del receptor.

Prime es un programa desarrollado por Schrödinger el cual produce modelos detallados de todas las partes de la molécula que se ajustan a los datos de difracción de rayos X, incluyendo minimización del espacio recíproco, construcción de bucles y colocación de cadenas laterales [94]. Esto permite predecir las geometrías con mayor exactitud de los sitios activos.

El procedimiento de Ajuste Inducido inicia con el acoplamiento del ligante activo mediante Glide. Para obtener una amplia variedad de posiciones del ligante, se utilizan radios de van der Waals reducidos y un límite de Coulomb-vdW aumentado. Durante el acoplamiento, se pueden eliminar temporalmente las cadenas laterales altamente flexibles. Posteriormente se emplea Prime para adaptar la estructura, reorientando las cadenas laterales cercanas al ligante. Se minimizan tanto estos residuos como el ligante y finalmente, cada ligante se reacopla a las estructuras proteicas de baja energía correspondientes, clasificando los complejos resultantes mediante una función de puntuación que integra las energías *GlideScore* y *Prime* [91].

Método MM/GBSA

Mecánica molecular/ área de superficie de Born generalizada (MM/GBSA por sus siglas en inglés) es considerado un método de puntuación de alto nivel. Utiliza modelos físicos más realistas considerando la solvatación, la electrostática y la entropía en la evaluación. Una ventaja es que permiten la flexibilidad tanto en el ligante como en la proteína, permitiendo los ajustes estructurales necesarios. Sin embargo, debido a su alta complejidad teórica, suelen ser más lentos que los métodos de acoplamiento tradicionales [95]. Considerando esto, se utilizan después del acoplamiento para evaluar nuevamente las interacciones de menor energía.

Se ha demostrado que el uso de una combinación de acoplamiento y re-puntuación posterior con métodos MM-PB/GBSA, se reducen las tasas de falsos positivos y se pueden identificar nuevos inhibidores [96].

La energía libre de unión se puede dividir en términos entrópicos y entálpicos, considerando una suma de la energía de interacción de la mecánica molecular en fase gaseosa entre el ligante y la proteína (ΔE_{MM}), el efecto de la solvatación (ΔG_{solv}) y el cambio de la entropía conformacional a la unión del ligante ($-T\Delta S$) (Ecuación 4).

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{int} + \Delta E_{ele} - \Delta E_{vdw} \quad (4)$$

El término ΔE_{MM} (Ecuación 5) de la interacción de la mecánica molecular en fase gaseosa considera los cambios de las energías internas (ΔE_{int}) que se refiere a las energías de enlace, ángulos y diédricas además considerando el cambio de la energía electrostática (ΔE_{ele}) y las interacciones de van der Waals (ΔE_{vdw})

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{GB} + \Delta G_{SA} \quad (5)$$

El término del efecto de solvatación (*Ecuación 6*) corresponde a la suma de las contribuciones polares (electrostáticas, solvatación y ΔG_{GB}) y las contribuciones no polares (ΔG_{SA} usualmente estimadas a través de la superficie donde puede acceder el solvente) entre el soluto y el disolvente continuo.

$$\Delta G_{enlace} = \Delta G_{MM} + \Delta G_{solv} - T\Delta S \quad (6)$$

Capítulo 4: Metodología

4.1 Selección de xantonas.

Se realizó una búsqueda en la literatura científica de xantonas extraídas de *Garcinia mangostana* que hayan demostrado propiedades anticancerígenas, las cuales en todos los casos se comprobaron mediante ensayos enzimáticos y celulares *in vivo* e *in vitro* demostrando eficiencia en la detención de la proliferación del ciclo celular de múltiples líneas celulares.

Se seleccionó un total de seis xantonas: α -mangostin (X1), γ -mangostin (X2), mangostenol (X3), garcinon D (X4), tovophyllin A (X5), gartanin (X6), las cuales se emplearon como ligantes en los acoplamientos, ver Tabla 2. El receptor para las xantonas fue la enzima CDK2, que como se mencionó anteriormente, está relacionada con la progresión del ciclo celular y cuya desregularización está asociada a diversos cánceres incluyendo el cáncer de mama [22], [56] por lo cual es un potencial blanco terapéutico.

Tabla 2. Xantonas seleccionadas con la abreviatura asignada en este estudio para cada una de ellas y los códigos CID de la base de datos PubChem.

Xantona	Abreviatura	Código CID
α -mangostin	X1	5281650
γ -mangostin	X2	5464078
Mangostenol	X3	5495927
Garcinon D	X4	5495926
Tovophyllin A	X5	42645954
Gartanin	X6	5281633

4.2 Obtención de las estructuras moleculares.

Xantonas

Las estructuras tridimensionales de cada xantona fueron recuperadas y descargadas en formato .sdf (*Structure Data Format*) de la base de datos PubChem del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) como se muestra en la Tabla 2. Se compararon las estructuras encontradas en PubChem con las reportadas en diferentes artículos (Tabla 1), y se consideró la calidad de la estructura tomando en cuenta la resolución (resolución menor a 2.5 Å), la representación de la molécula y referencias cruzadas [97], [98].

Estructura proteica

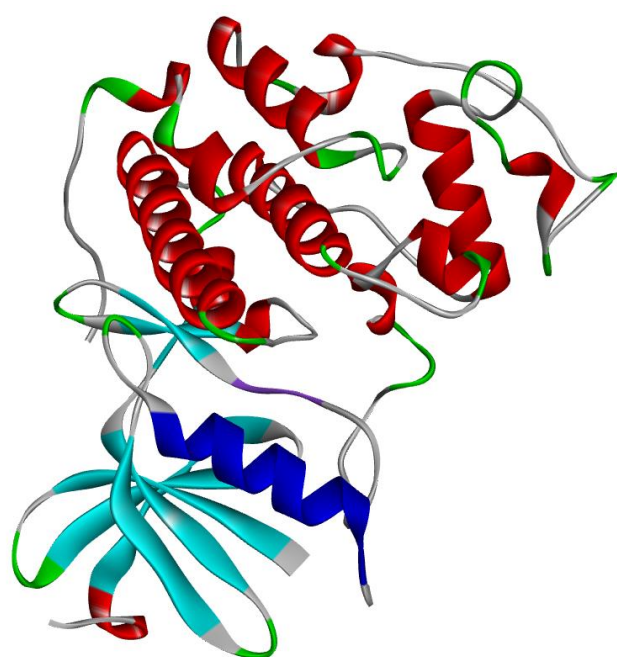
La estructura de la enzima CDK2 (Figura 11) reportada en el artículo "*Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2*" por los autores Betzi et al. 2013 [99]. Fue descargada de la base de datos "*Protein Data Bank*" (PDB <https://www.rcsb.org/>) con el código ID 3PXQ para el acoplamiento. De igual manera se consideraron aspectos como la resolución (1.90 Å), que no contara con mutaciones, y/o estructuras ajenas a la proteína como ligantes o cofactores.

Esta enzima está constituida por una sola cadena de 306 aminoácidos. Se encuentra plegada en un lóbulo N-terminal (residuos 1-89) en el cual se encuentra una hoja β antiparalela a cinco hebras y una hélice C principal, junto con un lóbulo C-terminal de mayor tamaño compuesto en su mayoría por hélices α . Los dos dominios terminales están entrelazados por una cadena peptídica (residuos 85-87) que actúa como conector de los dos lóbulos para dar flexibilidad a la estructura sin alterar la forma secundaria de la proteína [100]. Los residuos catalíticos como el segmento de activación engloban al motivo DFG (conformado por Ácido aspártico145, Fenilalanina146, Glicina147) y APE (conformado por Alanina170, Prolina171, Ácido

Glutámico172), y al aminoácido Thr160 que funge como sitio de fosforilación [101] y se encuentran dentro del dominio C-terminal de mayor tamaño.

Definición del sitio de unión alostérico

Este sitio fue identificado por primera vez mediante la molécula del ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (ANS, por sus siglas en inglés) que se une a una región situada aproximadamente a mitad de camino entre el sitio ATP y la hélice C. Los residuos “guardianes” Phe80 y Lys33, junto con el motivo DFG protegen el bolsillo de ATP para asegurar que el sitio que ocupa ANS se extienda sobre la hélice, apuntando en dirección opuesta a la región DFG. ANS interrumpe la interacción entre CDK2 y la ciclina causando cambios conformacionales en la hélice C que son incompatibles con la asociación de ciclina A. Sin embargo, cuando compuestos pequeños se unen al sitio ATP, el sitio alostérico se vuelve susceptible a una transición conformacional significativa en donde las moléculas que se unen al bolsillo de ANS disocian a la ciclina A de CDK2, acompañadas de cambios importantes en el bucle de activación y la región DFG. Esto también impide que la enzima interactúe eficazmente con la ciclina A, inhibiendo finalmente la actividad catalítica del complejo CDK2/ciclina A. En este sitio los inhibidores se fijan a través de puentes salinos, además de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [99], [102]. Investigaciones subsecuentes al descubrimiento de este sitio, reportan a Leu55 como un residuo trascendente para la unión e inhibición de la enzima CDK2 (Figura 11) [103].



A

		10		20		30		40	
S	P	E	F	M	E	N	F	Q	K
V	P	S	T	A	R	E	I	S	L
L	N	H	P	N	I	V	K	L	L
L	K	F	M	D	A	S	A	L	T
P	Q	N	L	I	N	T	E	G	A
I	L	L	G	C	K	Y	S	T	A
F	R	T	L	G	T	P	D	E	V
G	R	S	L	S	Q	M	L	H	Y

B

Figura 11. **A.** (Imagen recuperada de PDB ID: 3PXQ) Representación tridimensional de un monómero de la estructura de la enzima CDK2, **B.** Secuencia de aminoácidos de CDK2. En ambas imágenes se resalta en azul la hélice C y en magenta el dominio DFG, fragmentos que son indispensables para la unión del sitio alostérico. Imagen de elaboración propia.

4.3 Optimización de la geometría molecular

Las geometrías iniciales se obtuvieron de la base de datos de PubChem. Posteriormente, se realizó la optimización de la geometría que permite tener una representación más precisa de las posiciones y orientaciones de los átomos de una molécula (Figura 12). Se utilizó la teoría de funcionales de la densidad con APFD como funcional y 6-31+g(d) como conjunto de funciones base para describir la correlación y la dispersión de cada una de las xantonas [104]. La mayoría de las xantonas no cuentan con una estructura molecular cristalina resuelta por lo que, para asegurar la obtención de las estructuras tridimensionales que representen el punto de energía más bajo en la superficie de energía potencial de la molécula, se calcularon las frecuencias vibracionales al mismo nivel de teoría (APFD/6-31+g(d)) utilizando el

programa computacional Gaussian09 [105]. Una vez verificada la geometría molecular más estable, se guardaron los datos en archivo con formato .pdb y .sdf para su posterior empleo en los cálculos de Acoplamiento Molecular.

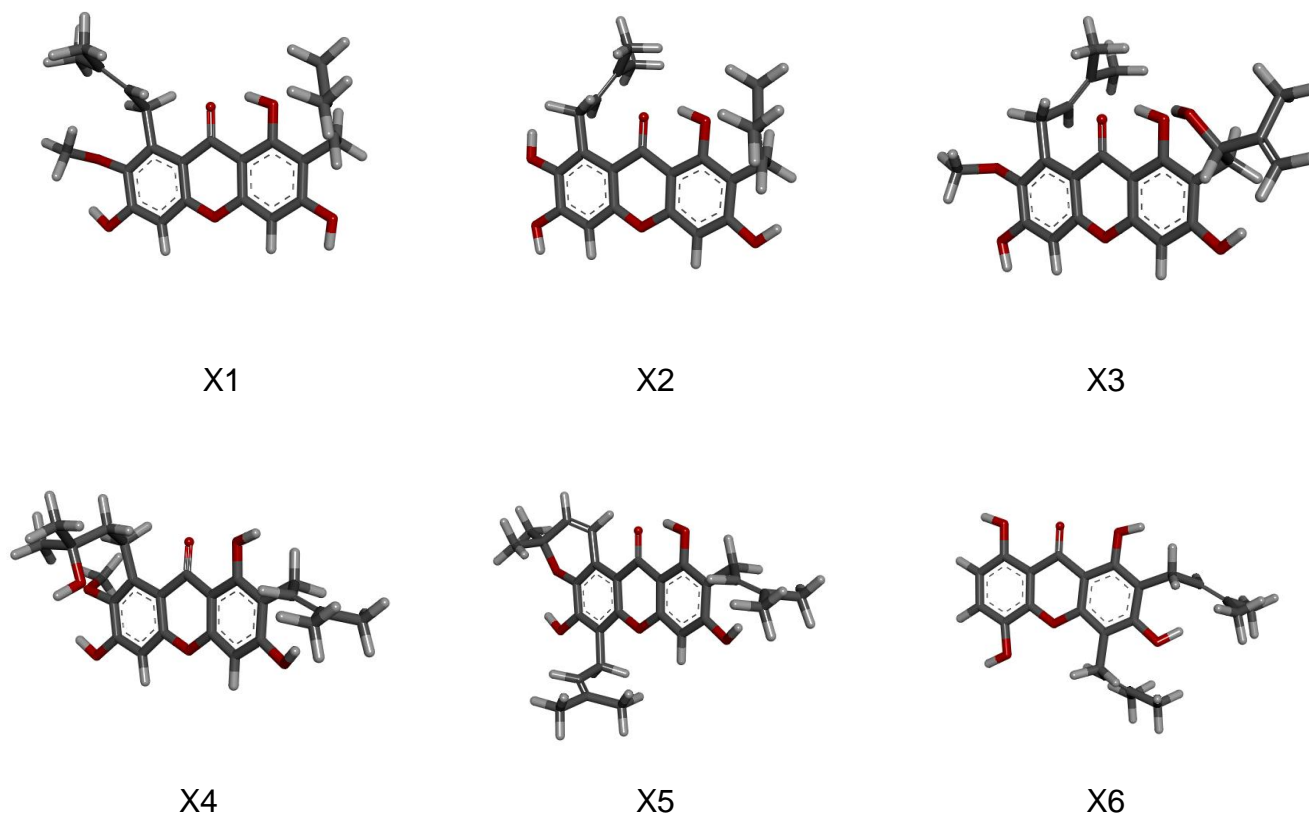


Figura 12. Visualización 3D de la estructura molecular optimizada de las xantonas con Gaussian09 elegidas [106] extraídas de la base de datos PubChem. Imagen de elaboración propia.

