



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Posgrado en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Título de tesis:

“Investigación *in silico* de la interacción de los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs) con el receptor acoplado a proteínas G, GPR40, y sus implicaciones en procesos antiinflamatorios”

Presenta:

Q.F.B Juan Carlos García Hernández

Director de tesis:

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Codirector de tesis:

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Noviembre 2023

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría con periodo de Agosto 2021 a Julio de 2023 con número de CVU: 1147409

Índice

Índice	1
Índice de figuras	3
Abstract	6
Resumen	7
Abreviaturas	8
1. Introducción	10
1.1 inflamación	10
1.1.2 Mecanismos de la inflamación	10
1.1.3 Vía general de señalización desencadenada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) durante procesos inflamatorios	13
1.2 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	15
1.3 Receptores de ácidos grasos libres	24
1.3.1 Receptor acoplado a proteína G número 4 (GPR40)	25
1.3.2 Cascada de señalización conocida hasta ahora durante la activación del GPR40 por un ligando agonista	29
1.4 Ácidos Epoxiecosatrienoicos	32
1.5 Herramientas in silico	36
1.5.1 Simulación de dinámica molecular	36
2. Antecedentes	38
3. Hipótesis	39
4. Objetivo general	40
5. Objetivos específicos	40
6. Diagrama de trabajo	41
7. Metodología	42
7.1 Búsqueda de Información en PDB	42
7.2 obtención y optimización del PDB 4PHU y 5KW2	43
7.3 Obtención de los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs)	45
7.4 Modelado de la membrana, agregar moléculas de agua, iones y crear PSD del sistema.	46
7.5 Juntar el ligando en el sistema y creación de los archivos PSF y PDB	47
7.6 Ingreso al super cómputo para realizar las Simulaciones de Dinámica Molecular	48

7.7	Analizar las interacciones de la DM y comparar resultados con el ácido gamma linoleico	48
8.	<i>Resultados</i>	49
8.1	<i>Gráficos de RMSD</i>	56
8.2	Identificación de los residuos de interés que interactúan con los ligantes	58
8.3	Gráficos de distancia	59
8.4	Contactos entre los residuos de la cadena lateral que interactúan con los átomos de los ligandos	63
8.5	Análisis de estructura secundaria	67
8.6	Análisis de la fluctuación cuadrática media (RMSF)	74
9.	<i>Discusión</i>	78
10.	<i>Conclusión</i>	80
	<i>Referencias</i>	81
	<i>Apéndice A</i>	89

Índice de figuras

Figura 1: Imagen tomada y modificada (Sun & Ye., 2012), donde se muestra la cascada de señalización desencadenada por un GPCR durante un proceso inflamatorio. Esta vía de señalización puede variar según la localización del tipo celular en el que se encuentre el receptor y a la clase a la que pertenezca (clase A, B, C o F).	14
Figura 2: Imagen tomada de (Laeremans, 2022), la cual muestra un árbol filogenético de los receptores acoplados a proteína G de la clase A.	17
Figura 3: Imagen representativa de la estructura general de un receptor acoplado a proteínas G de la clase A, donde podemos ver que está conformado por 7 hélices transmembranales y el motivo estructural altamente conservado E/DRY se encuentra en la TM3	18
Figura 4: Mecanismo de activación general de un GPCR clase A. En el estado inactivo la proteína G interactúa con la proteína transmembranal, abriéndose paso al romper interacciones entre las hélices transmembranales 3 y 6, para así formar un estado pre acoplado, para así permanecer en reposo hasta que un agonista se una al complejo GPCR-GP, causando cambios y reordenamientos que permiten la apertura de la región intercelular de las hélices transmembranales y de la porción alfa de la proteína G, exponiendo a la molécula de GDP para ser intercambiada por un GTP . (Mafi et al., 2022)	20
Figura 5: Ilustración tomada y mejorada de (Culhane et al., 2015) donde muestra un receptor acoplado a proteína G de la clase B, mostrando los dominios característicos en algunos receptores de esta clase.	21
Figura 6: Imagen basada de (Chun et al., 2012), donde se muestra la estructura representativa de los dominios presentes en un receptor acoplado a proteína G de la clase C.	23
Figura 7: Ilustración realizada en GPCRdb donde se muestra una representación en estilo serpiente del GPR40, en el cual, en color amarillo se muestra el motivo estructural GRY y en color azul y verde los residuos clave de interacción en el sitio alostérico número dos.	26
Figura 8: Imagen tomada y modificada de (Secor et al. 2021) Los tejidos en los cuales el receptor GPR40 se expresa son: hígado, hueso, páncreas, endotelio, intestinos, células del sistema inmune y neuronas.	27
Figura 9: Funciones conocidas hasta ahora del receptor GPR40 en cada uno de los tejidos en los que se expresa.	28
Figura 10. Representación del SA1 y SA2, sitios de interacción conocidos hasta ahora donde se unen los ligantes en el GPR40, estos sitios fueron descubiertos por cristalografía. (Egyed et al., 2022; Ho et al., 2018)	30
Figura 11: La vía de señalización conocida hasta ahora del GPR40 se inicia al unirse un ligando agonista, el cual desencadenará cambios conformacionales activando el receptor que a su vez activa a la proteína G la cual se separa para quedar la porción alfa como monómero y así activar por consecuencia diferentes vías de señalización, esto dependiendo de si se activó la proteína Gs, Gq o Gi. (Rives et al., 2018)	31
Figura 12: Imagen realizada en base a la información encontrada de Spector & Norris, 2007, donde se muestra el metabolismo del ácido araquidónico por diferentes enzimas. Dentro de las principales enzimas que convierte el ácido araquidónico en diferentes metabolitos son las LOX, COX y las epoxigenasas CYP2C, CYP2J, las cuales agregan un grupo epóxido en las insaturaciones del ácido araquidónico para producir los diferentes regio isómeros de los ácidos epoxieicosatrienoicos.	33
Figura 13: Funciones biológicas conocidas de los EETs en el sistema cardiovascular. Las enzimas CYP metabolizan el ácido araquidónico convirtiéndolo en un ácido epoxieicosatrienoico el cual	

tendrá un efecto fisiológico en el sistema cardiovascular. Dichos efectos pueden ser desde mejorar la vasodilatación, la isquemia cardiaca hasta la regulación de la presión arterial (Wang et al., 2016). 35

Figura 14: Estructuras del GPR40 humano encontradas en la base de datos del *Protein Data Bank*. 42

Figura 15 B: Ilustración que muestra a los diferentes cristales usados del Protein Data Bank para modelar los fragmentos faltantes de nuestra plantilla base que fue el GPR40 con el ID 5KW2, la estructura usada como plantilla se muestra en color rosa salmon, mientras que en diferentes colores se muestran los fragmentos faltantes que se modelaron. 44

Figura 16: En esta figura se muestra los EETs con el grupo epóxido en la posición que esta entre el carbono 14 y 15 tanto en configuración RS como SR. En color naranja figura el ácido gamma linoleico el cual es agonista endógeno conocido del GPR40. 45

Figura 17: Imagen del sistema completo creado en el programa conocido como VMD. En esta imagen el GPR40 se muestra en color rosa, el agua en azul, iones en cian y amarillo y lípidos de membrana en color gris. 46

Figura 18: Imagen de los cuatro sistemas creados con el programa VMD en el cual en el sistema GPR40 APO no tiene un ligante, mientras que el resto de los sistemas tienen a uno de los ligantes como se observa en la imagen. 47

Figura 19: Estructura completa del receptor acoplado a proteínas G número 40 de humano modelado a partir de las estructuras disponibles en *Protein Data Bank*. 49

Figura 20: Estructura tridimensional de los ácidos epóxicosatrienoicos seleccionados para usarlos como ligantes en nuestra simulación de dinámica molecular. 50

Figura 21: Imagen de los cuatro sistemas creados en el cual en el sistema GPR40 APO no tiene un ligante, mientras que el resto de los sistemas tienen los ligantes objetivos de estudio. 51

Figura 22: Alineamiento de secuencias realizada en Clustal Omega de los diferentes receptores de ácidos grasos libres conocidos hasta ahora. En esta imagen en colores se resalta el motivo E/DRY conservado en la clase A de los GPCR. 52

Figura 23: Comparación del motivo G3.49 R3.50 Y3.51 del GPR40 con el E3.49 R3.50 M3.51 de GPR120. 53

Figura 24: Alineamiento realizado en Clustal Omega donde se muestra las secuencias del GPR40 en distintas especies de animales, en dichas secuencias se observa lo alto que es la conservación de la estructura y del motivo estructural GRY en las distintas especies animales. 54

Figura 25: Árbol filogenético obtenido de Clustal Omega donde se muestra la evolución del GPR40 entre las diferentes especies de los animales seleccionados. 55

Figura 26: Grafico A muestra el RMSD del sistema APO en el cual el tiempo de simulación de 1000 ns y se estabiliza la proteína en un valor de aproximado de 3 Å, mientras que en los sistemas con ligante (Imágenes B, C y D) con una simulación de 2000 ns, se puede observar que se estabiliza a un valor de RMSD de 1.5 Å al poco tiempo de iniciar la simulación. 57

Figura 27: Esta imagen representa los tres sistemas simulados en los cuales se observó que la Y44, Y114, S123 y R118 interactuaban con el carboxilato de los ligantes. 58

Figura 28: Gráficos de distancias del grupo hidroxilo de la Y44, Y114, S123 contra el carboxilato de los ligantes donde los datos en negro son del ligante γ -LA, en color gris es el EET-R/S y en color verde las distancias del ligante EET-S/R. 60

Figura 29: Gráficos de distancias del carbono α (-CZ) R118 con el carboxilato de los ligantes. En verde se muestra el EET-S/R, el cual a los 800 ns se acerca a distancia de 4 Å a 5 Å. 61

Figura 30: Gráficos del porcentaje de contactos de los residuos Y44, Y114, R118, S12 con los ligantes ácidos gamma linoleico, EET-R/S, EET-S/R. 62

Figura 31: Imagen de la última fase de simulación que representa las interacciones de los ligantes con los residuos identificados en el sitio alostérico número dos.	62
Figura 32: Residuos que interactúan a 4 Å con la cadena hidrocarbonada de los ligantes.	63
Figura 33: Gráficos que muestran el porcentaje de los contactos a 4 Å de los residuos con la cadena hidrocarbonada de los ligantes.	64
Figura 34: Residuos que interactúan a 5 Å con la cadena hidrocarbonada de los ligantes.	65
Figura 35: Gráficos que muestran el porcentaje de los contactos a 5Å entre los residuos de la cadena lateral con los ligantes.	66
Figura 36: Imagen A: primera región tomada en cuenta para el análisis de estructura secundaria. Imagen B: región C-terminal mostrada en color verde y en rojo la zona donde se encuentran los residuos 284 al 290 que tienen cambios de “coil” a “hélice”.	67
Figura 37: Resultados obtenidos del servidor PORTER de la predicción de la estructura secundaria del GPR40.	68
Figura 38: Resultados obtenidos del servidor PORTER de la predicción de la estructura secundaria del GPR40.	69
Figura 39: Mapas de calor de la estructura secundaria del GPR40 APO. Imagen A: muestra la región del bucle intracelular dos que va de los residuos (ICL2). Imagen B: la región en la cual se forma una pequeña hélice en los residuos 284 al 290 se debería ver un color negro de hélice, pero no se forma en el GPR40 APO que está ausente de ligante.	70
Figura 40: Mapas de calor de los residuos 102 al 124 de los tres sistemas con ligantes. En color negro se muestran los residuos que forman una hélice en el ICL2.	71
Figura 41: Mapas de calor de los residuos 279 al 300 de los tres sistemas con ligantes. En color negro se muestra los residuos que forman una hélice en los residuos 284 al 290.	73
Figura 42: Imagen A muestra secuencia del receptor y sus regiones. En la imagen B se muestra el código de colores para reconocer cada sistema en la imagen C.	75
Figura 43: Imagen A muestra el grafico de RMSF de la TM3 – TM4. Imagen B muestra la región del ICL2 (residuos del 105 al 120) donde se lleva a cabo fluctuaciones diferentes en cada sistema.	76
Figura 44: Imagen A muestra el gráfico de RMSF de la TM4 – TM5. Imagen B muestra la región del ECL2 (residuos del 145 al 170) donde se lleva a cabo las fluctuaciones mostradas en la gráfica.	77

Abstract

Inflammatory processes in any anatomical region can lead to chronic pathologies that affect the lives of the people. For this reason, inflammation is recognized as a set of complex responses to tissue injury. Typically, during acute inflammatory responses, cellular and molecular events and interactions efficiently minimize injury or infection, contributing to the restoration of tissue homeostasis and resolution of acute inflammation. Poorly controlled acute inflammation can become chronic. For this reason, various studies have studied various molecules and receptors that help solve problems of this type more efficiently, especially inflammatory events related to the cardiovascular system, since in Mexico it is one of the main conditions treated by institutions. public.

Molecules known as epoxyecosatrienoic acids by its acronym in English EET, are the main molecules studied since they have shown anti-inflammatory effects in the cardiovascular system of mice. The pathologies in this previously mentioned animal model have shown improvement with the administration of EETs. On the other hand, in another investigation it has been shown that the overexpression of GPR40 together with the administration of epoxyecosatrienoic acids show better results of anti-inflammatory effects, improving both ischemic and non-ischemic cardiomyopathy, as well as hypertension in mice and angiogenesis.

Therefore, the objective of this *in silico* study of the interaction of epoxyecosatrienoic acids (EETs) with the receptor coupled to G proteins number 40, (GPR40), is to show how this type of ligands interact with the receptor, according to the results obtained, it will be possible to observe how dynamic and useful this tool can be since RMSD results are shown, Interaction distances with important residues for the stability of the binder in the binding pocket, as well as changes in the secondary structure that could elucidate important aspects to take into account for the activation mechanism of the receptor itself. Likewise, it is shown that through molecular dynamics simulations, important findings can be obtained due to the great dynamics of the movement that atoms can have during a simulation of this type.

Resumen

Los procesos inflamatorios en cualquier región anatómica pueden conducir a patologías crónicas que afectan la calidad de vida de las personas. Por ello a la inflamación se reconoce como un conjunto de respuestas complejas a la lesión tisular. Por lo general, durante las respuestas inflamatorias agudas, los eventos e interacciones celulares y moleculares minimizan eficientemente la lesión o infección, contribuyendo a la restauración de la homeostasis tisular y la resolución de la inflamación aguda. Por ello en diversas investigaciones se han estudiado varias moléculas y receptores que ayuden a resolver de manera más eficiente los problemas de este tipo, en especial los eventos inflamatorios relacionados al sistema cardiovascular.

Las moléculas conocidas como ácidos epoxiecosatrienoicos por sus siglas en inglés EET, son las principales moléculas estudiadas ya que han mostrado efectos antiinflamatorios en el sistema cardiovascular de ratones. Las patologías en este modelo animal mencionado anteriormente han mostrado mejoría con la administración de EETs. Por otra parte, en otra investigación se ha mostrado que la sobreexpresión de GPR40 en conjunto con la administración de ácidos epoxiecosatrienoicos muestran mejores resultados de efectos antiinflamatorios, mejorando la cardiomiopatía tanto isquémica como no isquémica, así como la hipertensión en ratones y la angiogénesis.

Por ello el objetivo de este estudio *in silico* de la interacción de los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs) con el receptor acoplado a proteínas G número 40, (GPR40), es mostrar cómo este tipo de ligantes interactúan con el receptor, de acuerdo a los resultados obtenidos se podrá observar lo dinámico y útil que puede ser esta herramienta ya que se muestran resultados de RMSD, Distancias de interacción con residuos importantes para la estabilidad del ligante en el bolsillo de unión, así como cambios en la estructura secundaria que podrían dilucidar aspectos importantes a tomar en cuenta para el mecanismo de activación del propio receptor. Así mismo se muestra que por medio de las simulaciones de dinámica molecular, se pueden obtener hallazgos importantes debido a la gran dinámica del movimiento que pueden tener los átomos durante una simulación dinámica molecular.

Abreviaturas

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

E/DRY: Motivo estructural conformacional en GPCRs que consta de los residuos E (glutamato) / D (aspartato), R (arginina) y Y (tirosina).

GRY: Motivo estructural conformacional que consta de los residuos G (Glicina), R (arginina), Y (Tirosina)

GPR40: Receptor acoplado a proteínas G número 40

GPR42: Receptor acoplado a proteínas G número 42

GPR43: Receptor acoplado a proteínas G número 43

GPR120: Receptor acoplado a proteínas G número 120

FFARs: Receptores de ácidos grasos libres

FFAR1: Receptor de ácidos grasos libres número 1

FFAR2: Receptor de ácidos grasos libres número 2

FFAR3: Receptor de ácidos grasos libres número 3

FFAR4: Receptor de ácidos grasos libres número 4

EET: ácidos epoxiecosatrienoicos

SA1: sitio alostérico 1

SA2: sitio alostérico 2

RMSD: Raíz cuadrática media de las distancias

RMSF: Raíz cuadrática media de las fluctuaciones

PLC: fosfolipasa C

AC: Adenilato ciclasa

DAG: Diaciglicerol

IP3: Inositol trifosfato

PIP2: Fosfatidilinositol bi fosfato

PKA: Proteína cinasa A

PKB: Proteína cinasa B

IKK: Cinasa de kappa

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

TLR: receptores tipo Toll

1. Introducción

1.1 inflamación

La inflamación es un proceso complejo, en el cual se da la respuesta de las células a estímulos externos o internos en el cuerpo humano. Durante dicho proceso, el sistema inmunitario iniciará una respuesta; desencadenando una serie de procesos bioquímicos en las células, lo que resulta en diferentes procesos celulares, los cuales iniciarán mecanismos protectores contra los agentes causantes de la inflamación. Los agentes que pueden iniciar un proceso inflamatorio son: las infecciones, las lesiones físicas, daño celular, la exposición a compuestos tóxicos, así como la exposición a diferentes fuentes de radiación (Medzhitov & Horng, 2010; Sun & Ye, 2012). A nivel de tejido, el resultado de esta respuesta celular se puede observar por el enrojecimiento, así como la sensación de calor en la zona, dolor, hinchazón y pérdida de la función tisular (Takeuchi & Akira, 2010). Por lo general, durante las respuestas inflamatorias agudas, los mecanismos sucedidos en los eventos celulares y moleculares activados ayudan a minimizar eficientemente la lesión o infección. Este proceso de atenuación del proceso inflamatorio contribuye a la restauración de la homeostasis tisular y la resolución de la inflamación aguda. Sin embargo, la inflamación aguda no controlada puede prolongarse, resultando en una variedad de enfermedades de inflamación crónica en diferentes órganos. (Zhou et al., 2016; Stone et al., 2022)

1.1.2 Mecanismos de la inflamación

Durante los procesos inflamatorios se pueden activar varios mecanismos complejos para dar respuesta al agente que causa dicho proceso, esta respuesta inflamatoria dependerá de la naturaleza del estímulo inicial y de la región del cuerpo en la cual se haya iniciado. A continuación, se enumera los pasos que sigue de manera general la respuesta inflamatoria: 1) reconocimiento de estímulos perjudiciales por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR); 2) activación de las vías inflamatorias; 3) liberación y producción de marcadores moleculares como: citocina, proteínas, enzimas; 4) reclutamiento de células inflamatorias (Chen et al., 2017).

En el paso número uno, se lleva a cabo la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) por medio de respuesta a estímulos exógenos como endógenos. Se ha descrito cuatro familias de PRR, dentro de los cuales se incluyen a los receptores tipo Toll (TLR), los receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NALP), los receptores de lectina tipo C (CLR), los receptores tipo I (RLR) y los receptores de tipo NOD (NLR), (Takeuchi & Akira, 2010; Huang & Glass, 2010).

La activación de los PRR conduce a la alteración de los estados metabólicos del huésped, induciendo así la producción, secreción y procesamiento de proteínas, así como la inducción de genes que funcionan durante las respuestas inmunitarias innatas y adquiridas (Medzhitov, 2010). Los TLR son los receptores más estudiados dentro las familias de PRR y su activación genera una cascada de señalización intracelular que conduce a la traslocación nuclear de factores de transcripción que incluyen sistemas como la proteína activadora-1 (AP-1), el factor NF-kB y el factor regulador de interferón.

Posteriormente sucede la activación de vías de señalización a nivel intracelular que dan lugar a la producción de mediadores inflamatorios que van a interactuar con diferentes receptores, causando así el desencadenamiento de importantes vías de señalización como lo es la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). La proteína MAPK, la cual es una quinasa de serina/treonina, genera diversos estímulos que incluyen: propiciar el estrés osmótico, así como la producción de mitógenos y citocinas inflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6). Dichas citoquinas regulan la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis celular. La vía del factor nuclear Kappa-B (NF-kB) y la vía de la Janus quinasa (JAK) serán el principal transductor de señal y activador de las vías de transcripción (STAT) (Kaminska, 2005).

En la vía JAK-STAT involucra diversas citocinas, factores de crecimiento e interferones. Las JAK asociadas a receptores son activadas por ligandos dando lugar a la fosforilación, lo cual resulta en la apertura de sitios de acoplamiento para STAT, resultando así en la activación de esta vía. La activación de la vía JAK/STAT se ha asociado a una gran cantidad de receptores entre los que se incluye a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en ingles), (Boussoik & Montazeri, 2018). Los GPCRs actualmente se han descrito como una

familia de receptores importante para la activación de la vía de señalización “aguas abajo” al igual que los receptores de tirosina quinasa (RTK) y las integrinas (Morrison, 2012).

Los GPCRs juegan un papel importante en la nocicepción inflamatoria, así como en la regulación de la inflamación. Como ejemplo, en el sistema cardiovascular, específicamente en endotelio, durante la inflamación se producen varios agonistas de GPCR, incluida la bradicinina (BK), la cual puede funcionar como un vasodilatador importante que protege al sistema cardiovascular. Por citar otro ejemplo de los roles de los GPCRs en los procesos celulares durante la inflamación, es el participar tanto en la nocicepción inflamatoria como en procesos anti-nociceptivos. Teniendo así otra actividad muy relevante cuando interactúa con los cannabinoides y endocannabinoides, los cuales son ligantes que modulan la función de los receptores acoplados a proteínas G, CB1 y CB2, inhibiendo, por ejemplo, la sensibilización periférica cuando se usan por vía tópica. La exploración de los roles de los GPCR en la nocicepción inflamatoria seguramente proporcionará nuevas terapias para el control efectivo del dolor asociado con enfermedades inflamatorias (Piomelli et al., 2000; Handley et al., 1984).

La diversidad en la unión de ligandos y la señalización transmembranal por parte de los GPCR son los principales responsables de la mediación de respuestas inflamatorias y antiinflamatorias complejas (Sun & Ye, 2012). Tal es el caso del ácido araquidónico y de los metabolitos derivados de esta molécula, los cuales tienen roles importantes en la inflamación, debido a que generan, mantienen y median la actividad inflamatoria. Uno de estos metabolitos estudiados por otros investigadores y en esta tesis son los ácidos epoxieicosatrienoicos, los cuales tienen actividad antiinflamatoria y de acuerdo a resultados de ensayos experimentales, esta molécula conocida como EET, podría unirse a un GPCR en el cual activa para así desencadenar el efecto antiinflamatorio (Park et al., 2018). Por lo tanto, no sorprende que los agentes antiinflamatorios o proinflamatorios de diferente naturaleza y composición, incluidos los metabolitos del ácido araquidónico, los péptidos, los fragmentos de proteínas y las proteasas, se asocien con los receptores GPCR, también llamados receptores de siete hélices transmembranales por su arquitectura tan conservada. Debido a que los GPCR, juegan un papel importante en la inflamación y en otras funciones celulares de los diferentes órganos, tener una mejor comprensión de estos receptores a nivel molecular,

así como sus respectivas vías de señalización, ayudará a desarrollar nuevos agentes terapéuticos con mayor especificidad que los agentes antiinflamatorios tradicionales, como los AINE (Vischer et al., 2006).

1.1.3 Vía general de señalización desencadenada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) durante procesos inflamatorios

Los receptores acoplados a proteína G son una familia numerosa de proteínas transmembranales, que serán descritas a detalle en el apartado titulado cómo: 1.2 Receptores acoplados a proteínas G. En el cual se detalla sus características estructurales, tipos de receptores y roles fisiológicos de manera general.

Para hablar de la vía de señalización que se desencadena tras la respuesta a un proceso inflamatorio, me gustaría citar a Yun-jun Ge y colaboradores (Ge et al., 2020), quienes mencionan que células inmunitarias, como lo son los fagocitos y los linfocitos, expresan una gran cantidad de GPCR acoplados a la proteína de tipo Gi, y que a su vez median la migración dirigida de estas células altamente móviles a los tejidos, en donde efectúan su acción de eliminación de patógenos. Estas investigaciones previas han permitido conocer de manera general una vía de señalización en estos tipos de receptores, sin embargo, en algunos de ellos aún no es del todo claro cada una de las vías intracelulares que se puedan iniciar durante la señalización en respuesta a un ligando agonista.

Hasta ahora es bien conocido que la vía de señalización aguas abajo debida a la activación de un GPCR por un agonista, da como resultado la separación de las subunidades G α i, lo cual produce una inhibición de la adenilil ciclasa (AC). Mientras que por otro lado la subunidad G α s activa a la adenilil ciclasa (AC) la cual va a catalizar la transformación del adenosín trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato (AMPc) activando a la proteína cinasa A, la cual a su vez activa al factor de transcripción CREB, el cual va a regular incrementando o disminuyendo la transcripción, esto como consecuencia al unirse al ADN. Por otra parte, la proteína cinasa A puede activar a las proteínas Rap y Raf, las cuales median la activación de las proteínas involucradas en la conocida vía de las MAP cinasas (MAPK).

Si la proteína activada es la G α q se da la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual por medio de una hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) produce al diacilglicerol (DAG)

y al inositol trifosfato (IP3), el segundo mensajero inositol trifosfato a nivel de retículo endoplásmico estimulará la liberación de Ca^{+2} , el cual ayudará a los cambios estructurales del citoesqueleto los cuales están involucrados en los procesos de inflamación. Mientras que el diacil glicerol (DAG) causará la estimulación de la proteína cinasa C PKC, la cual activará al factor nuclear NFAT o a las proteínas MEKK y TAK1 que a su vez activan a la proteína cinasa de kappa, la cual es regulada por la subunidad conocida como NEMO para así activar a NF- κ B y favorece la expresión de genes proinflamatorios (Grabiner et al., 2007; Ye et al., 2009).

Por último, se ha observado que la subunidad $\text{G}\beta\gamma$, puede activar a la proteína PI3K que cataliza la producción de PIP3, el cual actúa como un segundo mensajero que activa a la proteína cinasa B (PKB). A su vez, la activación de PKB causa la activación de la proteína cinasa de kappa (IKK), la cual está regulada por Nemo para así poder activar a NF- κ B1. La figura 1 resume de manera visual la vía de señalización desencadenada por un GPCR durante un proceso inflamatorio (Sun & Ye., 2012).