4.4 Acoplamiento molecular

La simulación del acoplamiento molecular entre las seis xantonas con la enzima CDK2 se realizó de manera semiflexible (ligante flexible - receptor rígido) utilizando tres programas computacionales ArgusLab, Glide e *Induced Fit Docking*. Se realizó un proceso de validación de la técnica utilizada en cada uno de los programas. Para ello, se realizó un *re-acoplamiento (re-docking)* con el ligante de cristalización (ANS, etiquetado como 301AN en la entrada del PDB: 3PXQ), que es una molécula reportada en la literatura como un buen inhibidor de la actividad de la CDK2, por lo que sirvió como ligante de referencia. La metodología en estos programas difiere un poco, por lo que se describen por separado a continuación.

ArgusLab

Se utilizó la versión ArgusLab 4.0.1 la cual es de libre acceso y se encuentra disponible en: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>. Este programa requiere al receptor en formato .pdb y a los ligantes en formato .sdf.

El primer paso consiste en la preparación de la enzima receptora, es decir, se eliminan aquellas moléculas que puedan interferir en el acoplamiento. Esta limpieza se realiza con la opción "*Molecule tree view*" quitando todas las moléculas no proteicas, en este caso agua, moléculas 300 2AN, 301 2AN, 302 AN y 299EDO, conservando la cadena aminoacídica A. Se agregaron hidrógenos polares a todos los aminoácidos y posteriormente se definieron a aquellos que participan en el sitio de unión (*Binding site*). Lista la enzima, se cargó el archivo con la información molecular de cada una de las xantonas en "*Molecule tree view*" en donde cada una fue definida como ligante.

Con la opción "*Set up Docking calculation*" se estableció la rejilla de acoplamiento (*Bounding box*) para un *docking* ciego, es decir, se indicó que el espacio de búsqueda considerara la estructura proteica completa. El programa calcula automáticamente las dimensiones de la caja englobando a la enzima. Los valores de la caja en cada uno de los ejes cartesianos son X: 5108039, Y: 40.9779, Z: 60.0000. Posteriormente, en

Docking Enginey se colocó en la opción “*Ligand*” Flexible y para iniciar el acoplamiento se dejaron los demás parámetros por defecto.

El archivo resultante del proceso se guardó en formato .pdb y los resultados de los cálculos en un archivo con formato .txt. Para visualizar el complejo proteína-ligante y analizar las interacciones formadas después del acoplamiento, se utilizó el programa DiscoveryStudio en su versión libre [106] con el que se generaron diagramas 2D y 3D (Figura 15).

Glide

La suit de Schrödinger ofrece varias herramientas y protocolos para el acoplamiento de ligantes, incluyendo Glide, XP Glide, y Prime. En este trabajo se utilizó Glide cuyo protocolo consiste en 4 pasos principales:

1. Preparación de la proteína (*Protein Preparation Wizard*)

Se ingresó la información de la cadena A de la enzima CDK2 en formato .pdb y se realizó el protocolo de preparación según el asistente disponible para ello en la interfaz *maestro*. Se agregaron átomos de hidrógeno y las cargas correspondientes a la proteína.

Se analizó el espacio de trabajo y se eliminaron las moléculas de agua, así como aquellas moléculas que no son relevantes en el acoplamiento (300 2AN, 301 2AN, 302 AN y 299EDO). Teniendo limpia la estructura de moléculas no proteicas, la cadena A de la enzima se optimizó con el campo de fuerza OPLS-2005.

2. Generación de la rejilla de acoplamiento (*Receptor Grid Generation*)

Preparada la enzima, se generó la rejilla de acoplamiento con la opción “*receptor grid*” en la cavidad reportada como sitio alostérico por Betzi et. al 2011 y Liu et al 2013 [99], [103]. El centro de la rejilla fue colocado según las coordenadas de la molécula 301AN

(PDB: 3PXQ) X:113.80, Y: 100.13, Z: 25.59. Posteriormente, en “*Receptor grid generation*” se definieron las coordenadas y se conservaron los demás parámetros por defecto.

3. Preparación del ligante (*LigPrep*)

La información molecular del ligante se cargó en un archivo con formato .sdf y se utilizó el protocolo “*LigPrep*” para finalmente llevar a cabo el acoplamiento con la opción de “*Ligand Docking*”.

4. Análisis de las interacciones del acoplamiento (*Ligand Interaction*)

Ligand Interaction permite visualizar gráficamente las interacciones individuales entre el ligante y la proteína, como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, e interacciones π - π (Figura 17).

Induced Fit Docking (Schrödinger)

Para realizar el acoplamiento se cargó la información molecular de la enzima CDK2 en un archivo .pdb y utilizando el asistente “*Protein Preparation Wizard*” se le colocaron átomos de hidrógeno y se les asignaron cargas. Se analizó el espacio eliminando las moléculas que no fueran parte de la cadena A de la enzima conservando únicamente la molécula 301AN, molécula de referencia para realizar el acoplamiento (centroide). Por último, se optimizó la estructura utilizando el campo de fuerza OPLS-2005. Se usaron los valores predeterminados de *Prime Induced Fit*, cambiando únicamente el protocolo de “estándar” (SP) a “*X Precisión*” (XP). Los resultados fueron analizados con la opción “*Ligand Interaction*” usando la misma metodología que se describió en Glide (Figura 19).

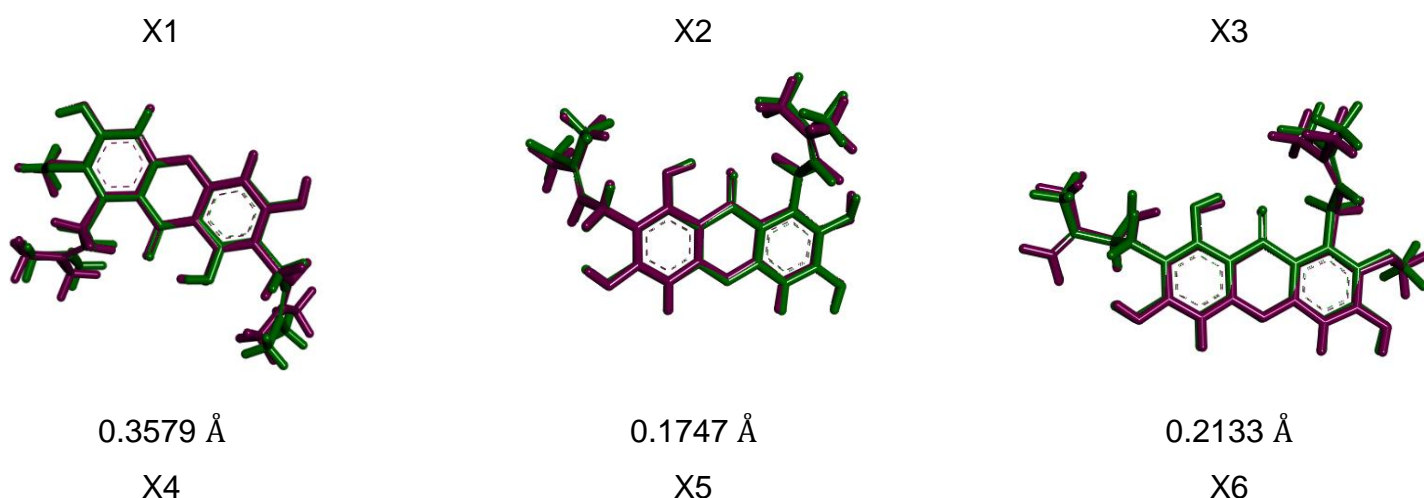
Método MM/GBSA

Otra metodología disponible en la suite de Schrödinger es “*Prime MM/GBSA*” que ayuda a corroborar los resultados de los acoplamiento realizados en Glide. Utilizando el archivo de salida del acoplamiento de Glide con el modelo de solvatación VSGB (*Variable Solvent Generalized Born*) conservando los demás parámetros por defecto. Después de ejecutarse el cálculo, los resultados se exportaron en formato .tvs y se analizaron en Microsoft Excel.

Capítulo 5: Discusión de resultados.

5.1 Optimización de la geometría molecular

Los resultados de los cálculos de las frecuencias vibracionales de las xantonas resultaron ser todas positivas con lo que se asegura que las estructuras finales corresponden a una molécula estable y que se encuentra en su conformación de mínima energía. Se realizó un cálculo de la Desviación Cuadrática Media (RMSD) para cuantificar la diferencia de posición entre los átomos de las moléculas iniciales y los átomos de las moléculas optimizadas (Figura 13) [107].



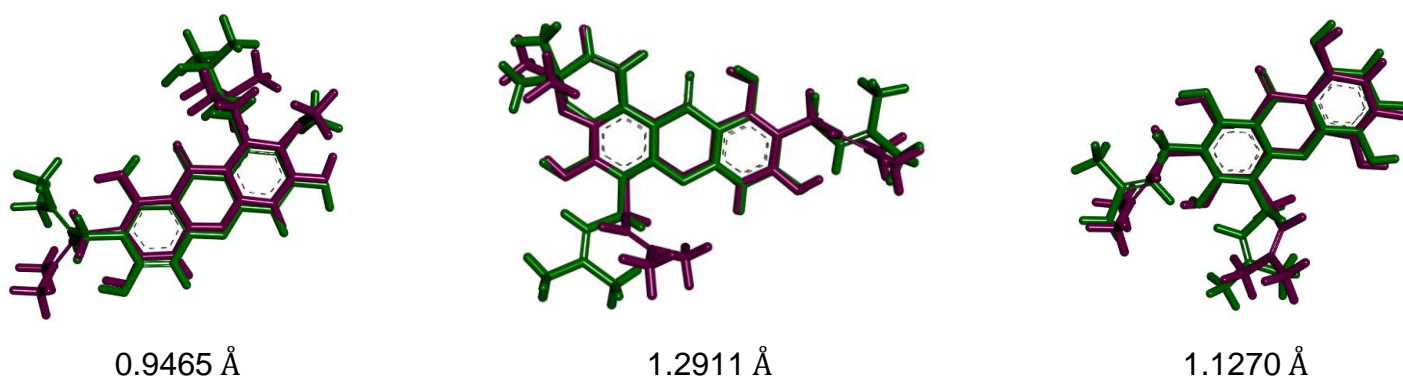


Figura 13. Imágenes superpuestas de las estructuras 3D obtenidas de PubChem (verde) y optimizadas (magenta) con sus respectivos valores de RMSD en Å. Imagen de elaboración propia.

Los valores de RMSD resultaron ser menores a 2.0 Å en todos los casos (Figura 13) observando un mayor cambio en la cadena alquílica sustituida, ya que la estructura primaria de las xantonas consiste en dos anillos bencénicos fusionados a un anillo de pirano (un anillo de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno), con la posición gamma (γ) del anillo de pirano unida a los dos anillos bencénicos dibenzo- γ -pirona que le confiere rigidez [108]. Por otra parte, la dibenzo- γ -pirona es estable debido a la conjugación electrónica proporcionada por los anillos bencénicos y el anillo de pirano. Las moléculas con mayor valor de RMSD son X4, X5 y X6 por contener carbonos con hibridación sp^3 en los sustituyentes, proporcionando un libre giro en cada uno. Resultados que eran de esperarse, pues las estructuras disponibles en esta base de datos son determinadas mediante programas computacionales que buscan similitud con estructuras resueltas experimentalmente, pero que no han sufrido un análisis estructural a nivel mecano-cuántico como las presentadas en este trabajo. Una vez obtenidas las estructuras de mínima energía, se prosiguió a realizar los acoplamientos.

5.2 Acoplamiento Molecular

ArgusLab

La validación de la metodología con el ligante 301AN muestra un valor de energía de afinidad de -12.79 kcal/mol, siendo este un valor muy alto negativo en comparación con los valores obtenidos para las moléculas de referencia en estudios similares de acoplamiento molecular. Por otra parte, el valor de RMSD que es de 0.3962 Å, muestra que el cambio estructural no fue significativo después del acoplamiento en la proteína en comparación a la conformación que muestra en la estructura cristalina (PDB ID: 3PXQ). Con respecto a las interacciones formadas, la mayoría resultaron ser similares a las reportadas en la bibliografía [99] con los aminoácidos Phe80, Val69-64, Leu55-58-78, Ile52, indicando un buen acoplamiento en el sitio de unión y la reproductibilidad de la técnica (Figura 14).

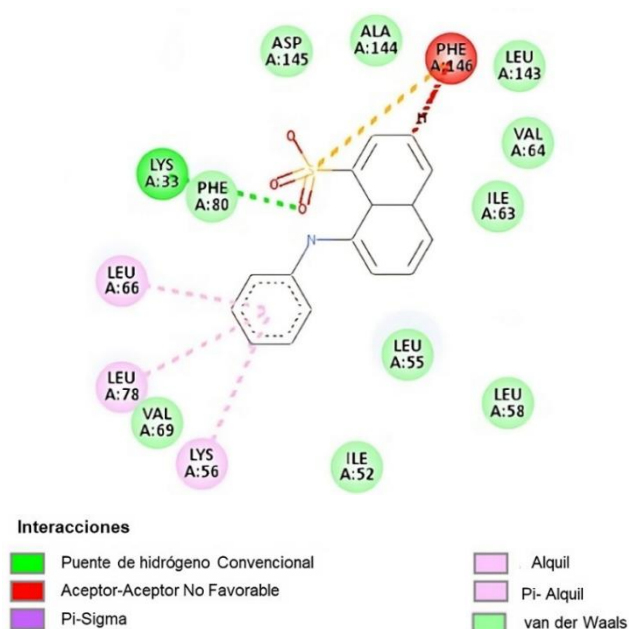
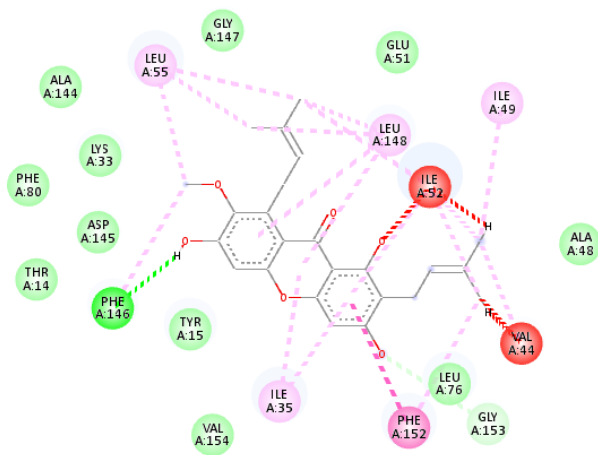


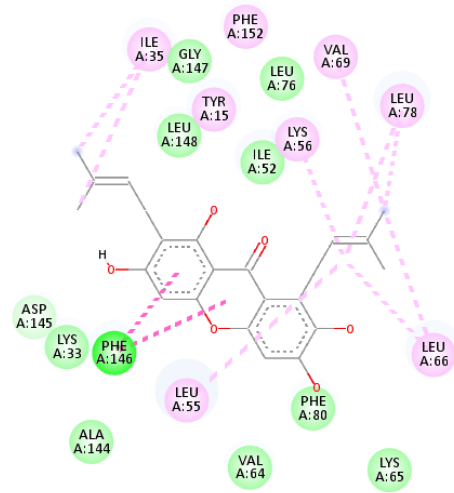
Figura 14. Diagrama 2D del re-acoplamiento de 301AN-CDK2 mostrándose las principales interacciones mediante las cuales alcanza su estabilidad.

Una vez validada la metodología, se realizaron los acoplamientos de tipo semiflexible con las seis estructuras optimizadas de las xantonas (ligantes) y, la cadena A de la enzima CDK2 (receptor). La rejilla se calculó automáticamente buscando el lugar de

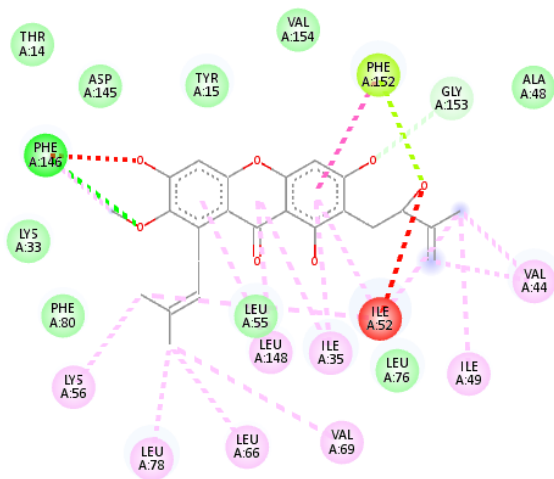
unión más afín para las xantonas dentro de la proteína. Los resultados de los acoplamientos se presentan en los diagramas 2D de la Figura 15.



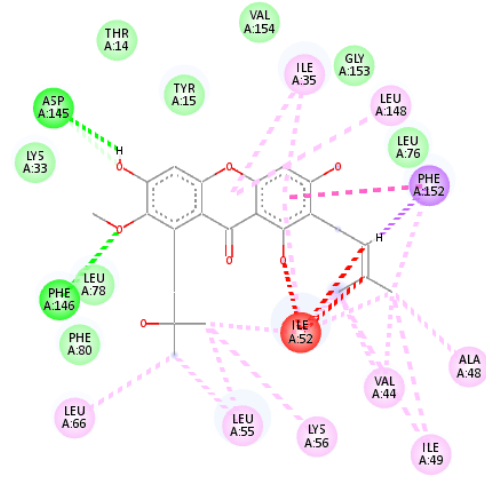
X1



X2



X3



X4

Tabla 3. Energía de afinidad en kcal/mol y las interacciones formadas entre la enzima CDK2 y las xantonas.

Xantona	Energía de afinidad (kcal/mol)	Interacción de residuos
X1	-11.92	Leu55 , Leu148, Ile52 , Ile49, Phe146 , Ile35, Phe152 , Gly153
X2	-13.32	Ile35, Phe152 , Tyr15, Lys56, Val69 , Leu78 , Asp145, Phe146 , Leu55 , Leu66
X3	-10.92	Phe146 , Phe152 , Gly153, Val44, Ile49, Ile52 , Ile35, Leu148, Val69 , Leu66 , Leu78 , Lys56
X4	-11.92	Asp145 , Ile35, Leu148, Phe152 , Ala48, Ile49, Val44, Ile52 , Lys56, Leu55 , Leu66, Phe146
X5	-13.34	Val64 , Leu55 , Leu66 , Lys56 , Ile52 , Lau78, Val69 , Tyr15, Ile35, Phe152 , Leu148, Phe146 , Phe80 , Ile63
X6	-12.88	Tyr15, Ile35, Phe152 , Leu78 , Leu76, Ile52 , Leu66 , Phe80 , Leu55 , Phe146 , Asp145 , Leu148

En verde se presentan los aa que forman uno o más puentes de hidrógeno; en negro se agruparon los aa que forman interacciones débiles (interacciones hidrofóbicas y de van der Waals); en rojo los aa con interacciones desfavorables; y los aa que juegan un papel importante para unión en el sitio alostérico de la enzima, como menciona Betzi et. al 2011 y Liu et al 2013 se encuentran subrayados.

Como se aprecia en la Tabla 3, los valores de afinidad para el grupo de xantonas resultaron ser muy cercanos al obtenido en el acoplamiento con la molécula de referencia (301AN, -12.79 kcal/mol), siendo las dos xantonas más afines a CDK2 la X5 y la X2, esta última utiliza dos de sus anillos para establecer interacciones de tipo π -alquilo con el residuo Leu55 y posee un enlace por puente de hidrógeno con Phe146, parte del dominio DFG. En X5 se logra apreciar un mayor número de interacciones incluyendo Leu55 del mismo modo de X2 y añadiendo interacciones

con residuos como Phe80 (residuo guardián) y aminoácidos que constituyen tanto la hélice C como el dominio DFG (Figura 15).

Glide

Al igual que con el programa anterior, en Glide se validó la metodología usando el ligante 301AN. El valor de afinidad fue de -9.4 kcal/mol que es menor al obtenido con el programa ArgusLab, pero se considera aún bueno en comparación a lo reportado para este tipo de estudios. El valor de RMSD de 0.087 Å indica que, a pesar de obtener una energía menor, la conformación de la estructura de 301AN se ve mucho menos afectada después de estos cálculos infiriendo una mayor precisión. Se replicaron las interacciones hidrofóbicas reportadas en la bibliografía [99] y se establecieron 4 interacciones por puente de hidrógeno no reportados, pudiendo afectar de manera positiva la afinidad de la molécula (Figura 16).

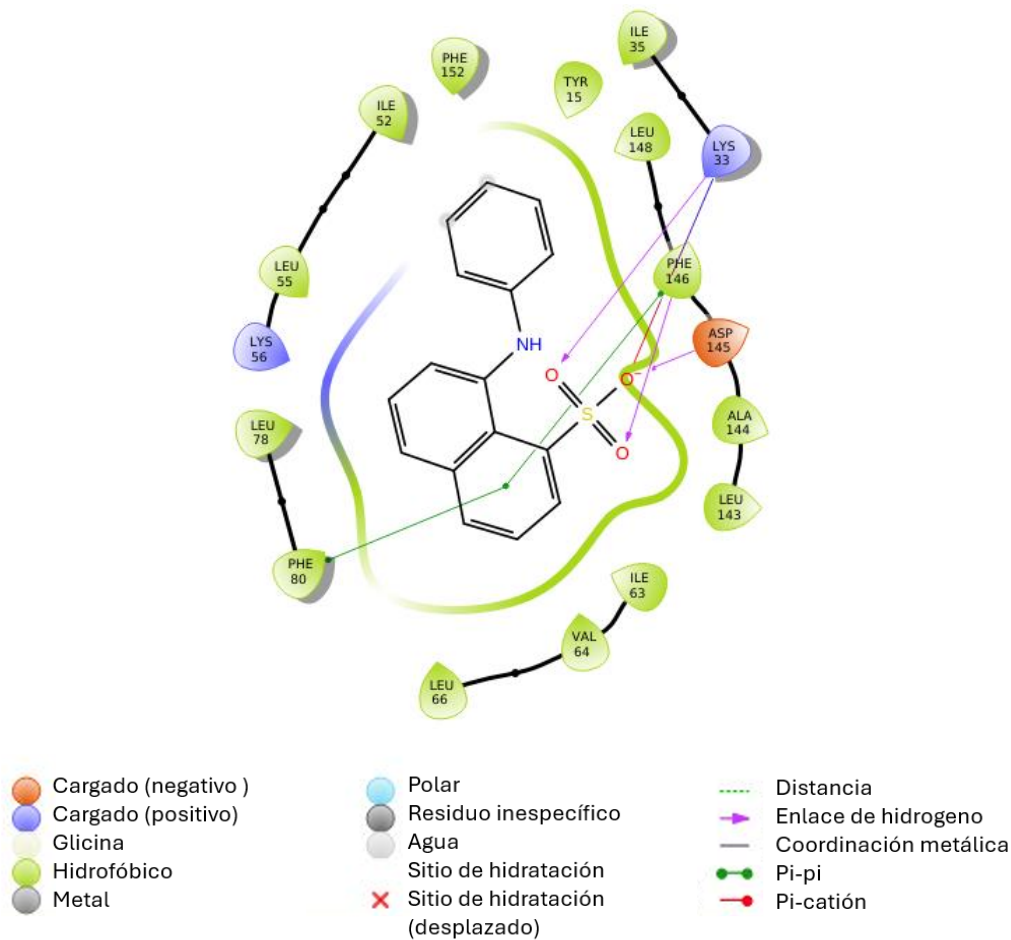
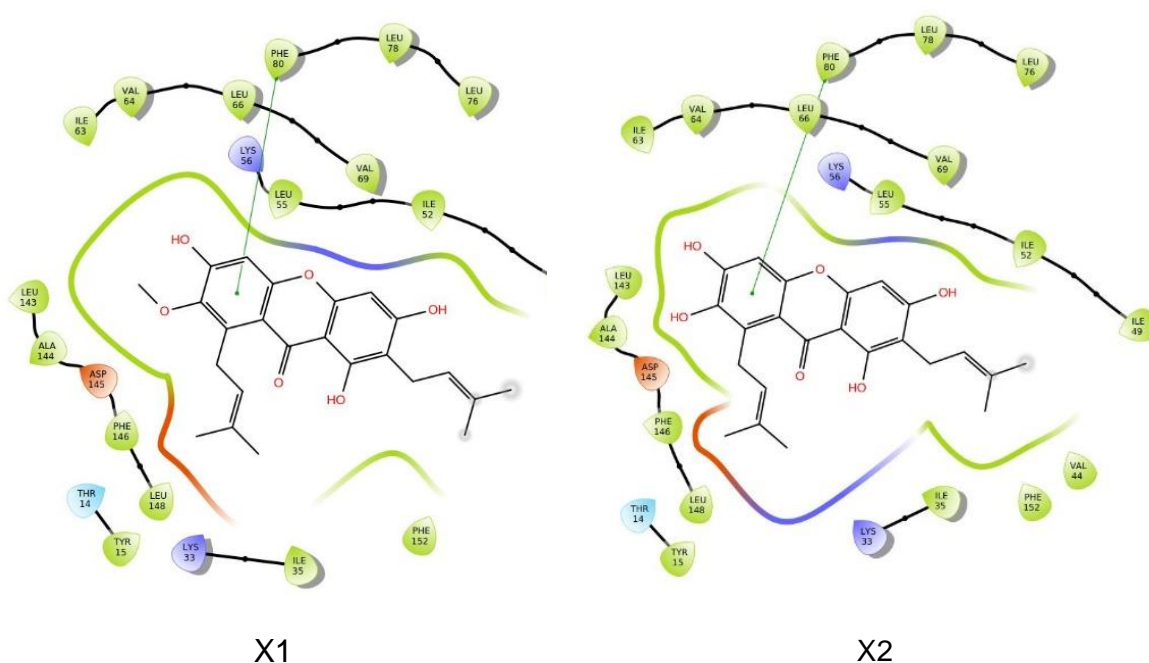
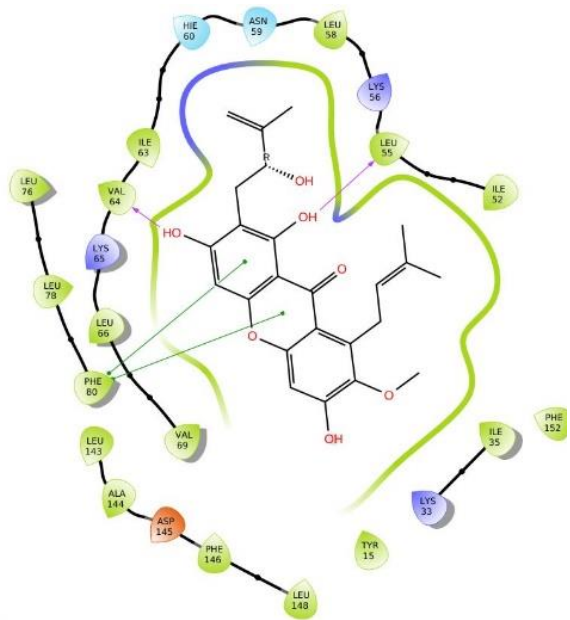