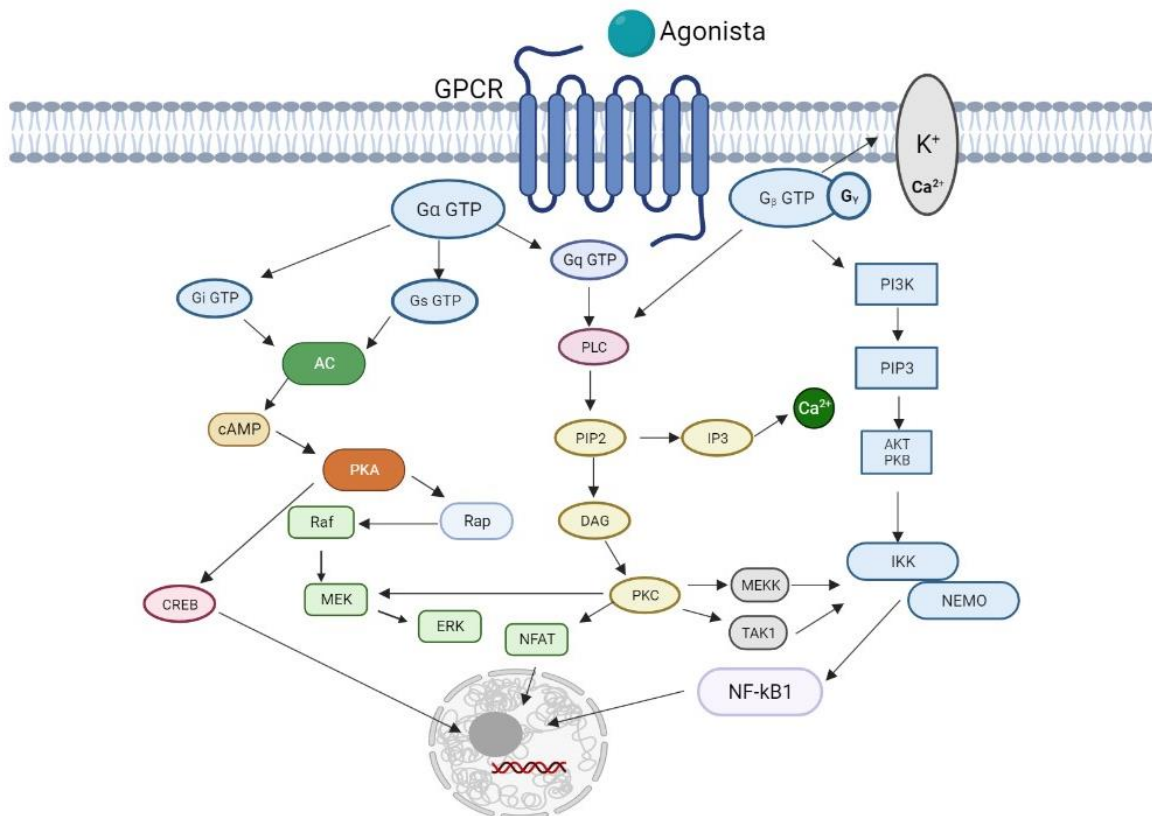


Figura 1: Imagen tomada y modificada (Sun & Ye., 2012), donde se muestra la cascada de señalización desencadenada por un GPCR durante un proceso inflamatorio. Esta vía de señalización puede variar según la localización del tipo celular en el que se encuentre el receptor y a la clase a la que pertenezca (clase A, B, C o F).

1.2 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G, son proteínas que comparten motivos estructurales comunes, incluidos sus 7 dominios transmembranales que la conforman y que presentan estructuras secundarias helicoidales. Estos receptores se sabe que sus siete hélices transmembranales se encuentran embebidos en la membrana celular y, como se describió en el apartado 1.1, tienen la función de transducir señales a la región intracelular; a través de sus interacciones con estímulos de origen extracelular (comúnmente moléculas denominadas generalmente ligandos), los cuales se pueden ser estructuralmente heterogéneos y pueden incluirse desde aminas, péptidos, proteínas, lípidos y hormonas (Audet & Bouvier, 2012; Nikiforovich et al., 2007). De forma general estos receptores se componen de tres partes: la región extracelular, la región transmembranal, y la región intracelular. Cabe mencionar que una gran cantidad de fármacos desarrollados y actualmente utilizados, se dirigen a un número pequeño de GPCR, con lo cual se abre un gran potencial para explorar y desarrollar fármacos dirigidos a esta familia de receptores (Zhao et al., 2016; Duc et al., 2015).

Los GPCR están codificados por aproximadamente 800 genes distintos y con ello forman la familia de receptores de ubicación transmembranal más grande que se encuentran en los seres humanos. Los receptores acoplados a proteínas G constituyen una gran familia de proteínas estructuralmente similares, por lo cual, con base en las relaciones de secuencia filogenética, estas proteínas se han agrupado en cinco clases: receptores de glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled y secretina, esta clasificación es conocida como: GRAFS. Por otra parte, la clasificación NC-IUPHAR considera también a los receptores de los no vertebrados y clasifica a los GPCR en la clase A (similares a rodopsina), clase B (similares a los de adherencia y secretina) la clase C (similares al receptor de glutamato metabotrópico), la clase D (similar al receptor de feromonas), la clase E (similar al receptor de AMP cíclico) y la clase F (similar a los de frizzled/ smoothened), (Yang et al., 2021; Wittlake et al., 2021))esta última clasificación (NC-IUPHAR) se describe a continuación, en esta sección.

Los GPCR de la clase A, es una familia denominada como: rodopsina. Consta de 719 miembros, véase la figura 2, la cual muestra un árbol filogenético de esta clase. Esta gran familia se divide en los siguientes subgrupos: aminérgicos, peptídicos, lípidos, melatonina, nucleótidos, esteroides, ácidos alil carboxílico, sensoriales, receptores de lípidos y huérfanos. Dentro del subgrupo de receptores “huérfanos” se encontraba el GPR40, aunque en 2003 el GPR40 dejó de ser huérfano y se le dio el nombre de receptor de ácidos grasos libres número uno (FFAR1).

Por otra parte, más de 500 fármacos se dirigen a la clase A y muchos de ellos actúan en más de un receptor, por lo general el 75% de estos fármacos se desarrollaron para el subgrupo de aminérgicos y el 10% contra receptores de ligandos peptídicos con indicaciones que van desde analgésicos, alergias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, depresión, migraña, glaucoma, enfermedad de Parkinson, entre otras afecciones patológicas (Yang et al., 2021).

En la clase A presentan numerosas características que indican un ancestro común, dentro de estas características se incluyen varios motivos estructurales como lo son: E/DRY situado entre el borde de la hélice transmembranal número 3 y el bucle intracelular número (IL2), el motivo NSxxNPxxY situado en la hélice transmembranal número 7, el motivo PIF (I^{3.40}, P^{5.50}, F^{6.44}), el motivo altamente conservado CWxP (P^{5.50}, L^{5.51}, F^{6.44} y W^{6.48}). La región N-terminal de estos receptores está en la parte extracelular, mientras que la parte C-terminal está en la parte intracelular, (Véase la figura 3 de la estructura general de un GPCR de la clase A). Se han cristalizado varias estructuras de esta familia y se conoce que en su estado inactivo muestran un ion de sodio (Na⁺) unido a Asp^{2.50} (sistema de numeración Ballesteros Weinstein), un residuo ionizable altamente conservado. Por otra parte, en el estado activo del receptor se han revelado sitios colapsados de unión a sodio, incapaces de acomodar el ion (Thomson et al., 2021).

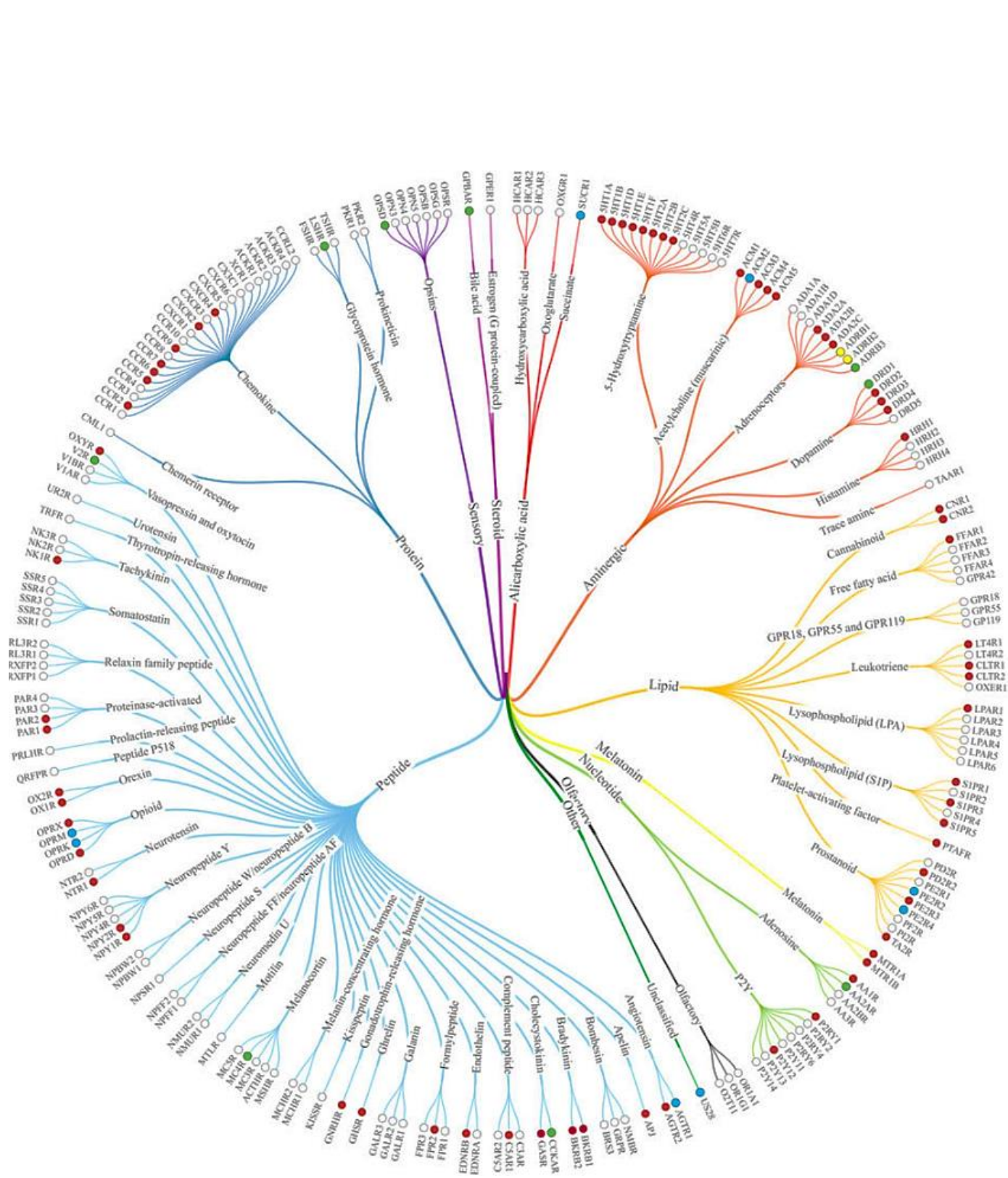


Figura 2: Imagen tomada de (Laeremans, 2022), la cual muestra un árbol filogenético de los receptores acoplados a proteína G de la clase A.

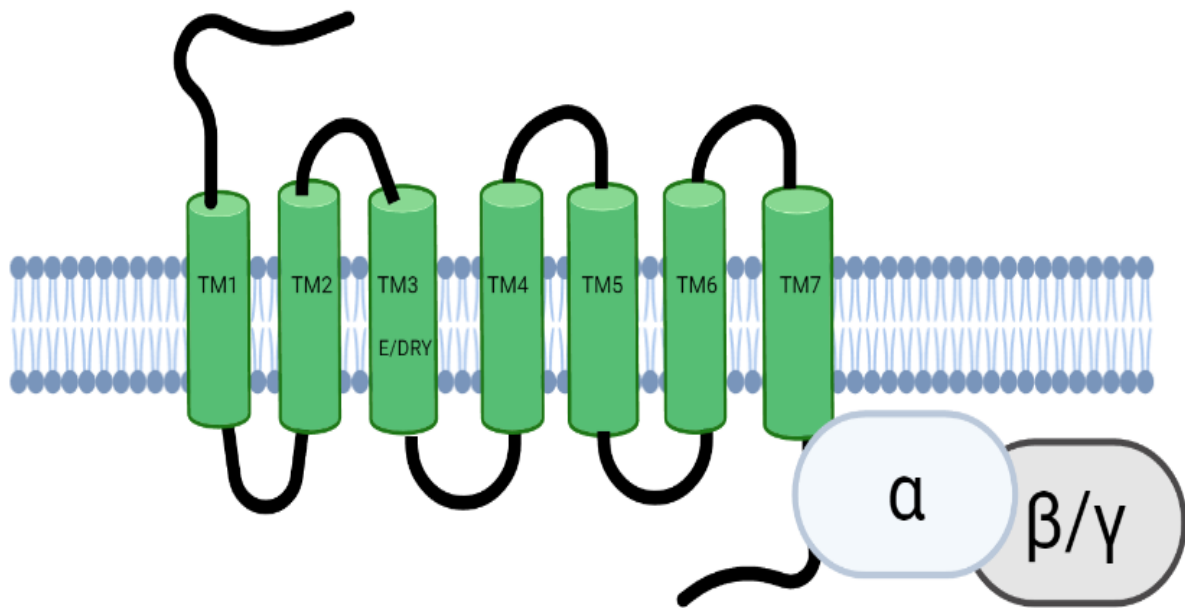


Figura 3: Imagen representativa de la estructura general de un receptor acoplado a proteínas G de la clase A, donde podemos ver que está conformado por 7 hélices transmembranales y el motivo estructural altamente conservado E/DRY se encuentra en la TM3

Por último, sobre el GPCR de la clase A se sabe que han tenido cambios estructurales en su bolsillo de unión debido a la evolución a través del tiempo para ser muy diversos tanto en forma como en secuencias (Vass et al., 2018). De igual manera, las regiones de unión a proteína G también tienen secuencias bastante diversas, lo que modula la actividad de diferentes vías de señalización al reclutar docenas de proteínas G heterotriméricas (Rasmussen et al., 2011; Du et al., 2019). Los residuos que conectan el bolsillo de unión al ligando, así como la región de acoplamiento de la proteína G están significativamente conservados. Algunos de estos motivos o secuencias conservadas son el motivo CWxP, el motivo PIF, bolsa de unión a sodio (Na^+), el motivo NPxxY y el motivo DRY (Filipek, 2019; Schönege et al., 2017; Trzaskowski et al., 2012).