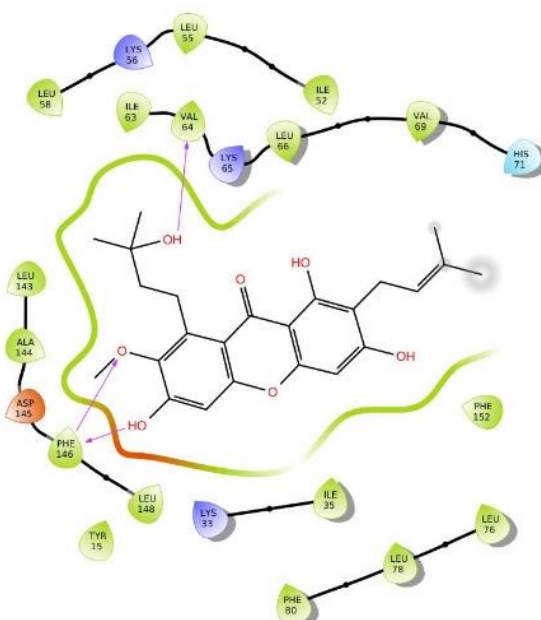
Figura 16. Diagrama 2D del re-acoplamiento de la molécula 301AN y CDK2, en donde se muestran las interacciones que mantienen estable al complejo.

Las representaciones gráficas de los acoplamientos de las xantonas con la CDK2 se muestran en la Figura 17. Las seis xantonas muestran interacciones con residuos alrededor del sitio alostérico, presentan fuerte actividad hidrofóbica con los carbonos de los ligantes, resaltando especialmente Lys56 y Phe80 (residuo guardián) que se encuentra en un sitio estratégico dentro del bolsillo de unión a ATP de la enzima CDK2. Este residuo controla el acceso al bolsillo de unión y puede influir en la especificidad de la unión a ATP [103], [109]. Phe80 forma interacciones de tipo π - π con uno de los anillos principales de las xantonas en las estructuras de X1, X2, X3. Los resultados muestran el mismo tipo de interacción con el residuo de Leu55 en las seis moléculas de manera hidrofóbica, así como Asp145 y Phe146, aminoácidos que constituyen parte del dominio DFG de la enzima.

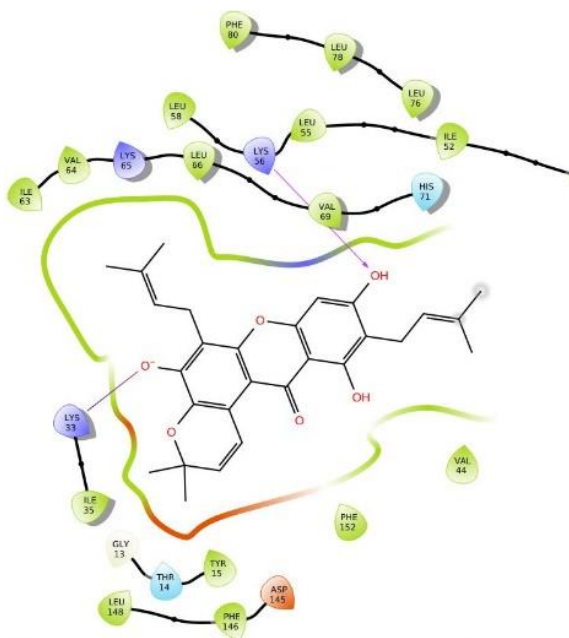




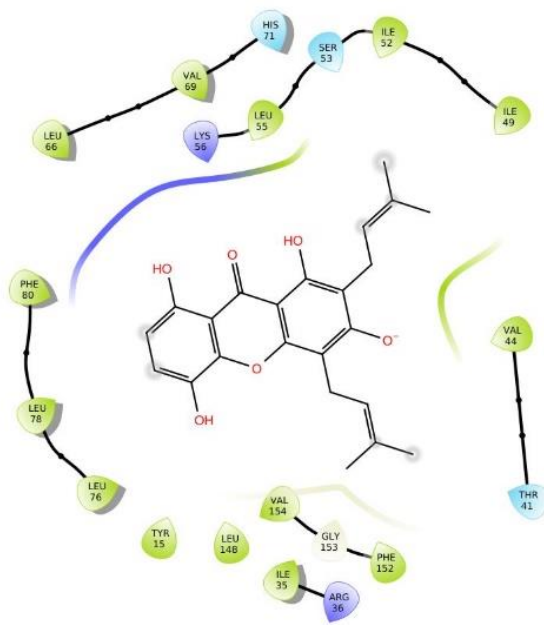
X3



X4



X5



X6

- Cargado (negativo)
- Cargado (positivo)
- Glicina
- Hidrofóbico
- Metal

- Polar
- Residuo inespecífico
- Agua
- Sitio de hidratación
- ✗ Sitio de hidratación (desplazado)

- Distancia
- Enlace de hidrogeno
- Coordinación metálica
- Pi-pi
- Pi-catión

Figura 17. Diagramas 2D de los acoplamientos en Glide entre CDK2-xantonas mostrando las principales interacciones para la formación de cada complejo.

Tabla 4. Energía de afinidad en kcal/mol y las interacciones establecidas entre la enzima CDK2 y las xantonas.

Xantona	Energía de afinidad XP score (kcal/mol)	Interacción de residuos
X1	-9.94	Ile63, Val64 , Leu66, Val69 , Phe80 , Leu78, Leu76, Lys56, Leu55 , Ile52 , Leu143, Ala144, Asp145, Phe146 , Leu148, Thr14 , Tyr15, Lys33, Ile35, Phe152
X2	-10.68	Ile63, Val64 , Leu66 , Val69 , Phe80 , Leu78 , Leu76, Lys56, Leu55 , Ile52 , Ile49, Leu143, Ala144, Asp145, Phe146 , Leu148, Thr14 , Tyr15, Lys33, Ile35, Phe152 , Val44
X3	-11.08	Val69 , Leu66 , Lys65, Val64 , Ile63, Asn59, Leu58 , Lys56, Leu55 , Ile52 , Leu76, Leu78 , Phe80 , Leu143, Ala144, Asp145, Phe146 , Leu148, Tyr15, Lys33, Ile35, Phe152
X4	-9.67	Leu58, Lys56, Leu55 , Ile52 , Ile63, Val64 , Lys65, Leu66 , Val69 , His71, Leu143, Ala144, Asp145, Phe146 , Leu148, Lys33, Ile35, Phe152 , Phe80 , Leu78 , Leu76
X5	-10.68	Phe80 , Leu78, Leu76, Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Ile63, Val64 , Lys65, Leu66 , Val69 , His71, Lys33, Ile35, Gly13, Thr14 , Tyr15, Leu148, Phe146 Asp145
X6	-8.032	Leu66 , Val69 , His71, Lys56, Leu55 , Ile52 , Ile49, Phe80 , Leu78 , Leu76, Tyr15, Leu148, Val154, Gly153, Phe152 , Ile35, Arg36, Thr14

En verde se presentan los aa que forman uno o más puentes de hidrógeno; en negro se agruparon los aa que forman interacciones débiles (interacciones hidrofóbicas y de van der Waals); en rojo los aa con interacciones desfavorables; y los aa que juegan un papel importante para unión en el sitio alostérico de la enzima, como menciona Betzi et. al 2011 y Liu et al 2013 se encuentran subrayados.

Los valores de afinidad obtenidos para los acoplamientos de CDK2 con el grupo de xantonas, tuvieron una mayor diferencia entre el valor más bajo y el valor de referencia (301AN, -9.4 kcal/mol), no así con la diferencia entre el valor más alto y el de referencia, pues en ambos programas fueron alrededor de 1.8 kcal/mol. Los resultados de afinidad posicionan ahora a X3 y nuevamente a X5 como las moléculas más afines a CDK2. X3 presenta dos interacciones de tipo π - π entre dos de sus anillos principales y el residuo Phe80 (ya se mencionó anteriormente su importancia en el anclaje de inhibidores) y una interacción por puente de hidrógeno con Leu55, lo que sugiere un muy buen acoplamiento. Por otra parte, X5 presenta mayormente interacciones hidrofóbicas, una interacción por puente de hidrógeno con Lys56 y un enlace salino con Lys33, sin embargo, solo presenta una interacción débil con Phe80, lo cual pone en tela de juicio su actividad biológica a pesar de tener una energía de afinidad alta dentro del grupo de ligantes.

5.4 *Induced Fit Docking* (Schrödinger)

Los resultados de la validación de la metodología con el ligante co-cristalizado 301AN y la enzima CDK2 muestran un valor de la energía de afinidad de -9.9 kcal/mol, esto es, muy cercana a la obtenida con Glide. El valor de 0.054 Å en el cálculo de RMSD, resultó ser mejor (más pequeño) que el determinado con los dos programas anteriores siendo un indicativo del aumento en el grado de precisión y reproductibilidad. La estabilidad del complejo después del acoplamiento la alcanza formando interacciones similares a las reportadas en la bibliografía [99] con dos nuevas interacciones por puente de hidrógeno no reportadas. (Figura 18)

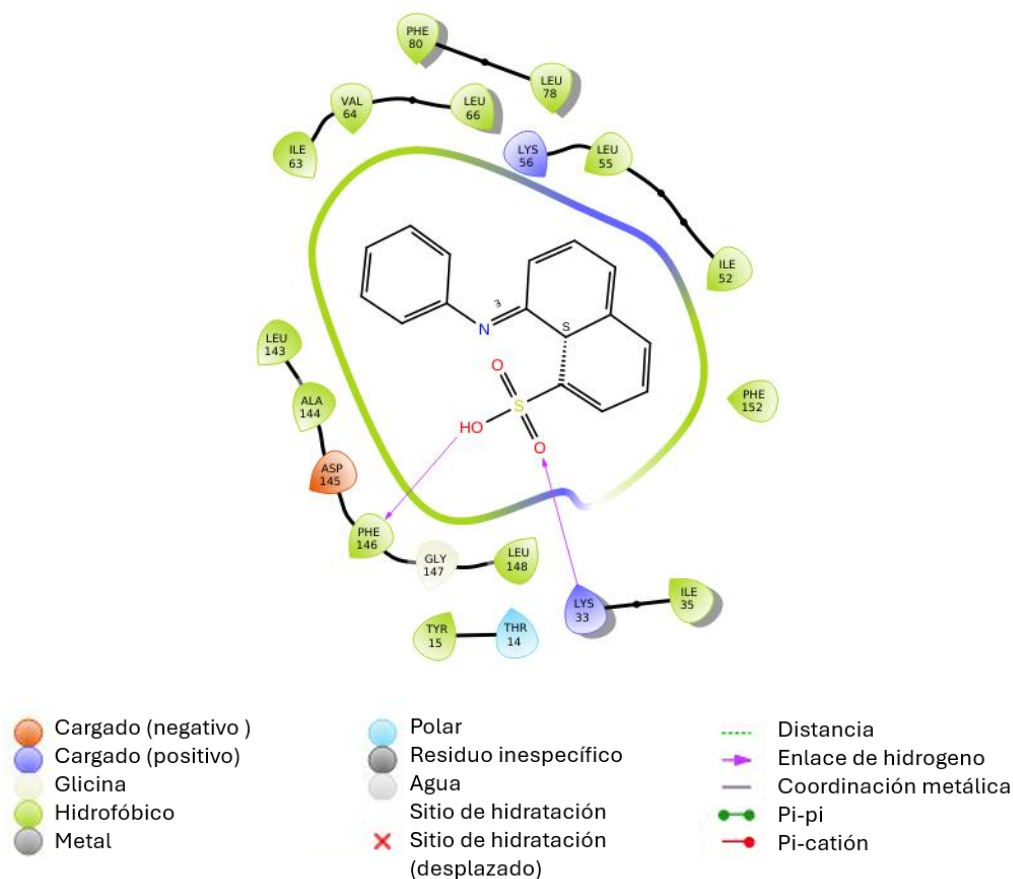
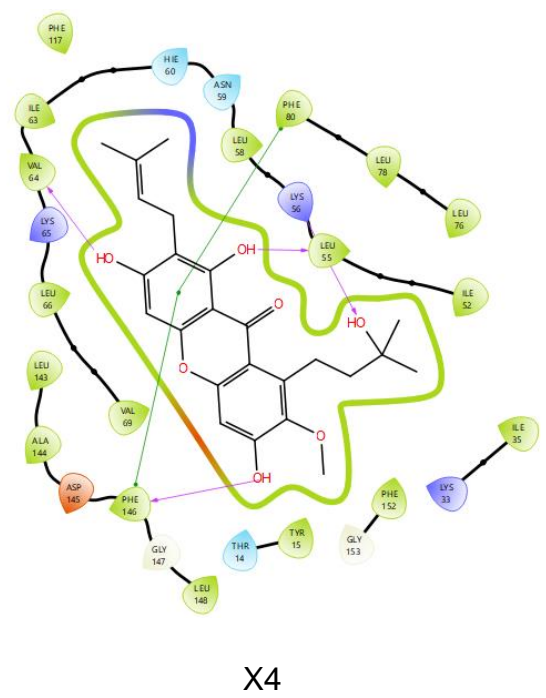
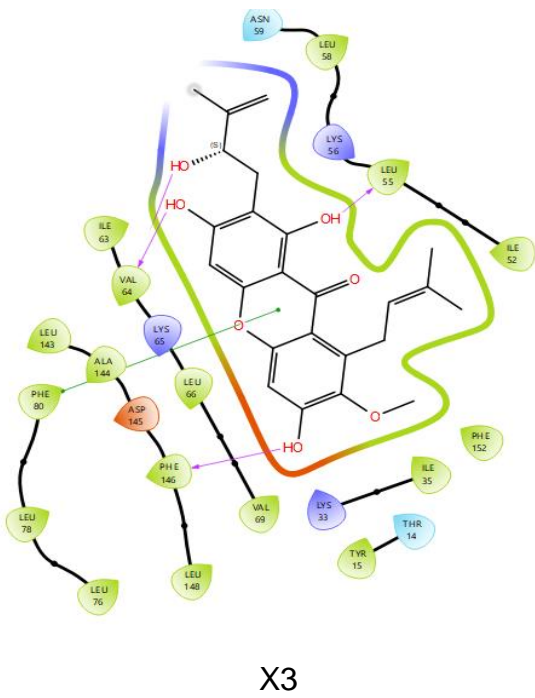
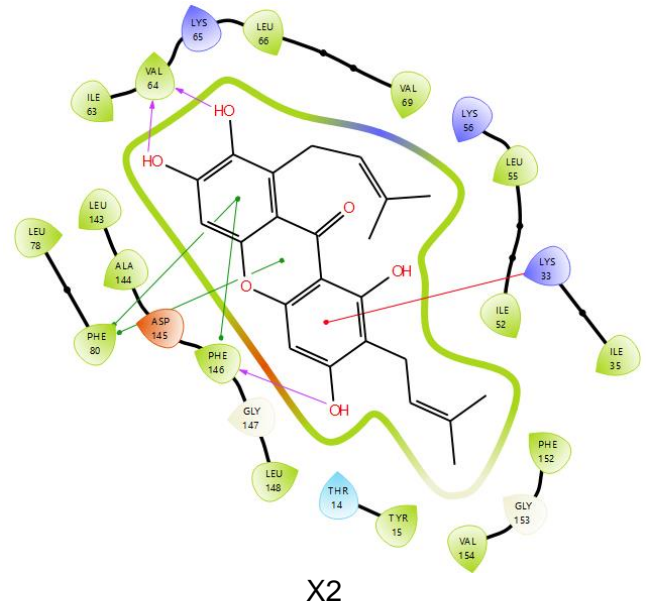
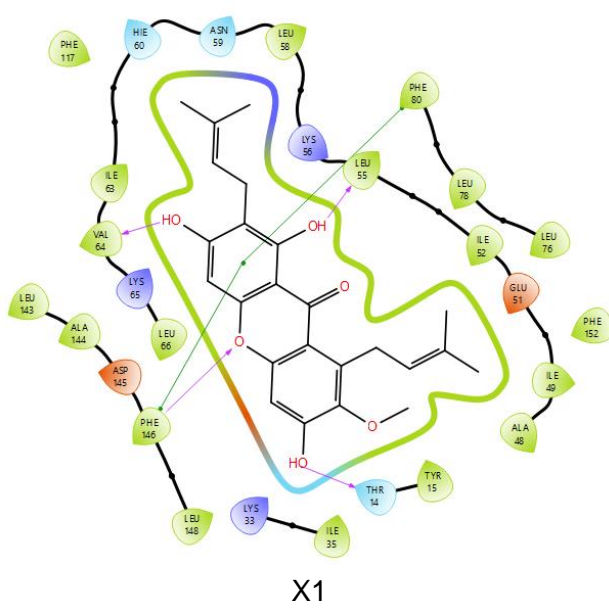


Figura 18. Diagrama 2D del re-acoplamiento de 301AN-CDK2 mostrándose las principales interacciones para alcanzar su estabilidad.

Los resultados obtenidos con IDF (*Induced Fit Docking*) de todos los acoplamientos muestran interacciones altamente hidrofóbicas de las seis xantonas con el sitio alostérico (Figura 19). Se puede apreciar que en este tipo de acoplamiento existe una mayor presencia de interacciones por puente de hidrógeno entre las xantonas y la CDK2 que los mostrados en los programas anteriores, resaltando las interacciones con los residuos Val64 y Leu55 que forman parte de la hélice C. El residuo Phe146, que forma parte del motivo DFG, establece una interacción de tipo π - π con los anillos principales de las xantonas en la mayoría de ellas. Por otra parte, Lys33 que es un residuo que se encuentra entre la interfaz del sitio activo ATP y el bolsillo alostérico, también juega un papel importante en el anclaje al establecer diversos tipos de interacciones con los seis ligantes. En los acoplamientos con todos los fitoquímicos, la Asp145 se encuentra muy cerca del átomo de oxígeno del ligante traduciéndose en

una desestabilización del complejo debido a una repulsión electrostática por la carga negativa que posee el residuo.



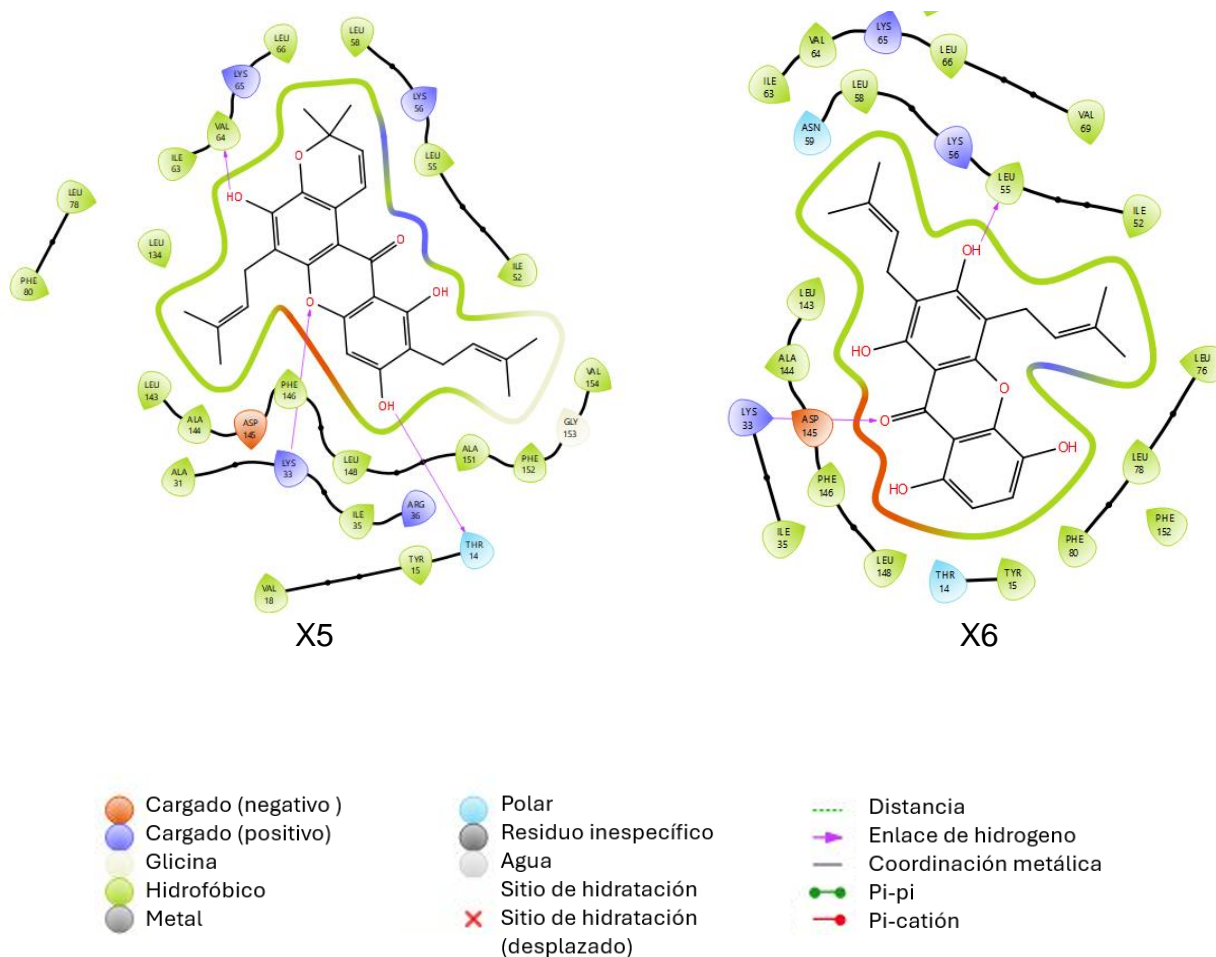


Figura 19. Diagramas 2D de los acoplamientos en IDF entre CDK2-xantonas mostrando las principales interacciones para la formación de cada complejo.

Tabla 5. Energía de afinidad en kcal/mol y las interacciones establecidas entre la enzima CDK2 y las xantonas.

Xantona	Energía de afinidad XP score (kcal/mol)	Interacción de residuos
X1	-16.44	Leu66, Lys65, Val64 , Ile63, Phe117, Hie60, Asn59, Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Glu51, Ile49, Ala48, Phe80 , Leu78 , Leu76, Phe152 , Thr14 , Tyr15 , Lys33 , Ile35, Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Leu148 ,
X2	-14.26	Ile63, Val64 , Lys65, Leu66 , Val69 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Lys33 , Ile35, Phe152 , Gly153,

		Val154, Thr14 , Tyr15 , Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Gly147, Leu148 , Leu78, Phe80
X3	-14.39	Asn59, Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Ile63, Val64 , Lys65, Leu66 , Val69 , Lys33 , Ile35 Phe152 , Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Leu148 , Phe80 , Leu78 , Leu76, Tyr15, Thr14
X4	-13.95	Phe117, Phe80 , Leu78 , Leu76, Val69 , Leu66 , Lys65, Val64 , Ile63, Hie60, Asn59, Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Gly147, Leu148 , Gly153, Phe152 , Lys33 , Ile35
X5	-13.01	Phe80 , Leu78 , Ile63, Val64 , Lys65, Leu66 , Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52 , Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Leu148, Ala151, Phe152 , Gly153, Val154, Ala31, Lys33 , Ile35, Arg36, Thr14 , Tyr15 , Val18
X6	-13.07	Lys33 , Ile35, Thr14 , Tyr15 , Phe80 , Leu78 , Leu76, Phe152 , Leu143, Ala144, Asp145 , Phe146 , Leu148 , Ile63, Val64 , Ly65, Leu66 , Val69 , Asn59, Leu58 , Lys56 , Leu55 , Ile52

En verde se presentan los aa que forman uno o más puentes de hidrógeno; en negro se agruparon los aa que forman interacciones débiles (interacciones hidrofóbicas y de van der Waals); en rojo los aa con interacciones desfavorables; y los aa que juegan un papel importante para unión en el sitio alostérico de la enzima, como menciona Betzi et. al 2011 y Liu et al 2013 se encuentran subrayados.

Los valores de las energías de afinidad después de los acoplamientos fueron de 3.0 hasta 6.0 kcal/mol por arriba del valor de referencia (301AN, 9.99 kcal/mol) posicionando a X1 y X3 como las moléculas más afines a CDK2 (Tabla 5).