En general, se asume que la unión de agonistas a la conformación inactiva de un GPCR modifica el equilibrio hacia la conformación activada (Karlin, 1967). Por lo tanto, la activación de dichos receptores es un proceso simultáneo en el cual el GPCR recluta a la proteína G inactiva, la cual es una proteína con tres subunidades denominadas con letras griegas (α , β , y γ) para así formar un trímero. Cabe mencionar que existe una molécula de guanosina difosfato (GDP) unida a la porción α , que cuando se une al ligando al complejo GPCR-GP, dicha molécula de GDP es reemplazada por una molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando en el estado activo de dicho complejo, lo que desencadenan una serie de cascadas de señalización que generan cambios intracelulares que contribuyen a la fisiología de un organismo vivo.

Se ha observado por medio de procesos experimentales y computacionales que los agonistas unidos al GPCR; a menudo no estabilizan completamente la conformación activa del GPCR, si no que aumenta la probabilidad de que exista un reclutamiento de la proteína G en la región intracelular. En la célula debido a que existen diferentes tipos de proteínas G que muestran muchas similitudes estructurales, existe una fuerte competencia entre los diferentes subtipos para acoplarse posiblemente con un GPCR con un ligando unido (Mafi et al., 2022).

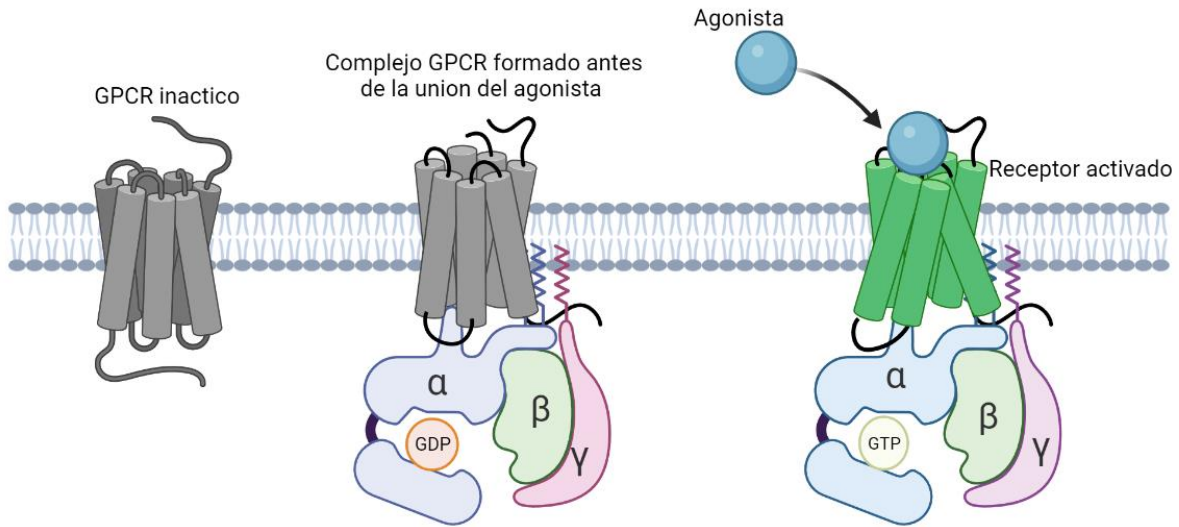


Figura 4: Mecanismo de activación general de un GPCR clase A. En el estado inactivo la proteína G interactúa con la proteína transmembranal, abriéndose paso al romper interacciones entre las hélices transmembranales 3 y 6, para así formar un estado pre acoplado, para así permanecer en reposo hasta que un agonista se una al complejo GPCR-GP, causando cambios y reordenamientos que permiten la apertura de la región intercelular de las hélices transmembranales y de la porción alfa de la proteína G, exponiendo a la molécula de GDP para ser intercambiada por un GTP . (Mafi et al., 2022)

En la clase B, los GPCR estructuralmente comparte gran similitud con la clase A y por lo tanto solo se describe de manera breve algunas diferencias, como lo es en su parte extracelular, la cual tienen un gran dominio N-terminal de 120 a 160 residuos, los cuales están plegados de manera similar a otros receptores de esta clase B, además este plegamiento de la parte N-terminal está estabilizado por tres puentes disulfuro conservados, los cuales contribuyen para formar parte del sitio de unión para el reconocimiento de ligando. En su estructura tiene también tres bucles intracelulares y extracelulares, los cuales interconectan a las siete hélices transmembranales las cuales están conformadas de 310 a 420 residuos. Dentro de esta clase se encuentra una subdivisión de dos subfamilias, las cuales son: secretina B1, en la cual hay 15 miembros y la subfamilia de adhesión B2, en la cual hay 33 miembros (Culhane et al., 2015).

Los miembros de la familia de secretina deben su nombre al primer receptor que fue clonado de esta familia y se diferencian de otros GPCR por sus funciones en la adhesión y migración celular, por otra parte, estos receptores se unen a péptidos grandes. Una de sus características es que tienen un sitio de unión a hormonas en la parte extracelular, otra de sus peculiaridades en su estructura son los residuos de cisteína en su extremo N-terminal, así como cisteínas conservadas en el primer bucle y segundo bucle extracelular (Odoemelman et al., 2020).

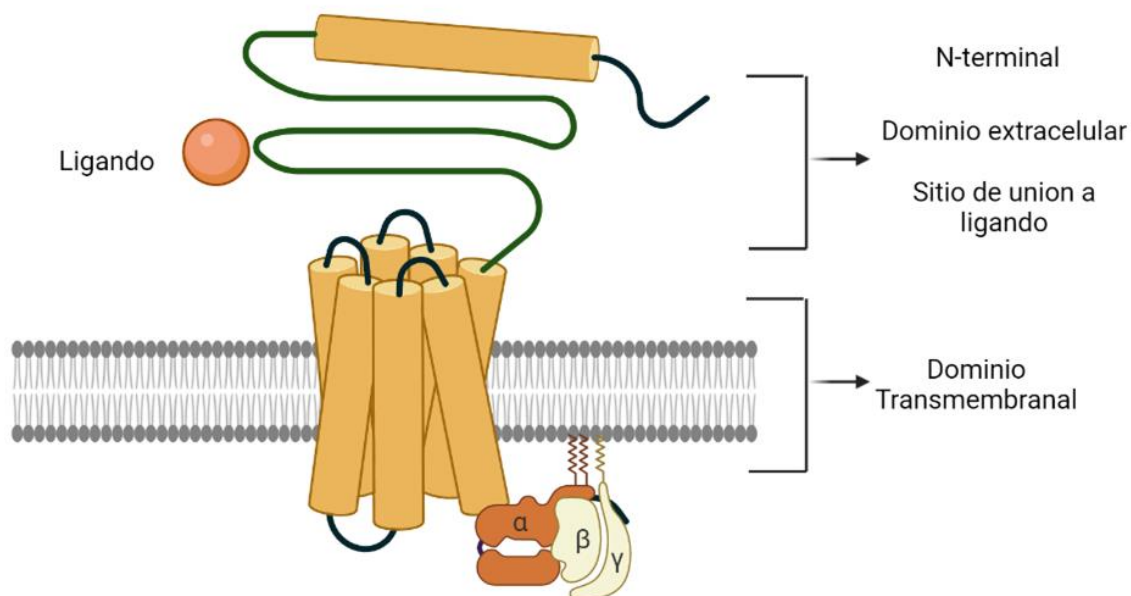


Figura 5: Ilustración tomada y mejorada de (Culhane et al., 2015) donde muestra un receptor acoplado a proteína G de la clase B, mostrando los dominios característicos en algunos receptores de esta clase.

La familia de los GPCR de la clase C, se conoce que desempeñan funciones importantes en muchos procesos fisiológicos, como la transmisión sináptica, la sensación gustativa y la homeostasis del calcio. Dentro de esta familia podemos encontrar a los receptores del ácido γ -aminobutírico_B, receptores odoríferos en peces, receptores de sabor dulce y umami ocho receptores metabotrópicos de glutamato, receptores de feromonas, receptores sensibles a Ca^{2+} conocidos como; receptores CaS o CASR, así como receptores huérfanos aún no totalmente clasificados (Lagerström & Schiöth, 2008; Chun et al., 2012).

Una de las características distintivas de los GPCR de clase C es el homo dimerización o hetero dimerización constitutiva mediada por un dominio N-terminal extracelular, el cual es conocido por sus siglas en inglés como: ECD. Esta homodimerización o hetero dimerización se entre cruza a través de la interacción de un puente disulfuro, como sucede en los receptores tipo heterodímero como lo son: GABA_B y el receptor de sabores TAS1, los cuales no están unidos covalentemente, pero se requiere su hetero dimerización para que suceda la señalización celular (Chun et al., 2012).

Por otra parte, otra característica de esta clase es que en su dominio conocido como ECD consta de un dominio denominado Venus atrapamoscas (VFD), que contiene el sitio de unión ortostérico para ligandos nativos y un dominio rico en cisteína (CRD) a excepción de los receptores GABA_B. El dominio rico en cisteínas media la comunicación entre el dominio Extracelular (ECD) y el dominio 7TM, esta unión está estabilizada por un puente disulfuro, el cual conecta el dominio rico en cisteínas con el dominio Venus atrapa moscas (Wu et al., 2014)

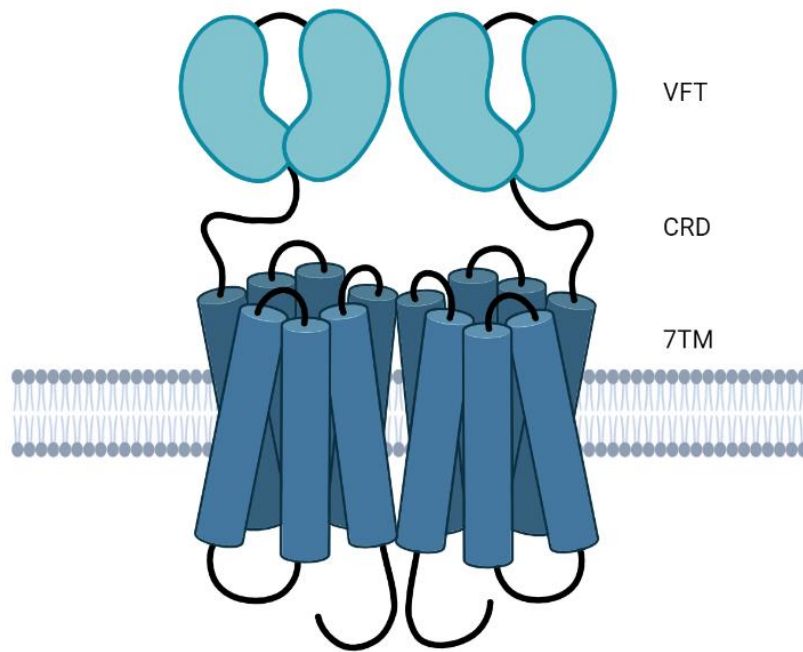


Figura 6: Imagen basada de (Chun et al., 2012), donde se muestra la estructura representativa de los dominios presentes en un receptor acoplado a proteína G de la clase C.

Por último, de manera breve, se describe que los receptores pertenecientes a la clase F están altamente conservados evolutivamente, esta clase consta de diez parálogos de Frizzled (FZD_{1-10}) Y Smoothed (SMO). Por un lado, los FZD median la señalización canónica WNT y los SMO mediante la vía de señalización Hedgehog. Juntos tienen un papel clave en el desarrollo embrionario, la regulación de células madre y en la tumorigenesis (Patel et al., 2019; Van Amerongen & Nusse, 2009). A lo largo de los años, los receptores de la clase F se consideraban GPCR no convencionales debido a la falta de motivos conservados como el E/DRY (bloqueo iónico) o el motivo de interruptor de palanca (NPxxY), encontrados en la clase A, por ello a estos receptores se les ha atribuido la característica de estar en contra de la naturaleza habitual de los GPCR (Schulte & Kozielwicz, 2020; Wright et al., 2019).