De manera específica, X1 forma interacciones de tipo π - π con los anillos de Phe80 y Phe146 y una interacción por puente de hidrógeno con los residuos Val64, Thr54, y con Leu55. La formación de estos puentes de hidrógeno sugiere un acoplamiento fuerte en el sitio alostérico en comparación con las otras xantonas que presentan, en su caso, interacciones hidrofóbicas con este residuo. Por otra parte, X3 forma una sola interacción de tipo π - π con Phe80 y dos interacciones por puente de hidrógeno, una con Val64 y otra con Phe146, residuos cuya importancia ya se mencionó en la discusión de los programas anteriores.

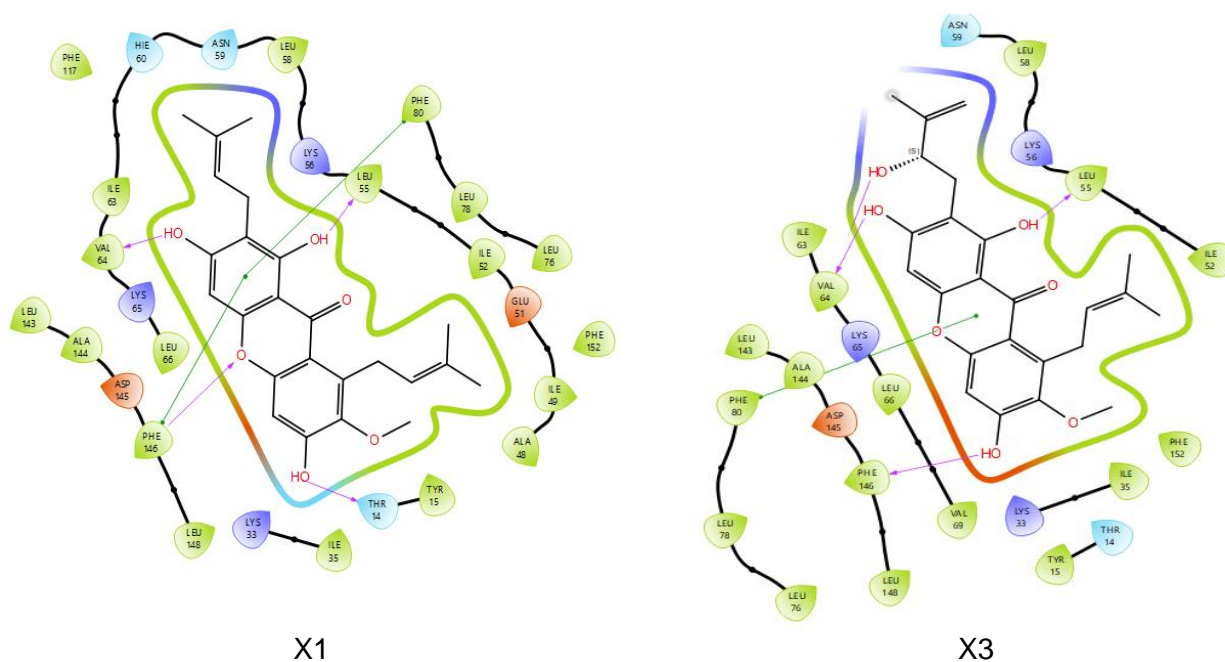


Figura 20. Interacciones de X1 y X3, los compuestos más afines según IFD para la formación del complejo CDK2-xantonas

5.5 Método MM/GBSA (Schrödinger)

Prime MM/GBSA es un método empleado para calcular diversas propiedades energéticas que incluyen energías asociadas al ligante, el receptor y las estructuras complejas, así como diferencias energéticas relacionadas con la tensión y la unión. Estas propiedades se desglosan en contribuciones de varios términos en la expresión de energía.

La energía libre de unión (ΔG_{bind}) se estimó como la diferencia de la energía entre la estructura del complejo generado por el acoplamiento en Glide y la suma de las energías del ligante y la proteína no ligada, utilizando el campo de fuerza OPLS. La energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) fue tomada como la variación en la energía de solvatación GBSA del complejo y la suma de las energías de solvatación para el ligante y la proteína no ligada, la energía libre del área de superficie (ΔG_{SA}) es la variación de esta misma para el complejo y la suma de las energías del área

superficial para el ligante y la proteína no complejada. Para esta estimación no se aplicaron correcciones para cambios entrópicos (Ecuación 7).

$$\Delta G_{enlace} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv} + \Delta G_{SA} \quad (7)$$

La estimación del término entrópico suele realizarse mediante análisis modal normal, este proceso es bastante tardado y, por lo tanto, a menudo no se incluye en la evaluación de la energía libre de enlace total, lo que puede resultar en posibles errores significativos [110].

De los cálculos MM/GBSA se obtuvieron los valores que se encuentran en la Tabla 6 que reafirman lo calculado con la metodología de IF, ya que coloca a X3 y X2 como las moléculas mejor acopladas a CDK2 con una mínima diferencia de energía (0.23 kcal/mol), por lo que se consideran como igualmente afines. A partir de los valores de Glide, MM/GBSA descarta a X5 como una de las mejores a pesar de tener un valor de afinidad más alto negativo que la molécula de referencia además de conservar a X3 como el mejor ligante de la enzima.

Tabla 6. Resultados del análisis MM/GBSA a partir de los acoplamientos de Glide CDK2-xantonas

Compuesto	Afinidad (kcal/mol)
X1	-93.98
X2	-94.83
X3	-95.06
X4	-91.35
X5	-89.52
X6	-73.48

En la metodología MM/GBSA se contemplan diferentes factores que afectan a la unión, como la reducción de las interacciones entre el ligante y el solvente, el aumento de las interacciones entre la proteína y el ligante, y la tensión interna del ligante al

unirse al receptor. Por lo tanto, MM/GBSA presenta una relación más precisa entre las afinidades de unión calculadas y los datos experimentales [111].

Tabla 7. Valores de la energía de afinidad en kcal/mol de los acoplamientos de las seis xantonas y el ligante de referencia (negritas) con la proteína CDK2 obtenidos con los cuatro programas.

ArgusLab	Afinidad (kcal/mol)	Glide (XP)	Afinidad (kcal/mol)	IFD (XP)	Afinidad (kcal/mol)	MM/GBSA	Afinidad (kcal/mol)
X5	-13.34	X3	-11.08	X1	-16.44	X3	-95.06
X2	-13.32	X5	-10.69	X3	-14.39	X2	-94.83
X6	-12.88	X2	-10.57	X2	-14.26	X1	-93.98
301AN	-12.79	X1	-9.94	X4	-13.95	X4	-91.35
X1	-11.92	X4	-9.67	X6	-13.07	X5	-89.52
X4	-11.92	301AN	-9.40	X5	-13.01	X6	-73.48
X3	-10.92	X6	-8.03	301AN	-9.99	301AN	-66.35

Comparando los resultados de afinidad de los acoplamientos realizados en este trabajo, es claro que hay diferencia en la tendencia de los valores con los tres programas empleados (Tabla 7), sin embargo, en dos de esos tres señalan a X3 y X2 como los mejores ligantes. La diferencia en las aproximaciones teóricas en las que se basan, así como los algoritmos y funciones de puntuación que emplean para determinar la mejor pose son los responsables de esta desigualdad en estas tendencias.

ArgusLab utiliza un algoritmo genético que muestra la formación de los mejores complejos mediante interacciones que no involucran a los grupos hidroxilo sustituidos en los anillos A y B de X5 y X2, además de ser las únicas dos moléculas que no presentan interacciones desfavorables, lo que nos indica que se ha acoplado al receptor, pero no de la mejor manera ni en el mejor sitio. Por otro lado, el programa **Glide** muestra interacciones entre los grupos hidroxilo sustituidos de X3 y X5 y los residuos de naturaleza hidrofóbica, los cargados positivamente, o bien, con algunos polares localizados en el bolsillo de unión [87], [88].

Si analizamos las interacciones de X3 por ser la xantona que mejor se acopló a la proteína, se observa que la puntuación final de la afinidad podría ser atribuida a la combinación de los cuatro grupos hidroxilo y el único grupo metoxi, que se encuentran sustituidos en los anillos A y B, ya que por medio de ellos se realiza el anclaje y permanencia de X3 en el sitio alostérico. Por otra parte, en la estructura de X2, se encuentra sustituido un grupo hidroxilo en la misma posición que el grupo metoxi en X3 y un grupo hidroxilo adicional se encuentra sustituido en la cadena alquílica del anillo A (Tabla 7). Además, en ambas xantonas se detectaron un gran número de interacciones hidrofóbicas en el sitio alostérico de CDK2, específicamente con los residuos considerados importantes para la unión en este sitio, sugiriendo su potencialidad como inhibidores. Cabe mencionar que utilizar en Glide el XP *GlideScore*, nos ofrece una evaluación muy detallada de la interacción y se destacan interacciones hidrofóbicas como fundamentales para la unión e inhibición de la enzima, según la información reportada en la bibliografía [99], [103].

La metodología de **IFD** parte del resultado de un acoplamiento en **Glide**, agregando algunos cambios conformacionales en la proteína para acomodar al ligante. En cada pose se utiliza una predicción de la estructura Prime para acomodar el ligante, reorientando las cadenas laterales de los residuos cercanos. Esta flexibilidad añadida es la responsable de la diferencia de tendencia entre Glide e IFD, ya que las cadenas laterales se mueven dependiendo del tamaño y naturaleza química del ligante, teniendo ahora a X1 como la mejor [93].

Al realizar el refinamiento de los acoplamientos en **MM/GBSA**, X1 desciende dos lugares con una diferencia de 1.08 kcal/mol entre ella y X3 que es el primer lugar en la tabla, diferencia muy poco significativa debido los valores tan grandes que se manejan en esta metodología. X3 consigue una fuerte estabilidad en el complejo gracias a las interacciones electrostáticas y de solvatación que logra formar ya que MMGBSA se aplica directamente en el acoplamiento realizado por Glide adicionando términos entrópicos y entálpicos, reduciendo las tasas de falsos positivos.

Los resultados de los ensayos biológicos de los compuestos X1, X2 y X3 han demostrado que estas xantonas poseen propiedades anticancerígenas con diferentes grados de efectividad en distintos tipos de células cancerosas.

X1 (α -mangostin), en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, ha demostrado ser uno de los compuestos más efectivos en la inhibición de la proliferación de las células de cáncer de mama [50]. Promueve la detención en la fase G1 del ciclo celular al inhibir la función de CDK2 mediante la inducción de p21cip1, lo que impide la transición de G1 a S, información corroborada con los resultados del presente trabajo [48], [112].

Experimentalmente se ha observado que la acción anticancerígena de γ -mangostin (X2) parece estar más relacionada con la inhibición de procesos inflamatorios que facilitan el desarrollo tumoral que por la inhibición directa de alguna enzima involucrada en el ciclo celular, sin embargo, en este estudio se propone que pudiera mostrar su actividad de manera sinérgica inhibiendo la actividad de CDK2 [112], [113].

Controversialmente, el mangostenol (X3), en comparación con α -mangostin y γ -mangostin en el estudio presentado por See et al. [50] presenta una menor citotoxicidad hacia las células de cáncer de mama, por lo que se propone utilizar únicamente las estructuras químicas de X1 y X2 como moldes para el diseño de nuevas estructuras inhibitoras de CDK2.

Capítulo 6: Conclusiones

Las xantonas estudiadas, especialmente mangostenol (X3), α -mangostin (X1) y γ -mangostin (X2), mostraron una notable afinidad por la enzima CDK2. El método MM/GBSA destacó a estas moléculas, ya que sus grupos funcionales polares, como los hidroxilos y metoxi, permiten formar puentes de hidrógeno más fuertes y una mejor estabilidad en el entorno solvente. Las diferencias en afinidad observadas entre los distintos programas de acoplamiento se deben a cómo cada uno maneja las interacciones moleculares y la flexibilidad de los sistemas. Programas como *Induced Fit Docking* y MM/GBSA, que consideran la flexibilidad y la solvatación, muestran mejores afinidades para xantonas con más grupos polares. En cambio, ArgusLab y Glide, que se centran más en interacciones electrostáticas y la complementariedad de forma, presentan variaciones en los resultados. El uso combinado de diferentes programas proporciona una visión más completa de las interacciones ligante-receptor. Con base en lo anterior, se sugiere que solo X1 realiza su actividad anticancerígena mediante la inhibición de CDK2, cuya estructura junto con la de X2 deben ser utilizadas como moldes para el diseño de inhibidores específicos de esta enzima.

Perspectivas

Dado los resultados obtenidos de este estudio y con base a los resultados de estudios experimentales, se sugiere el análisis de la interacción entre X1 y CDK4, además del diseño de nuevas estructuras basadas en X1 y X2 que sean más específicas en la inhibición de CDK2 para reducir efectos secundarios. Se propone la reducción o eliminación de grupos OH sustituidos en las cadenas alifáticas sustituidas en los anillos A o B de la estructura base de las xantonas. Esto proporcionará información crucial sobre las interacciones a nivel atómico de los complejos resultantes, permitiendo una mejor comprensión de los mecanismos de acción. Sería óptimo la realización del estudio experimental simultáneo, tanto en líneas celulares como de difracción de rayos X de los complejos formados para comparar la interacción de diferentes xantonas con la misma diana molecular e identificar de manera específica las variaciones en las interacciones que sean atribuibles a las actividades biológicas. Esta información sería de gran valor para guiar el desarrollo de nuevos compuestos

con propiedades mejoradas y ser altamente específicos para el tratamiento del cáncer.