1.3 Receptores de ácidos grasos libres

Los receptores de ácidos grasos libres (conocido por sus siglas en inglés como: FFAR; *Free Fatty Acid Receptors*) son una familia compuesta hasta ahora por cuatro receptores acoplados a proteínas G, cada uno de los cuales tiene como ligando endógenos diferentes tipos de ácidos grasos libres. Como dato histórico se sabe que en 1997 estos receptores se incorporaron al ámbito científico durante la búsqueda de nuevos subtipos de receptores de galanina humana y en 2003 el GPR40 fue clasificado dentro de este tipo de receptores, ya que antes de esto era un receptor huérfano de la clase A de GPCRs. Los cuatro FFAR que se encuentran bien caracterizados hasta ahora son los receptores FFAR1 (también conocido como GPR40), FFAR4 (también conocido como GPR120), FFAR2 (también conocido como GPR43) y FFAR3 (también conocido como GPR41). El FFAR1 y FFAR4 son ambos activados por ácidos grasos saturados e insaturados de cadena media a larga, por ejemplo: α -ácido linoleico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido oleico, ácido gamma linoleico, por citar algunos ejemplos. Mientras que los receptores de ácidos grasos libres FFAR2 Y FFAR3 son activados por ácidos grasos de cadena corta como el acetato, butirato y propionato (Bartoszek et al., 2020)

Cada uno de los receptores de ácidos grasos libres puede actuar como un sensor de ácidos grasos libres (FFA) con selectividad para una cierta longitud de cadena de carbonos de un ácido graso libre metabolizado a partir de la alimentación. Se sabe que los receptores de ácidos grasos libres (FFAR) tienen funciones fisiológicas como la secreción de hormonas de insulina e incretina, diferenciación de adipocitos, efectos antiinflamatorios, respuestas neuronales y preferencias gustativas en la percepción de sabores y olores. Por lo tanto, dichas funciones fisiológicas de los receptores de ácidos grasos libres regulan la homeostasis energética e inmunitaria.

Hasta ahora no hay estructuras cristalizadas del GPR43 (FFAR2) y del GPR41 (FFAR3), por lo cual hasta ahora solo se conoce sus estructuras por el modelado por homología y por lo tanto los sitios de unión a ligando propuestos son aún especulativos y se han evaluado mediante investigaciones *in silico* (Mishra et al, 2020).

La falta de información estructural disponible tanto de FFAR2 y FFAR3 limita la comparación del modo de interacción de un ácido graso de cadena corta y larga, así como los residuos implicados en la unión de cada uno de los cuatro receptores de ácidos grasos libres. Más aún, dicha información ayudará a racionalizarla selectividad de dichos receptores por los diferentes tipos de ácido graso, es decir, de cadena corta o larga (el papel de tamaño del ligando).

1.3.1 Receptor acoplado a proteína G número 4 (GPR40)

El receptor GPR40, el cual es el receptor objetivo de nuestro tema, fue inicialmente definido como un receptor huérfano, es decir, que se desconocía la identidad de su ligando endógeno. Sin embargo, se iniciaron investigaciones en las cuales se hizo la identificación de sus ligandos endógenos, esto se descubrió mediante análisis de transducción de diversas señales en las células que expresan a este receptor. Se observó así, que los ácidos grasos de cadena media a larga son potentes activadores del GPR40, ya que son capaces de aumentar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Itoh Y, 2003). Asimismo, se observó que los cambios en el grupo carboxilo de diferentes ligandos se relacionaba con las características farmacofóricas de este grupo funcional para la actividad agonista de dichos ligandos (Rodrigues et al., 2018).

El receptor de ácidos grasos libres número 1 (FFAR1, también conocido como GPR40), es un receptor de la familia de las rodopsinas (Clase A) de los GPCR de 31.45 kDa y que está constituido por 300 residuos. De manera similar a otros GPCRs, la arquitectura del GPR40 está compuesta por 7 hélices transmembranales interconectadas por tres bucles extracelulares y por otra parte tiene tres bucles intracelulares. De manera interesante, el bucle extracelular número dos es particularmente más largas que el resto y se ha demostrado que tiene un papel muy importante en la interacción con ligandos. Un dato para resaltar de este receptor es que el motivo estructural altamente conservado en los GPCR y denominado E/DRY, se encuentra modificado en el GPR40 donde existe un residuo de glicina (G) en lugar de un ácido glutámico o ácido aspártico (E/D) como normalmente se observa en los receptores acoplados a proteínas G de la clase A (Tomita et al., 20140; Ho et al 2018).

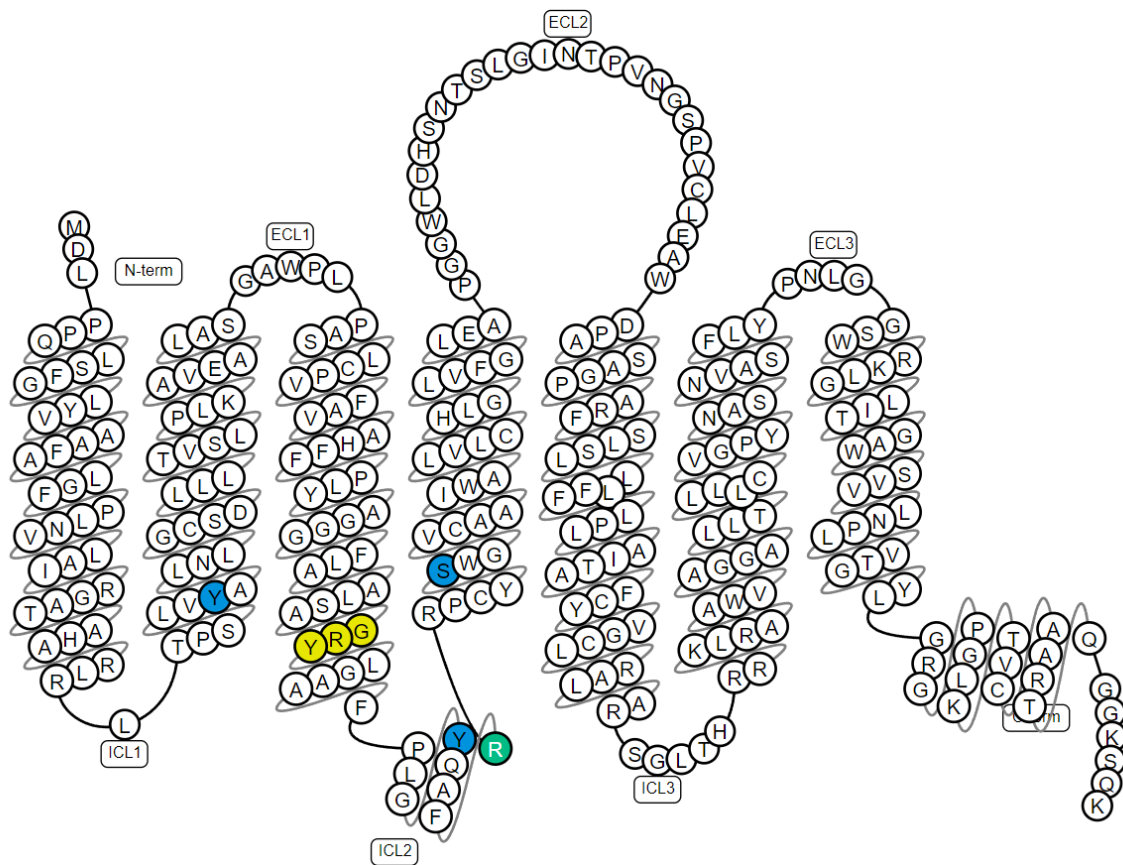


Figura 7: Ilustración realizada en GPCRdb donde se muestra una representación en estilo serpiente del GPR40, en el cual, en color amarillo se muestra el motivo estructural GRY y en color azul y verde los residuos clave de interacción en el sitio alostérico número dos.

Con respecto a la expresión del receptor acoplado a proteína G número 40 en diversos tejidos se conoce que está presente en mayor cantidad en las células β pancreáticas, las cuales son productoras de insulina, también se encuentra en las células K y L entero-endocrinas, las células inmunitarias, las papilas gustativas y el sistema nervioso central (Kimura et al., 2013). En menor proporción el FFAR1 se expresa en las células α pancreáticas, células entero-endocrinas I y en osteoblastos y osteoclastos, también evidencia reciente sugiere que se expresa en hepatocitos y células endoteliales (Lu et al., 2021; Secor et al. 2021). A continuación, se muestra una imagen ilustrativa de los tejidos donde se expresa el GPR40.

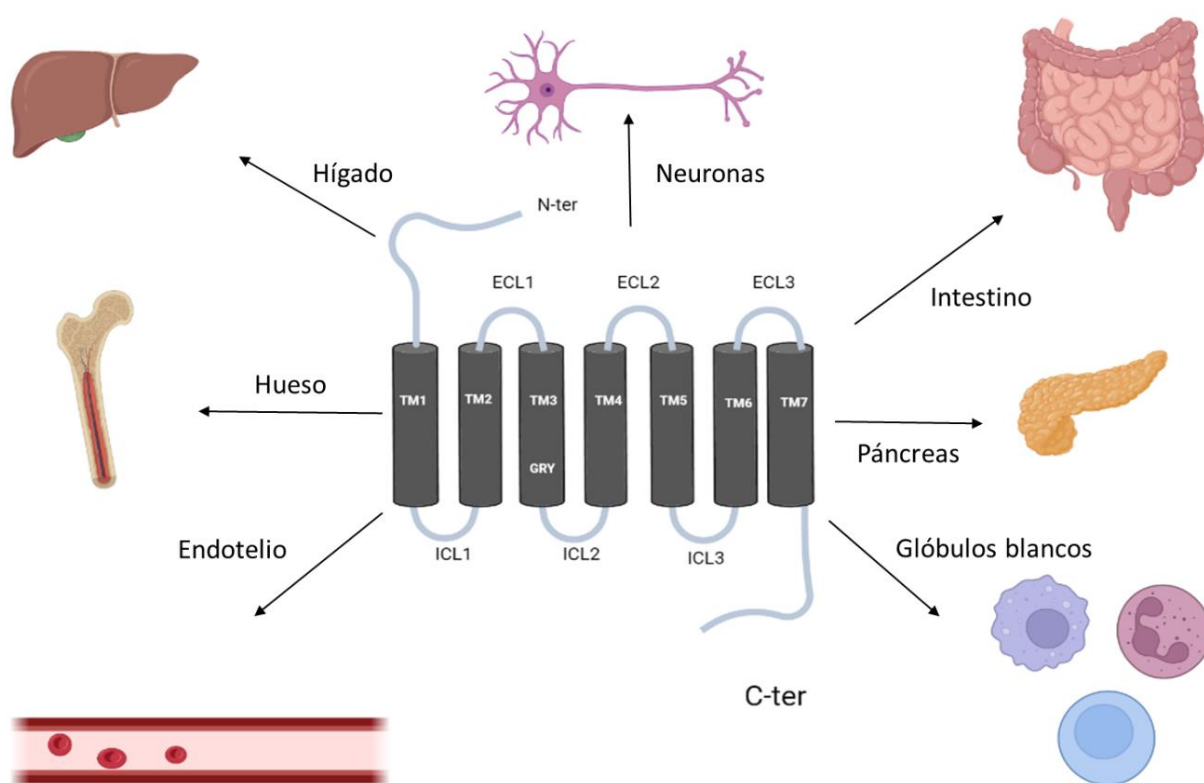


Figura 8: Imagen tomada y modificada de (Secor et al. 2021) Los tejidos en los cuales el receptor GPR40 se expresa son: hígado, hueso, páncreas, endotelio, intestinos, células del sistema inmune y neuronas.

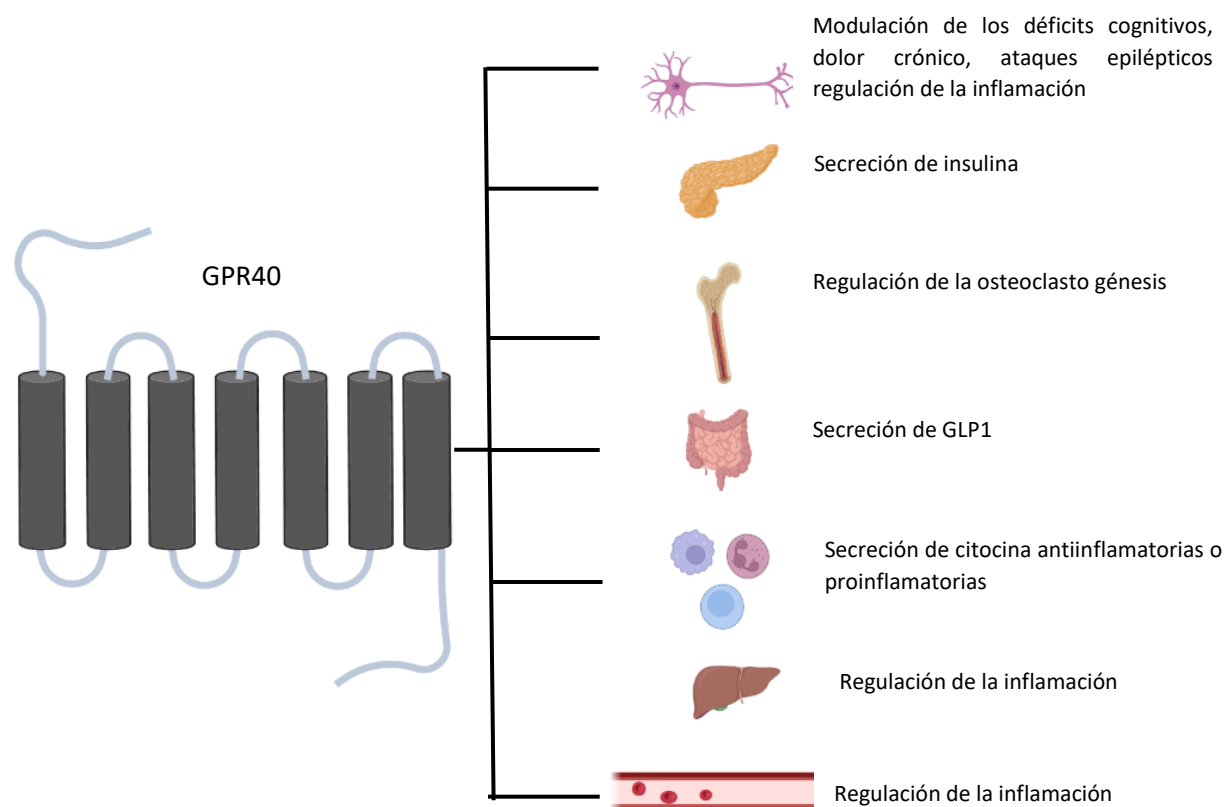


Figura 9: Funciones conocidas hasta ahora del receptor GPR40 en cada uno de los tejidos en los que se expresa.

Por otra parte varios grupos informaron que sus principales ligandos solo lo de cadena media a larga, por lo tanto, de acuerdo con las investigaciones realizadas por diferentes grupos determinaron la actividad de los agonistas por medio de la liberación de Ca^{2+} , siendo así el siguiente orden de o dichas moléculas agonistas: ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6)>ácido α -linolénico (α -LA) (C18:3)> ácido oleico (C18:1)>ácido palmítico (C16)>ácido láurico (C12)>ácido cáprico (C10)> ácido caprílico (C8). Como se pudo observar el orden fue dado de mayor a menor de acuerdo con su efecto como activadores del GPR40, también hay ácidos libres agonistas naturales del GPR40 que no fueron mencionados anteriormente y como lo son el ácido araquidónico y el ácido gamma linoleico (Christiansen et al., 2015; Liou et al., 2011).

1.3.2 Cascada de señalización conocida hasta ahora durante la activación del GPR40 por un ligando agonista

Los GPCR pueden transducir señales recibidas de moléculas denominadas ligandos, estos ligando pueden interactuar en la región transmembranal, la cual forma el núcleo estructural de la proteína. La unión de un ligando causará el cambio conformacional de la proteína, lo cual, como consecuencia, propicia el cambio en la parte intracelular para poder interactuar con proteínas de señalización citosólica. Específicamente es la interacción con las proteínas conocidas con el nombre “G”. Los receptores pueden unirse a distintas isoformas de las proteínas G, como lo son las: Gs, G_{q/11}, Gi, G_{12/13}, (Ritter & Hall, 2009) lo que da como resultado la activación de una serie de cascadas de señalización dentro de la célula, lo que le permite generar estímulos para cumplir diversas funciones dentro de la función fisiológica.

Hasta ahora por los estudios en células pancreáticas con la molécula llamada TAK-875 se conoce que el GPR40 o FFAR1, tiene dos sitios de unión a ligante estos son el sitio alostérico 1 o en el sitio alostérico 2 (Véase la figura 10). Esta unión en cualquiera de esos sitios causa cambios conformacionales en el receptor desencadenando en consecuencia la separación del trímero de la proteína G, teniendo como posibilidad la divergencia en la vía de señalización dependiendo el subtipo de la subunidad alfa, por ello tenemos que, si la proteína G es la G α q, esta activa la cascada de señalización de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima conocida como PLC escinde el lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2), dando como resultado a los segundos mensajeros conocidos como diacilglicerol conocido por sus siglas en inglés como DAG y también se produce el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), lo cual conduce a la liberación de calcio Ca²⁺ intracelular y a la activación de la proteína quinasa C (PKC), inducida por el diacilglicerol. Toda esta vía conduce a la remodelación del citoesqueleto, dicha remodelación promueve la actividad secretora celular. Por lo tanto, la determinación de calcio Ca²⁺ intracelular se emplea para verificar la activación del FFAR1. La activación de quinasas reguladas por señales extracelulares se ha confirmado como una de las cascadas de señalización aguas debajo de la señalización del complejo FFAR-Gq (Governa et al., 2021; Falkenburger et al., 2013).

Por otra parte, se ha informado que el FFAR1 se puede acoplar a proteínas Gs y Gi, lo cual conduce a una modulación tanto positiva como negativa de los niveles de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). La concentración de cAMP está regulada por el equilibrio entre las actividades de dos enzimas, una de ellas la adenilil ciclasa (AC) y la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico (PDE). Cuando la proteína Gs se unen con la adenilil ciclasa la activan, mientras que cuando se une la proteína Gi el cAMP puede degradarse mediante la acción de la fosfodiesterasa nucleotídica cíclica. Actualmente todavía no hay una vía de señalización concretada cuando la proteína Gs se une al adenilil ciclasa. Por lo tanto, debido a que el FFAR1 se puede acoplar a proteínas Gq, Gs y Gi, se cree que la señalización es más compleja de lo esperado, por lo cual son esenciales más estudios para comprender el mecanismo preciso que explique los efectos fisiológicos de este receptor (Sassone, 2012; Mancini & Poitout, 2013).

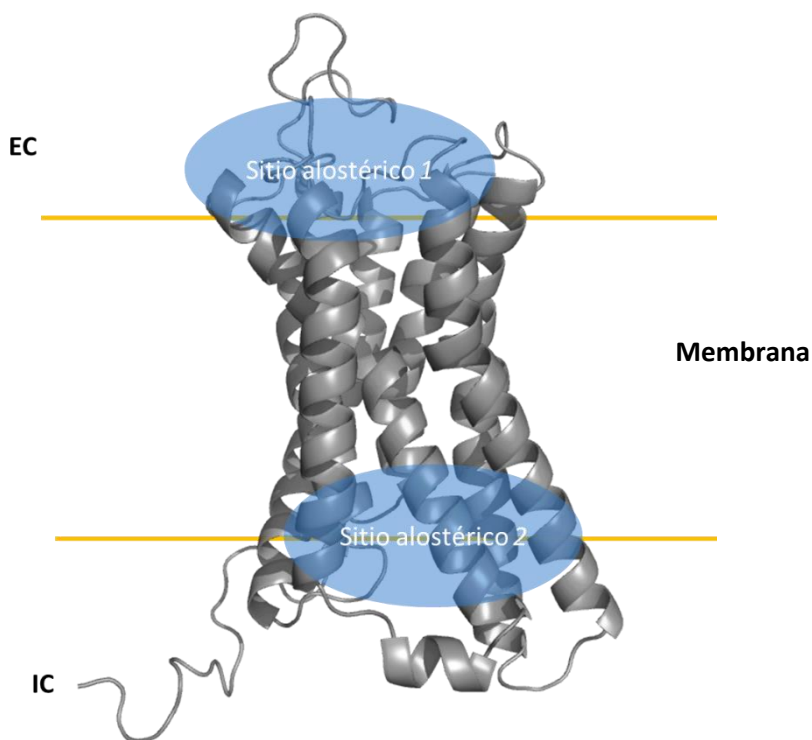


Figura 10. Representación del SA1 y SA2, sitios de interacción conocidos hasta ahora donde se unen los ligantes en el GPR40, estos sitios fueron descubiertos por cristalografía. (Egyed et al., 2022; Ho et al., 2018)

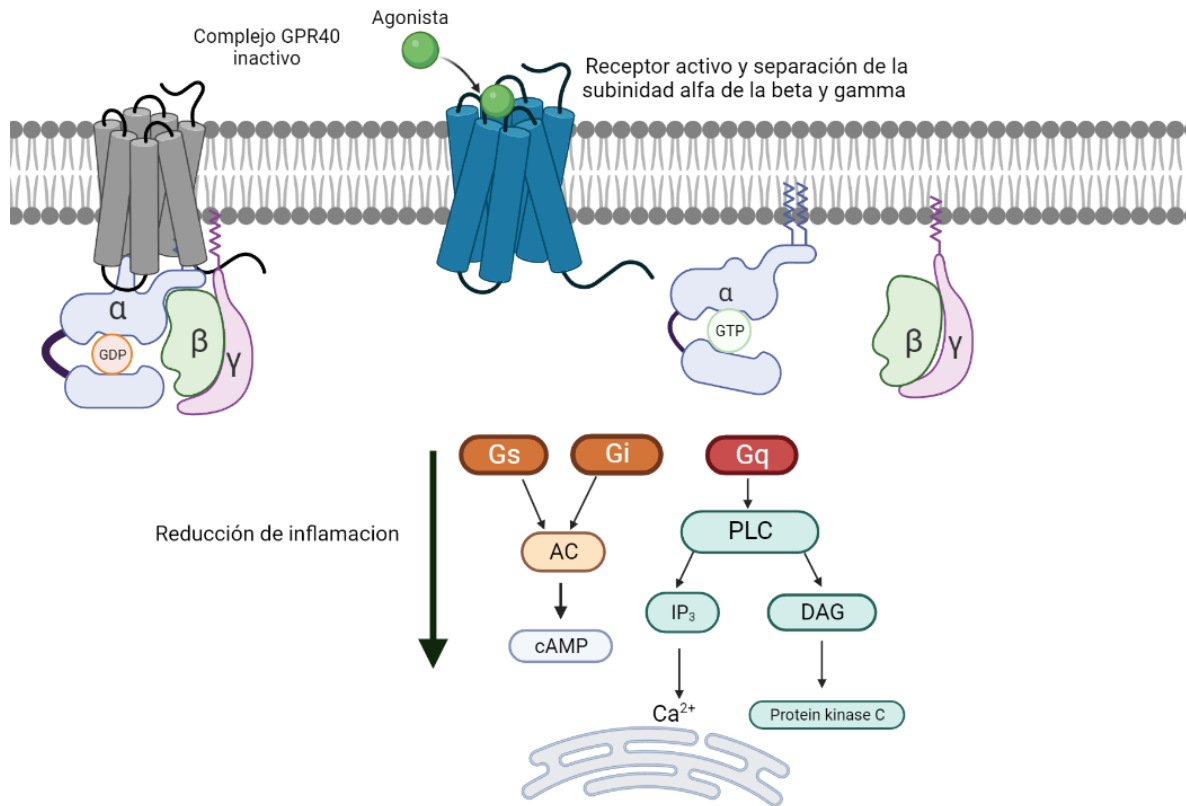


Figura 11: La vía de señalización conocida hasta ahora del GPR40 se inicia al unirse un ligando agonista, el cual desencadenara cambios conformacionales activando el receptor que a su vez activa a la proteína G la cual se separa para quedar la porción alfa como monómero y así activar por consecuencia diferentes vías de señalización, esto dependiendo de si se activó la proteína Gs, Gq o Gi. (Rives et al., 2018)

1.4 Ácidos Epoxiecosatrienoicos

En esta sección se describe a los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs), los cuales forman parte de los ligantes que podrían tener como receptor al GPR40. Por múltiples investigaciones de años anteriores, se conocía a dos factores de relajación endotelial, uno de ellos era la prostaglandina PGI₂ y el otro el óxido nítrico (NO). Posteriormente se descubrió un tercer dilatador endotelial que se diferenciaba del NO y el PGI₂, este nuevo factor relajaba el músculo liso vascular al abrir los canales de potasio (K), causando hiperpolarización de la membrana plasmática (Feletou & Vanhoutte, 1988). A este tercer dilatador del tono vascular se le denominó: factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF). La actividad del EDHFes efectuada por varias moléculas en los diferentes sitios vasculares del cuerpo. Las investigaciones de varios grupos y junto con la de Campbell y colaboradores indican que los ácidos Epoxiecosatrienoicos, los cuales son derivados del ácido araquidónico, pueden funcionar como factor hiperpolarizante derivado de endotelio, tanto en humanos como en animales (Campbell & Falck, 2007).

Los ácidos epoxiecosatrienoicos provienen del metabolismo del ácido araquidónico. El cual, por su fórmula química C₂₀ H₃₂ O₂ es conocido como all-cis-5,8,11,14-ecosatetraenoico, donde el prefijo eico significa 20, es decir es una cadena de 20 átomos de carbonos y es un ácido graso poliinsaturado omega-6 (Hanna & Hafez, 2018). Este ácido graso es convertido en diferentes metabolitos por medio de diferentes vías, entre ellas se encuentra la vía de las lipooxigenasas (LOX), la cual produce leucotrienos y ácidos hidroxiecosatrienoicos, por otro lado, la vía de las ciclooxigenasas (COX), produce prostaglandinas y por último la vía de las epoxigenasas del citocromo p450, en especial las CYP2C y las CYP2J, las cuales producen a los ácidos epoxiecosatrienoicos (Oliw, 1994; Zeldin, 2001).

La superfamilia de las enzimas CYP monooxigenasas dependientes de NADPH unidas a la membrana, desempeñan un papel vital en la oxidación de xenobióticos y compuestos endógenos (Aliwarga et al., 2018). Las CYP2C Y la CYP2J son las enzimas más importantes en la síntesis de los ácidos epoxiecosatrienoicos, estas se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico y se conoce que la CYP2J humana se expresa principalmente tanto en corazón como en endotelio (Hanif et al, 2017; Lai & Chen, 2021).