Referencias

- [1] J. Ferlay *et al.*, «Cancer statistics for the year 2020: An overview», *Int. J. Cancer*, vol. 149, n.º 4, pp. 778-789, ago. 2021, doi: 10.1002/ijc.33588.
- [2] (OMS) Organización Mundial de la Salud, «Cáncer». Accedido: 19 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/health-topics/cancer>
- [3] N. I. of Health (US) y B. S. C. Study, «Understanding Cancer», en *NIH Curriculum Supplement Series [Internet]*, National Institutes of Health (US), 2007. Accedido: 19 de agosto de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- [4] M. Malumbres, «Cyclin-dependent kinases», *Genome Biol.*, vol. 15, n.º 6, p. 122, jun. 2014, doi: 10.1186/gb4184.
- [5] M. Aarts, S. Linardopoulos, y N. C. Turner, «Tumour selective targeting of cell cycle kinases for cancer treatment», *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 13, n.º 4, pp. 529-535, ago. 2013, doi: 10.1016/j.coph.2013.03.012.
- [6] P. Icard, L. Fournel, Z. Wu, M. Alifano, y H. Lincet, «Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer», *Trends Biochem. Sci.*, vol. 44, n.º 6, pp. 490-501, jun. 2019, doi: 10.1016/j.tibs.2018.12.007.
- [7] C. Yang *et al.*, «Discovery and identification of a novel PI3K inhibitor with enhanced CDK2 inhibition for the treatment of triple negative breast cancer», *Bioorganic Chem.*, vol. 140, p. 106779, nov. 2023, doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106779.
- [8] L. Nie *et al.*, «CDK2-mediated site-specific phosphorylation of EZH2 drives and maintains triple-negative breast cancer», *Nat. Commun.*, vol. 10, n.º 1, p. 5114, nov. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-13105-5.
- [9] «Cancer today». Accedido: 6 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
- [10] «Defunciones registradas de mujeres por tumor maligno de la mama por entidad federativa de residencia habitual de la persona fallecida y grupo quinquenal de edad, serie anual de 2010 a 2022». Accedido: 5 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/app/tabulados/interactivos/?px=Mortalidad_05&bd=Mortalidad
- [11] F. Cardoso *et al.*, «4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4)», *Ann. Oncol.*, vol. 29, n.º 8, pp. 1634-1657, ago. 2018, doi: 10.1093/annonc/mdy192.
- [12] S. Ou-Yang, J. Lu, X. Kong, Z. Liang, C. Luo, y H. Jiang, «Computational drug discovery», *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 33, n.º 9, pp. 1131-1140, sep. 2012, doi: 10.1038/aps.2012.109.
- [13] S. Loibl, P. Poortmans, M. Morrow, C. Denkert, y G. Curigliano, «Breast cancer», *The Lancet*, vol. 397, n.º 10286, pp. 1750-1769, may 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(20)32381-3.
- [14] M. Colleoni *et al.*, «Outcome of special types of luminal breast cancer», *Ann. Oncol.*, vol. 23, n.º 6, pp. 1428-1436, jun. 2012, doi: 10.1093/annonc/mdr461.
- [15] M. Giuliano *et al.*, «Endocrine treatment versus chemotherapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, metastatic breast cancer: a systematic review and network meta-analysis», *Lancet Oncol.*, vol. 20, n.º 10, pp. 1360-1369, oct. 2019, doi: 10.1016/S1470-2045(19)30420-6.
- [16] O. K. Weinberg, D. C. Marquez-Garban, y R. J. Pietras, «New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer», *Drug Resist. Updat.*, vol. 8, n.º 4, pp. 219-233, ago. 2005, doi: 10.1016/j.drup.2005.06.002.
- [17] R. Clarke, J. J. Tyson, y J. M. Dixon, «Endocrine resistance in breast cancer – An overview and update», *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 418, pp. 220-234, dic. 2015, doi: 10.1016/j.mce.2015.09.035.

- [18] D. Cretella *et al.*, «The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells», *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 37, n.º 1, p. 72, mar. 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0741-3.
- [19] M. A.-K. Hassan y Z. Ates-Alagoz, «Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors Against Breast Cancer», *Mini-Rev. Med. Chem.*, vol. 23, n.º 4, pp. 412-428, mar. 2023, doi: 10.2174/1389557522666220606095540.
- [20] C. L. Braal, E. M. Jongbloed, S. M. Wiltng, R. H. J. Mathijssen, S. L. W. Koolen, y A. Jager, «Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences», *Drugs*, vol. 81, n.º 3, pp. 317-331, feb. 2021, doi: 10.1007/s40265-020-01461-2.
- [21] «Targeting mTOR to overcome resistance to hormone and CDK4/6 inhibitors in ER-positive breast cancer models | Scientific Reports». Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-29425-y>
- [22] M. Piezzo *et al.*, «Targeting Cell Cycle in Breast Cancer: CDK4/6 Inhibitors», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.º 18, p. 6479, sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21186479.
- [23] D. Cortes, L. Moreno, J. Párraga, A. Galán, y N. Cabedo, «Nuevos fármacos inspirados en Annonáceas», *Rev. Bras. Frutic.*, vol. 36, pp. 22-31, 2014, doi: 10.1590/S0100-29452014000500003.
- [24] J. Hernández-Alvarado *et al.*, «Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria», *Abanico Vet.*, vol. 8, n.º 1, pp. 14-27, abr. 2018, doi: 10.21929/abavet2018.81.1.
- [25] N. Pérez Alonso y E. Jiménez, «Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro», *Biotechnol. Veg.*, vol. 11, n.º 4, Art. n.º 4, 2011, Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/biociologia-vegetal/articulo/produccion-de-metabolitos-secundarios-de-plantas-mediante-el-cultivo-in-vitro>
- [26] N. López-Carreras, M. Miguel, y A. Aleixandre, «Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud», *Beneficial health properties of iridoids terpenes*, 2012, Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/101431>
- [27] A. N. Panche, A. D. Diwan, y S. R. Chandra, «Flavonoids: an overview», *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, p. e47, ene. 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [28] E.-J. Park y J. M. Pezzuto, «Flavonoids in Cancer Prevention», *Anti-Cancer Agents Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, vol. 12, n.º 8, pp. 836-851, oct. 2012, doi: 10.2174/187152012802650075.
- [29] «The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms | Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics». Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://jpet.aspetjournals.org/content/300/2/361.short>
- [30] «Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention: Nutrition and Cancer: Vol 62, No 1». Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635580903191585>
- [31] «IJMS | Free Full-Text | Methylation of Dietary Flavones Increases Their Metabolic Stability and Chemopreventive Effects». Accedido: 15 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/10/11/5002>
- [32] A. E.-M. EL-Kenawy, S. M. A. Hassan, y H.-E. H. Osman, «Chapter 3.29 - Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)», en *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, S. M. Nabavi y A. S. Silva, Eds., Academic Press, 2019, pp. 313-319. doi: 10.1016/B978-0-12-812491-8.00045-X.

- [33] D. Obolskiy, I. Pischel, N. Siriwatanametanon, y M. Heinrich, «Garcinia mangostana L.: a phytochemical and pharmacological review», *Phytother. Res.*, vol. 23, n.º 8, pp. 1047-1065, 2009, doi: 10.1002/ptr.2730.
- [34] T. Wang, C. X. Sun, y P. K. Zhu, «First Report of *Mucor irregularis* Causing Postharvest Fruit Rot on *Garcinia mangostana* in China», *Plant Dis.*, vol. 106, n.º 2, p. 766, feb. 2022, doi: 10.1094/PDIS-07-21-1431-PDN.
- [35] J. Pedraza-Chaverri, N. Cárdenas-Rodríguez, M. Orozco-Ibarra, y J. M. Pérez-Rojas, «Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*)», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, n.º 10, pp. 3227-3239, oct. 2008, doi: 10.1016/j.fct.2008.07.024.
- [36] W. M. Aizat, F. H. Ahmad-Hashim, y S. N. Syed Jaafar, «Valorization of mangosteen, "The Queen of Fruits," and new advances in postharvest and in food and engineering applications: A review», *J. Adv. Res.*, vol. 20, pp. 61-70, nov. 2019, doi: 10.1016/j.jare.2019.05.005.
- [37] W. M. Aizat, I. N. Jamil, F. H. Ahmad-Hashim, y N. M. Noor, «Recent updates on metabolite composition and medicinal benefits of mangosteen plant», *PeerJ*, vol. 7, p. e6324, ene. 2019, doi: 10.7717/peerj.6324.
- [38] M. M. M. Pinto *et al.*, «From Natural Products to New Synthetic Small Molecules: A Journey through the World of Xanthenes», *Molecules*, vol. 26, n.º 2, p. 431, ene. 2021, doi: 10.3390/molecules26020431.
- [39] Y. S. Kurniawan *et al.*, «An Update on the Anticancer Activity of Xanthone Derivatives: A Review», *Pharmaceuticals*, vol. 14, n.º 11, p. 1144, nov. 2021, doi: 10.3390/ph14111144.
- [40] B. E. Evans *et al.*, «Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists», *J. Med. Chem.*, vol. 31, n.º 12, pp. 2235-2246, dic. 1988, doi: 10.1021/jm00120a002.
- [41] «Antifungal Activity of Xanthenes: Evaluation of their Effect on Ergosterol Biosynthesis by High-performance Liquid Chromatography - Pinto - 2011 - Chemical Biology & Drug Design - Wiley Online Library». Accedido: 16 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1747-0285.2010.01072.x>
- [42] S. Bräse, *Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation*. Royal Society of Chemistry, 2015.
- [43] J. Remali, I. Sahidin, y W. M. Aizat, «Xanthone Biosynthetic Pathway in Plants: A Review», *Front. Plant Sci.*, vol. 13, p. 809497, abr. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.809497.
- [44] J. S. Negi, V. K. Bisht, P. Singh, M. S. M. Rawat, y G. P. Joshi, «Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology», *J. Appl. Chem.*, vol. 2013, p. e621459, nov. 2013, doi: 10.1155/2013/621459.
- [45] L. M. M. Vieira y A. Kijjoa, «Naturally-occurring xanthenes: recent developments», *Curr. Med. Chem.*, vol. 12, n.º 21, pp. 2413-2446, 2005, doi: 10.2174/092986705774370682.
- [46] S. Suksamrarn, O. Komutiban, P. Ratananukul, N. Chimnoi, N. Lartpornmatulee, y A. Suksamrarn, «Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*», *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 54, n.º 3, pp. 301-305, mar. 2006, doi: 10.1248/cpb.54.301.
- [47] H.-A. Jung, B.-N. Su, W. J. Keller, R. G. Mehta, y A. D. Kinghorn, «Antioxidant Xanthenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen)», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, n.º 6, pp. 2077-2082, mar. 2006, doi: 10.1021/jf052649z.
- [48] H. Kurose, M.-A. Shibata, M. Iinuma, y Y. Otsuki, «Alterations in Cell Cycle and Induction of Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cells Treated with α -Mangostin Extracted from Mangosteen Pericarp», *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 672428, 2012, doi: 10.1155/2012/672428.
- [49] H.-F. Chang y L.-L. Yang, «Gamma-Mangostin, a Micronutrient of Mangosteen Fruit, Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells», *Molecules*, vol. 17, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2012, doi: 10.3390/molecules17078010.