La síntesis de los EETs inicia cuando la fosfolipasa A₂ tipo 4 calcio (Ca²⁺) dependiente es activada y traslocada del citosol a la membrana intracelular, liberando el ácido araquidónico unido en la posición SN2 en los fosfolípidos de membrana, posteriormente las enzimas del citocromo P450 en especial la CYP2C y la CYP2J insertan un átomo de oxígeno, al atacar en uno de los carbonos que tienen el doble enlace y este es reducido a la forma de epóxido. Cada una de las enzimas CYP produce varios regio isómeros predominando una de las formas, produciendo principalmente el 14,15-EET, moderadamente el 11,12-EET y pequeñas cantidades de los regio isómeros con el grupo epóxido en los carbonos 8,9-EET y el 5,6-EET, cabe mencionar que cada uno de estos regio isómeros existen en su forma R/S, S/R, S/S, R/R, de las cuales la forma R/S del 14,15-EET y del 11,12-EET se produce en un 82%, y la S/R en un 69% (Spector & Norris, 2007; Spector, 2009)

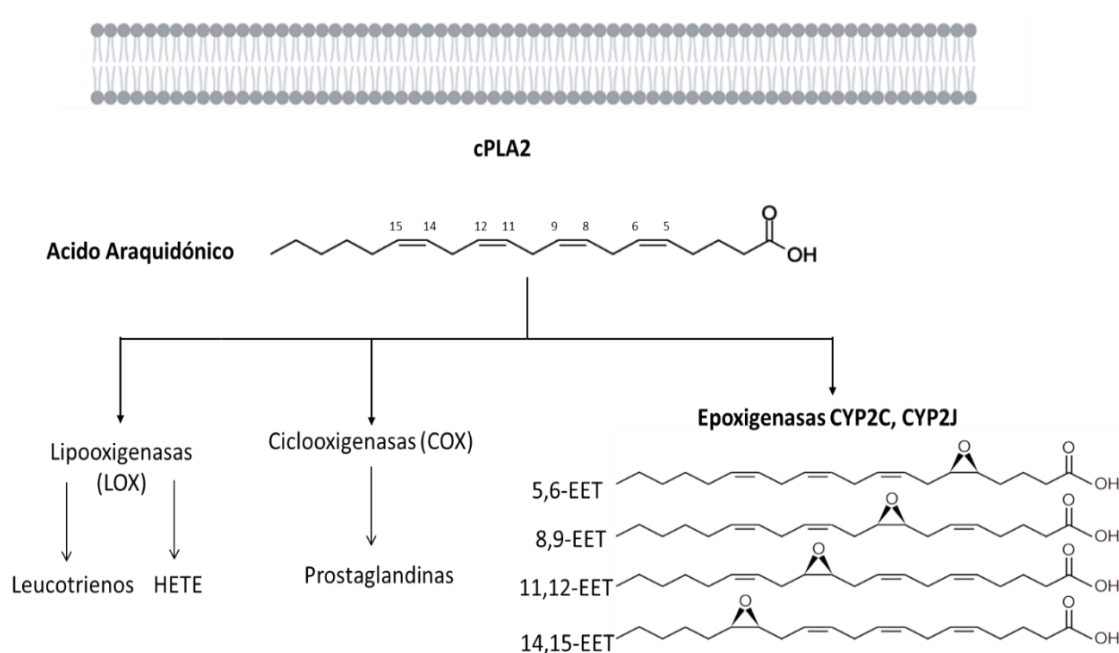


Figura 12: Imagen realizada en base a la información encontrada de Spector & Norris, 2007, donde se muestra el *metabolismo* del ácido araquidónico por diferentes enzimas. Dentro de las principales enzimas que convierte el ácido araquidónico en diferentes metabolitos son las LOX, COX y las epoxigenasas CYP2C, CYP2J, las cuales agregan un grupo epóxido en las insaturaciones del ácido araquidónico para producir los diferentes regio isómeros de los ácidos epoxieicosatrienoicos.

Por otra parte, diversas investigaciones centraron atención en las enzimas CYP2C y CYP2J, ya que los diferentes grupos hallaron efectos benéficos de los EETs para tratar las enfermedades cardiovasculares. Dentro de dichos efectos benéficos se observó que el incremento crónico de los EETs mejoraba la isquemia del miocardio en ratones (Zhang et al., 2009). También se ha visto buenos efectos en la miocardiopatía no isquémica la cual es una lesión que conduce a arritmias, disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca, en esta afección los EETs han demostrado efectos cardioprotectores significativos en modelos de miocardiopatía no isquémica no relacionada con su uso como agentes antihipertensivos (Wang et al., 2016). Otro beneficio para mencionar es el mejoramiento de las arritmias, esto al inhibir la enzima epóxido hidrolasa soluble en ratones, en junto con la sobreexpresión de CYP2J2, la cual causa una bio síntesis mejorada de EETs, los cuales al incrementar su biosíntesis mostraron la protección contra la remodelación eléctrica del corazón, así como el mejoramiento de la taquiarritmia ventricular y la fibrilación auricular causada por la hipertrofia cardíaca (Westphal et al., 2013).

Otros efectos positivos de los EETs dentro de las enfermedades cardiovasculares son los relacionados a la hipertensión arterial. Se conoce hasta ahora que las acciones de los EETs incluyen la vasodilatación, el aumento en la excreción de sodio y la disminución de la inflamación (Imig, 2019). Debido a que la hipertensión es de causa multifactorial una de esas causas es: el estrés oxidativo, que se caracteriza por una alteración en el equilibrio antioxidante, lo cual conduce a una disfunción endotelial, también la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), estas especies reactivas con un electrón desapareado promueven citocinas proinflamatorias y el aumento de la contractilidad vascular, lo que da como resultado un remodelamiento del tejido cardiovascular (Krzemińska et al., 2022).

Se sabe que los EETs son metabolizados por la epoxido hidrolasa soluble (sEH), convirtiéndolos en ácido dihidroxieicosatrienoicos (DHET), los cuales tienen actividad biológica reducida o nula. Sin embargo, se ha demostrado que las variaciones genéticas del gen sEH EPHX2 (Bellien & Joannides, 2013), el cual aumenta la actividad de sEH, causando respuestas vasodilatadoras endoteliales alteradas en humanos y por otra parte estudios realizados de igual manera en humanos muestra evidencia de que una disminución elevada de EETs da como resultado una presión arterial elevada. Es por ello que en modelos animales

al incrementar los niveles de los ácidos epoxieicosatrienoicos da como resultado acciones protectoras cardiovasculares y de reducción de presión arterial (Campbell et al., 2017).

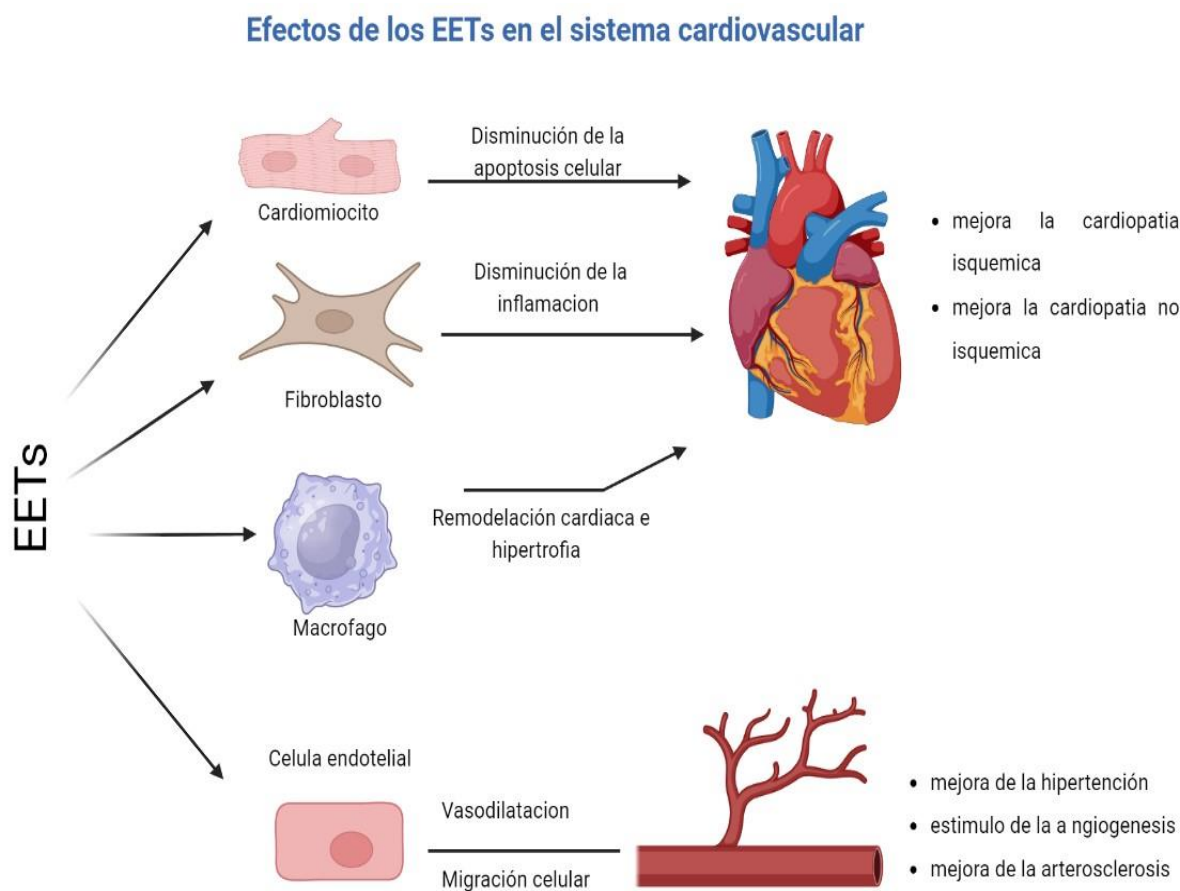


Figura 13: Funciones biológicas conocidas de los EETs en el sistema cardiovascular. Las enzimas CYP metabolizan el ácido araquidónico convirtiéndolo en un ácido epoxieicosatrienoico el cual tendrá un efecto fisiológico en el sistema cardiovascular. Dichos efectos pueden ser desde mejorar la vasodilatación, la isquemia cardíaca hasta la regulación de la presión arterial (Wang et al., 2016).

1.5 Herramientas *in silico*

La función biológica se basa en las interacciones a nivel molecular entre las estructuras macromoleculares como lo son las proteínas. Desde que se realizaron las determinaciones iniciales de la estructura de bio-macromoléculas en los años 50, el conocimiento de cómo se construyen estructuralmente el mundo de las proteínas y los ácidos nucleicos ha ido aumentando enormemente. Actualmente, el banco de datos de proteínas conocido por sus siglas en inglés (PDB; *Protein Data Bank*), contiene aproximadamente más de 110.000 entradas, dentro de las cuales son aproximadamente 100,000 proteínas, así como 2,800 ácidos nucleicos ya sea solos o formando complejos. También se pueden encontrar aproximadamente 20,000 moléculas pequeñas formando complejos con macromoléculas.

Por otra parte, la información de las estructuras tridimensionales (3D) de proteínas son la base para el diseño de fármacos basado en estructuras, aunque de una manera general las estructuras almacenadas en el PDB proporcionan sólo una vista parcial y estática de la estructura 3D de dichas biomoléculas. Tanto las proteínas como los ácidos nucleicos son flexibles a la temperatura corporal y por lo tanto técnicas computacionales que consideran dichos factores dinámicos, incluyendo a las simulaciones de dinámica molecular, pueden desempeñar un papel clave en evaluar los cambios conformacionales importantes que exploran las proteínas mientras realizan sus funciones en la célula. Más aún, dichas técnicas proveen información de cómo diferentes ligandos afectan dichos cambios conformacionales. (Hospital et al., 2015)

1.5.1 Simulación de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) han tenido gran impacto en la biología molecular y descubrimiento de fármacos. Esta herramienta computacional captura con detalle el comportamiento de las proteínas y otras biomoléculas que permite calcular los movimientos de los átomos en un sistema molecular cabe mencionar que tales simulaciones también pueden predecir cómo responderán las biomoléculas atómicamente a perturbaciones como la mutación, fosforilación, la protonación, adición o eliminación de un ligando (Karplus & Petsko, 1990).

De manera general en un sistema molecular los átomos y enlaces que conectan a dichos átomos son esferas cargadas, por lo cual los parámetros de las funciones matemáticas que describen la energía potencial de un sistema son denominados “campo de fuerza”, y este se establece para simular los movimientos de los átomos y moléculas. Los campos de fuerza utilizados con mayor frecuencia para proteínas son: AMBER y CHARMM, los cuales tienen fórmulas de enlaces covalentes, ángulos diedros, van der Waals y potenciales electrostáticos (Brooks et al., 2009).

Actualmente la simulación de dinámica molecular permite investigar la dinámica estructural de las proteínas en escala de tiempo. Al utilizar esta técnica se puede hacer el uso del modelado por homología cuando el receptor no está completo, por otra parte, una vez teniendo la proteína completa se puede refinar las estructuras tridimensionales (3D) determinadas experimentalmente y así finalmente abordar la dinámica estructural de las proteínas que se están evaluando, dicho dinamismo estructural es evaluado a través del tiempo en una escala que va desde nanosegundos hasta microsegundos, tal vez en un futuro los avances y mejoras de la técnica permitirán simulaciones con una duración de milisegundos (Ode et al., 2012).