- [50] I. See, G. C. L. Ee, V. Y. M. Jong, S. S. Teh, C. L. C. Acuña, y S. H. Mah, «Cytotoxic activity of phytochemicals from *Garcinia mangostana* L. and *G. benthamiana* (Planch. & Triana) Pipoly against breast cancer cells», *Nat. Prod. Res.*, vol. 35, n.º 24, pp. 6184-6189, dic. 2021, doi: 10.1080/14786419.2020.1836629.
- [51] M. C. Nauman, R. Tocmo, B. Vemu, J. P. Veenstra, y J. J. Johnson, «Inhibition of CDK2/CyclinE1 by xanthenes from the mangosteen (*Garcinia mangostana*): A structure-activity relationship study», *Nat. Prod. Res.*, vol. 35, n.º 23, pp. 5429-5433, dic. 2021, doi: 10.1080/14786419.2020.1777413.
- [52] D. S. El-Agamy *et al.*, «Protective anti-inflammatory activity of tovophyllin A against acute lung injury and its potential cytotoxicity to epithelial lung and breast carcinomas», *Inflammopharmacology*, vol. 28, n.º 1, pp. 153-163, feb. 2020, doi: 10.1007/s10787-019-00609-1.
- [53] Z. Liu *et al.*, «The effect of gartanin, a naturally- occurring xanthone in mangosteen juice, on the mTOR pathway, autophagy, apoptosis and the growth of human urinary bladder cancer cell Lines», *Nutr. Cancer*, vol. 65, n.º 0 1, pp. 68-77, 2013, doi: 10.1080/01635581.2013.785011.
- [54] E. D. Israels y L. G. Israels, «The Cell Cycle», *The Oncologist*, vol. 5, n.º 6, pp. 510-513, dic. 2000, doi: 10.1634/theoncologist.5-6-510.
- [55] J. Bähler, «Cell-Cycle Control of Gene Expression in Budding and Fission Yeast», *Annu. Rev. Genet.*, vol. 39, n.º Volume 39, 2005, pp. 69-94, dic. 2005, doi: 10.1146/annurev.genet.39.110304.095808.
- [56] M. Bury, B. Le Calvé, G. Ferbeyre, V. Blank, y F. Lessard, «New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy», *Trends Cell Biol.*, vol. 31, n.º 5, pp. 331-344, may 2021, doi: 10.1016/j.tcb.2021.01.010.
- [57] L. J. Castro-Muñoz, E. V. Ulloa, C. Sahlgren, M. Lizano, E. De La Cruz-Hernández, y A. Contreras-Paredes, «Modulating epigenetic modifications for cancer therapy (Review)», *Oncol. Rep.*, vol. 49, n.º 3, pp. 1-23, mar. 2023, doi: 10.3892/or.2023.8496.
- [58] H. K. Matthews, C. Bertoli, y R. A. M. de Bruin, «Cell cycle control in cancer», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 23, n.º 1, pp. 74-88, ene. 2022, doi: 10.1038/s41580-021-00404-3.
- [59] B. Lawal *et al.*, «Pharmacoinformatics and Preclinical Studies of NSC765690 and NSC765599, Potential STAT3/CDK2/4/6 Inhibitors with Antitumor Activities against NCI60 Human Tumor Cell Lines», *Biomedicines*, vol. 9, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9010092.
- [60] S. Tadesse, E. C. Caldon, W. Tilley, y S. Wang, «Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update», *J. Med. Chem.*, vol. 62, n.º 9, pp. 4233-4251, may 2019, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01469.
- [61] M. A. Said, M. A. Abdelrahman, M. A. S. Abourehab, M. Fares, y W. M. Eldehna, «A patent review of anticancer CDK2 inhibitors (2017–present)», *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 32, n.º 8, pp. 885-898, ago. 2022, doi: 10.1080/13543776.2022.2078193.
- [62] R. Roskoski, «Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs», *Pharmacol. Res.*, vol. 139, pp. 471-488, ene. 2019, doi: 10.1016/j.phrs.2018.11.035.
- [63] «Toxicity prediction based on artificial intelligence: A multidisciplinary overview - Pérez Santín - 2021 - WIREs Computational Molecular Science - Wiley Online Library». Accedido: 16 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wcms.1516>
- [64] J. L. Medina-Franco, E. Fernández-de Gortari, y J. J. Naveja, «Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora», *Educ. Quím.*, vol. 26, n.º 3, pp. 180-186, jul. 2015, doi: 10.1016/j.eq.2015.05.002.
- [65] X. Lin, X. Li, y X. Lin, «A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design», *Molecules*, vol. 25, n.º 6, Art. n.º 6, ene. 2020, doi: 10.3390/molecules25061375.
- [66] F. D. Prieto-Martínez, M. Arciniega, J. L. Medina-Franco, F. D. Prieto-Martínez, M. Arciniega, y J. L. Medina-Franco, «Molecular docking: current advances and

- challenges», *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas*, vol. 21, 2018, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143.
- [67] P. E. M. Lopes, O. Guvench, y A. D. MacKerell, «Current Status of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations», en *Molecular Modeling of Proteins*, A. Kukol, Ed., en *Methods in Molecular Biology.*, New York, NY: Springer, 2015, pp. 47-71. doi: 10.1007/978-1-4939-1465-4_3.
- [68] T. Schlick, «Theoretical and Computational Approaches to Biomolecular Structure», en *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide: An Interdisciplinary Guide*, T. Schlick, Ed., en *Interdisciplinary Applied Mathematics.*, New York, NY: Springer, 2010, pp. 237-264. doi: 10.1007/978-1-4419-6351-2_8.
- [69] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, y M. Cui, «Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery», *Curr. Comput. Aided-Drug Des.*, vol. 7, n.º 2, pp. 146-157, jun. 2011, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [70] S. Agarwal y R. Mehrotra, «Mini Review_ An overview of Molecular Docking», *JSM Chem.*, vol. 2, p. 1024, may 2016.
- [71] «Molecular modeling and spectroscopic studies of semustine binding with DNA and its comparison with lomustine–DNA adduct formation: Journal of Biomolecular Structure and Dynamics: Vol 33, No 8». Accedido: 24 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2014.968874>
- [72] N. Brooijmans y I. D. Kuntz, «Molecular recognition and docking algorithms», *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 32, pp. 335-373, 2003, doi: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532.
- [73] A. N. Jain, «Scoring Functions for Protein-Ligand Docking», *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 7, n.º 5, pp. 407-420, oct. 2006, doi: 10.2174/138920306778559395.
- [74] R. Dias y W. F. de Azevedo, «Molecular docking algorithms», *Curr. Drug Targets*, vol. 9, n.º 12, pp. 1040-1047, dic. 2008, doi: 10.2174/138945008786949432.
- [75] R. C. Veltkamp, «Shape matching: similarity measures and algorithms», en *Proceedings International Conference on Shape Modeling and Applications*, may 2001, pp. 188-197. doi: 10.1109/SMA.2001.923389.
- [76] B. Kramer, M. Rarey, y T. Lengauer, «Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking», *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 37, n.º 2, pp. 228-241, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19991101)37:2<228::AID-PROT8>3.0.CO;2-8.
- [77] «Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function - Morris - 1998 - Journal of Computational Chemistry - Wiley Online Library». Accedido: 13 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291096-987X%2819981115%2919%3A14%3C1639%3A%3AAID-JCC10%3E3.0.CO%3B2-B>
- [78] A. E. Eiben y J. E. Smith, «Evolutionary Computing: The Origins», en *Introduction to Evolutionary Computing*, A. E. Eiben y J. E. Smith, Eds., en *Natural Computing Series.*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2015, pp. 13-24. doi: 10.1007/978-3-662-44874-8_2.
- [79] J. Li, A. Fu, y L. Zhang, «An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking», *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, vol. 11, n.º 2, pp. 320-328, jun. 2019, doi: 10.1007/s12539-019-00327-w.
- [80] G. A. Ross, G. M. Morris, y P. C. Biggin, «Rapid and Accurate Prediction and Scoring of Water Molecules in Protein Binding Sites», *PLOS ONE*, vol. 7, n.º 3, p. e32036, mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0032036.
- [81] P. Chaskar, V. Zoete, y U. F. Röhrig, «On-the-Fly QM/MM Docking with Attracting Cavities», *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 57, n.º 1, pp. 73-84, ene. 2017, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00406.
- [82] Y. Orozco-Gonzalez *et al.*, «An Average Solvent Electrostatic Configuration Protocol for QM/MM Free Energy Optimization: Implementation and Application to Rhodopsin Systems», *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 13, n.º 12, pp. 6391-6404, dic. 2017, doi: 10.1021/acs.jctc.7b00860.

- [83] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, y R. P. Mee, «Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes», *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 11, n.º 5, pp. 425-445, sep. 1997, doi: 10.1023/A:1007996124545.
- [84] P. Chaskar, V. Zoete, y U. F. Röhrig, «Toward On-The-Fly Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) Docking: Development and Benchmark of a Scoring Function», *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, n.º 11, pp. 3137-3152, nov. 2014, doi: 10.1021/ci5004152.
- [85] M. A. Thompson, *ArgusLab*. (2004). Planaria Software LLC, Seattle, WA. [En línea]. Disponible en: <http://www.arguslab.com/>
- [86] A. S. Achutha, V. L. Pushpa, y K. B. Manoj, «Comparative molecular docking studies of phytochemicals as Jak2 inhibitors using Autodock and ArgusLab», *Mater. Today Proc.*, vol. 41, pp. 711-716, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.05.661.
- [87] A. Oda, M. Okayasu, Y. Kamiyama, T. Yoshida, O. Takahashi, y H. Matsuzaki, «Evaluation of Docking Accuracy and Investigations of Roles of Parameters and Each Term in Scoring Functions for Protein–Ligand Docking Using ArgusLab Software», *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 80, n.º 10, pp. 1920-1925, oct. 2007, doi: 10.1246/bcsj.80.1920.
- [88] P. Tangyuenyongwatana, «Molecular docking study of tyrosinase inhibitors using ArgusLab 4.0.1: A comparative study». Accedido: 24 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/299509574_Molecular_docking_study_of_tyrosinase_inhibitors_using_ArgusLab_401_A_comparative_study
- [89] L. Schrödinger, *Glide*. (2023). New York, NY.
- [90] M. P. Repasky, M. Shelley, y R. A. Friesner, «Flexible Ligand Docking with Glide», *Curr. Protoc. Bioinforma.*, vol. 18, n.º 1, p. 8.12.1-8.12.36, 2007, doi: 10.1002/0471250953.bi0812s18.
- [91] Schrodinger, «Docking and scoring», Schrödinger. Accedido: 24 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://newsite.schrodinger.com/life-science/learn/white-papers/docking-and-scoring/>
- [92] L. Schrödinger, *Induced Fit Docking*. (2023). New York, NY.
- [93] «What is Induced Fit Docking and how can it help my research?» Accedido: 25 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://support.schrodinger.com/s/article/1352>
- [94] J. A. Bell *et al.*, «PrimeX and the Schrödinger computational chemistry suite of programs», *Urnisbn978-0-470-66078-2*, vol. F, pp. 534-538, 2012, doi: 10.1107/97809553602060000864.
- [95] S. S. Çınaroğlu y E. Timuçin, «Comprehensive evaluation of the MM-GBSA method on bromodomain-inhibitor sets», *Brief. Bioinform.*, vol. 21, n.º 6, pp. 2112-2125, dic. 2020, doi: 10.1093/bib/bbz143.
- [96] «Rescoring Docking Hit Lists for Model Cavity Sites: Predictions and Experimental Testing - ScienceDirect». Accedido: 26 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002228360800096X>
- [97] Y. Wang, J. Xiao, T. O. Suzek, J. Zhang, J. Wang, y S. H. Bryant, «PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules», *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, n.º Web Server issue, p. W623, jul. 2009, doi: 10.1093/nar/gkp456.
- [98] S. Gražulis *et al.*, «Crystallography Open Database (COD): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration», *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, n.º D1, pp. D420-D427, ene. 2012, doi: 10.1093/nar/gkr900.
- [99] S. Betzi *et al.*, «Discovery of a potential allosteric ligand binding site in CDK2», *ACS Chem. Biol.*, vol. 6, n.º 5, pp. 492-501, may 2011, doi: 10.1021/cb100410m.
- [100] Y. Li *et al.*, «Insights on Structural Characteristics and Ligand Binding Mechanisms of CDK2», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, n.º 5, Art. n.º 5, may 2015, doi: 10.3390/ijms16059314.
- [101] «The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases | Nature Cell Biology». Accedido: 9 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.nature.com/articles/ncb1199_438

- [102]G. Rastelli, A. Anighoro, M. Chripkova, L. Carrassa, y M. Broggin, «Structure-based discovery of the first allosteric inhibitors of cyclin-dependent kinase 2», *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 13, n.º 14, pp. 2296-2305, 2014, doi: 10.4161/cc.29295.
- [103]H. Liu *et al.*, «A Chrysin Derivative Suppresses Skin Cancer Growth by Inhibiting Cyclin-dependent Kinases», *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n.º 36, pp. 25924-25937, sep. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.464669.
- [104]S. Grimme, A. Hansen, J. G. Brandenburg, y C. Bannwarth, «Dispersion-Corrected Mean-Field Electronic Structure Methods», *Chem. Rev.*, vol. 116, n.º 9, pp. 5105-5154, may 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00533.
- [105]M. Frisch, *Gaussian09*. Wallingford.
- [106]«Visualization», Dassault Systèmes. Accedido: 14 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization>
- [107]J. Kirchmair, P. Markt, S. Distinto, G. Wolber, y T. Langer, «Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—What can we learn from earlier mistakes?», *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 22, n.º 3, pp. 213-228, mar. 2008, doi: 10.1007/s10822-007-9163-6.
- [108]V. Freitas, J. Gomes, y M. R. da Silva, «Energetic studies of two oxygen heterocyclic compounds Xanthone and tetrahydro- γ -pyrone», ago. 2009, doi: 10.1007/s10973-009-0233-y.
- [109]K. R. Keyloun *et al.*, «The Gatekeeper Residue and Beyond», *Parasitology*, vol. 141, n.º 11, pp. 1499-1509, sep. 2014, doi: 10.1017/S0031182014000857.
- [110]E. Wang *et al.*, «End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design», *Chem. Rev.*, vol. 119, n.º 16, pp. 9478-9508, ago. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00055.
- [111]B. Balaji y M. Ramanathan, «Prediction of estrogen receptor β ligands potency and selectivity by docking and MM-GBSA scoring methods using three different scaffolds», *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 27, n.º 6, pp. 832-844, dic. 2012, doi: 10.3109/14756366.2011.618990.
- [112]J. J. Johnson *et al.*, « α -Mangostin, a xanthone from mangosteen fruit, promotes cell cycle arrest in prostate cancer and decreases xenograft tumor growth», *Carcinogenesis*, vol. 33, n.º 2, pp. 413-419, feb. 2012, doi: 10.1093/carcin/bgr291.
- [113]K. Nakatani *et al.*, «gamma-Mangostin inhibits inhibitor-kappaB kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells», *Mol. Pharmacol.*, vol. 66, n.º 3, pp. 667-674, sep. 2004, doi: 10.1124/mol.104.002626.