De manera general, para poder garantizar la estabilidad numérica, los pasos de tiempo de una simulación MD deben ser cortos, normalmente de uno pocos femtosegundos (10^{-15} s) cada uno. Mayoritariamente los cambios estructurales funcionalmente importantes en las proteínas tienen lugar en escalas de tiempo en nanosegundos, microsegundos o más. Por lo tanto, una simulación típica implica millones o miles de millones de pasos en un lapso de tiempo, es por ello que la simulación es muy exigente en los requerimientos computacionales. Por último, en la siguiente fórmula se muestra el cálculo para una simulación de dinámica molecular con una duración de un microsegundo, cabe mencionar que cada paso en este ejemplo dura 2 femtosegundos, por lo cual el resultado será mil millones de pasos (Hollingsworth & Dror, 2018).

$$\text{Número de pasos} = \frac{\text{Duración de la simulación}}{\text{Duración de cada paso}}$$

$$\text{Número de pasos} = \frac{10^{-6} \text{ s}}{10^{-15} \text{ s}} = 1,000,000,000 \text{ de pasos}$$

2. Antecedentes

Investigaciones recientes sobre el receptor acoplado a proteína G número 40 han encontrado que este receptor podría estar relacionado con efectos antiinflamatorios al tener interacción con los EETs (Larsen et al., 2007). En 2018 Park, junto con Campbell y sus colaboradores, expresaron al receptor el GPR40 en células HEK293, lo que les permitió determinar incrementos de Ca^{+2} intracelular asociados a la presencia de EETs. Los resultados de dichos experimentos permitieron sugerir que la EC_{50} para el EET-14,15 es 6,7 veces menor que la EC_{50} del ácido araquidónico, lo cual indica que la epoxigenación presente en los EETs confiere una mayor potencia a estas moléculas. Asimismo, compararon la activación de los receptores GPR120 y GPR40, y observaron observando que el GPR40 necesitaba cantidades nanomolares de EET-14,15 para ser activado mientras que el GPR120 necesitaba de cantidades micromolares para mostrar su activación por medio de la medición de liberación de calcio. Dicho de otra manera, el valor de EC_{50} de los EETs en el GPR40 es menor con respecto al receptor GPR120. Por lo tanto, el receptor acoplado a proteínas G número 40 tiene una mayor afinidad por los ácidos epoxieicosatrienoicos, en particular, el regioisómero EET-14,15 (Park et al., 2018).

3. Hipótesis

Los EETs pueden funcionar como ligandos del receptor GPR40 y ejercer su actividad antiinflamatoria por la modulación de la función de dicho receptor.

Los métodos computacionales son adecuados para elucidar el modo de interacción de los EETs con el receptor GPR40 humano permitiéndonos clasificar a los EETs ya sea como ligantes agonistas o antagonistas del receptor.

4. Objetivo general

Evaluar las interacciones de los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs) con el receptor GPR40 por medio de técnicas *in silico*, particularmente, mediante la aplicación de simulaciones de dinámica molecular.

5. Objetivos específicos

- a) Construir la estructura completa del receptor humano GPR40 identificando primero la información disponible más adecuada de las estructuras parciales del GPR40.
- b) Proponer regioisómeros específicos de los ácidos epoxiecosatrienoicos basados en su actividad antiinflamatoria.
- c) Proponer las estructuras iniciales, es decir antes de iniciar la simulación de dinámica molecular, de los complejos formados por los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs) y el receptor GPR40 (EET/GPR40) utilizando métodos computacionales.
- d) Utilizar la técnica de simulaciones atomísticas de dinámica molecular para estudiar a nuestros sistemas GPR40/APO y GPR40/ligantes bajo condiciones fisiológicas.
- e) Analizar las interacciones EETs-GPR40 más relevantes, así como las posibles consecuencias conformacionales que los ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs) producen en el receptor tras las interacciones resultantes de las simulaciones de dinámica molecular.

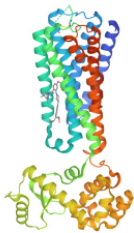
6. Diagrama de trabajo



7. Metodología

7.1 Búsqueda de Información en PDB

Se realizó la búsqueda de información sobre el receptor acoplado a proteína G en la base de datos denominada *Protein Data Bank* (PDB) donde se identificaron varias estructuras del receptor GPR40 y se eligieron las estructuras con los códigos 5TZY, 5TZR, 5KW2 y 4PHU, siendo la 4PHU y 5KW2 como las estructuras idóneas para continuar nuestra investigación. Cabe notar que ninguna de las estructuras disponibles tiene la estructura completa del receptor GPR40 humano (300 aa).



5KW2

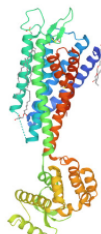
[Download File](#) [View File](#)

The extra-helical binding site of GPR40 and the structural basis for allosteric agonism and incretin stimulation

Ho, J.D., Chau, B., Rodgers, L., Lu, F., Wilbur, K.L., Otto, K.A., Chen, Y., Song, M., Riley, J.P., Yang, H.-C., Reynolds, N.A., Kahl, S.D., Lewis, A.P., Groshong, C., Madsen, R.E., Connors, K., Linswala, J.P., Gheyi, T., Saflor, M.D., Lee, M.R., Benach, J., Baker, K.A., Montrose-Rafizadeh, C., Genin, M.J., Miller, A.R., Hamdouchi, C.

(2018) Nat Commun **9**: 1645-1645

Released	2018-05-02
Method	X-RAY DIFFRACTION 2.76 Å
Organisms	Homo sapiens Tequatrovirus T4
Macromolecule	Free fatty acid receptor 1, Lysozyme, Free fatty acid receptor 1 (protein)
Unique Ligands	6XQ



4PHU

[Download File](#) [View File](#)

Crystal structure of Human GPR40 bound to allosteric agonist TAK-875

Srivastava, A., Yano, J.K., Hirozane, Y., Kefala, G., Snell, G., Lane, W., Gruswitz, F., Ivetac, A., Aertgeerts, K., Nguyen, J., Jennings, A., Okada, K.

(2014) Nature **513**: 124-127

Released	2014-07-16
Method	X-RAY DIFFRACTION 2.332 Å
Organisms	Homo sapiens Tequatrovirus T4
Macromolecule	Free fatty acid receptor 1, Lysozyme (protein)
Unique Ligands	1PE, 2YB, DMS, OLC

Figura 14: Estructuras del GPR40 humano encontradas en la base de datos del *Protein Data Bank*.

7.2 Obtención y optimización del PDB 4PHU y 5KW2

En el *protein Data Bank* se obtuvo el archivo en formato PDB con el ID 4PHU que contiene la estructura del receptor GPR40 cocrystalizada con el ligando TAK-875 que fue resuelta por cristalografía de rayo X. Posteriormente se preparó la estructura del receptor GPR40 removiendo tanto los ligandos con los cuales la proteína fue resuelta, como las moléculas de agua y residuos propios del proceso de cristalización. Por otra parte, se compararon las secuencias de los cristales resueltos de las diversas estructuras utilizadas (5TZY, 5TZR, 5KW2) y con ello se observó que existían segmentos de la proteína que no estaban resueltos. Así, se utilizó la estructura depositada en el PDB 5KW2 como la base de la construcción del receptor GPR40 completo mientras que las otras estructuras se utilizaron para complementar diferentes fragmentos faltantes en la estructura 5KW2 (ver figura 15 B).

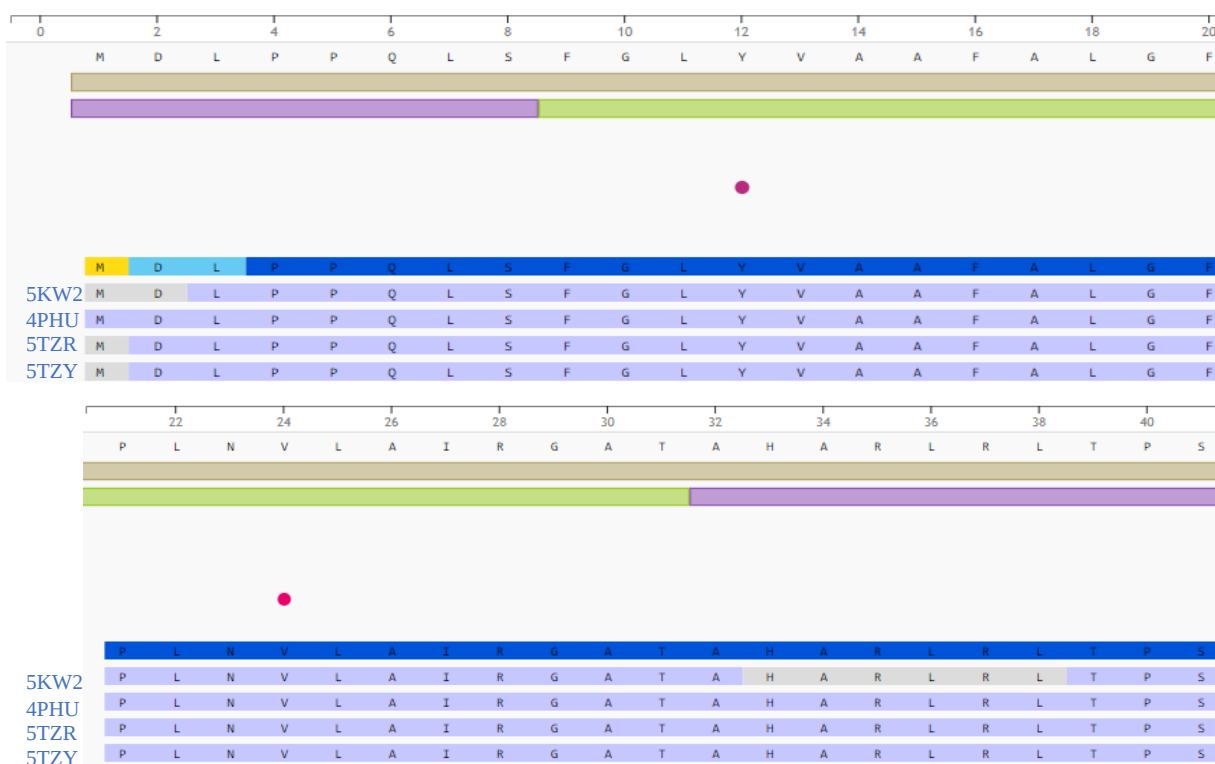


Figura 15 A: Secuencias de las diferentes estructuras del receptor GPR40 disponibles en *Protein Data Bank*, en dichas figuras se puede observar su secuencia estructural en la cual en color gris se muestran los pequeños fragmentos de los residuos faltantes en algunos de los cristales resueltos.

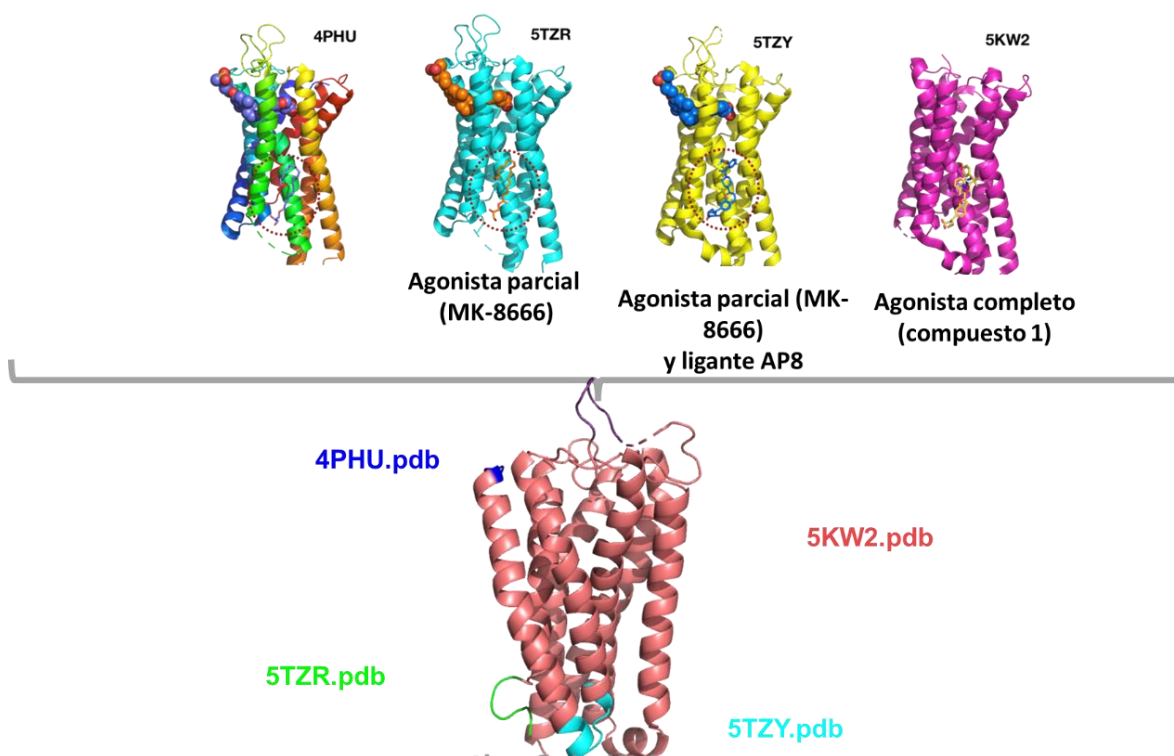


Figura 15 B: Ilustración que muestra a los diferentes cristales usados del Protein Data Bank para modelar los fragmentos faltantes de nuestra plantilla base que fue el GPR40 con el ID 5KW2, la estructura usada como plantilla se muestra en color rosa salmon, mientras que en diferentes colores se muestran los fragmentos faltantes que se modelaron.

7.3 Obtención de los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

Posteriormente se obtuvieron las estructuras de los ácidos epoxieicosatrienoicos con la configuración 14R, 15S-EET y el 14S, 15R-EET de una base de datos curada de compuestos comercialmente disponible llamada ZINC15. Estos dos regioisómeros de los EETs fueron elegidos debido a que son los predominantemente producidos por las enzimas CYP2C y la CYP2J. Aunado a los compuestos 14R, 15S-EET y el 14S, 15R-EET, también se obtuvo la estructura de ligando agonista conocido del receptor GPR40, el ácido gamma linoleico. Como se mencionó anteriormente, las estructuras de los 3 compuestos se obtuvieron de la base de datos ZINC15 (Sterling & Irwin, 2009) en el formato mol.2. Dicho formato es necesario para poder adecuar los parámetros del campo de fuerza de CHARMM36 a dichos compuestos.

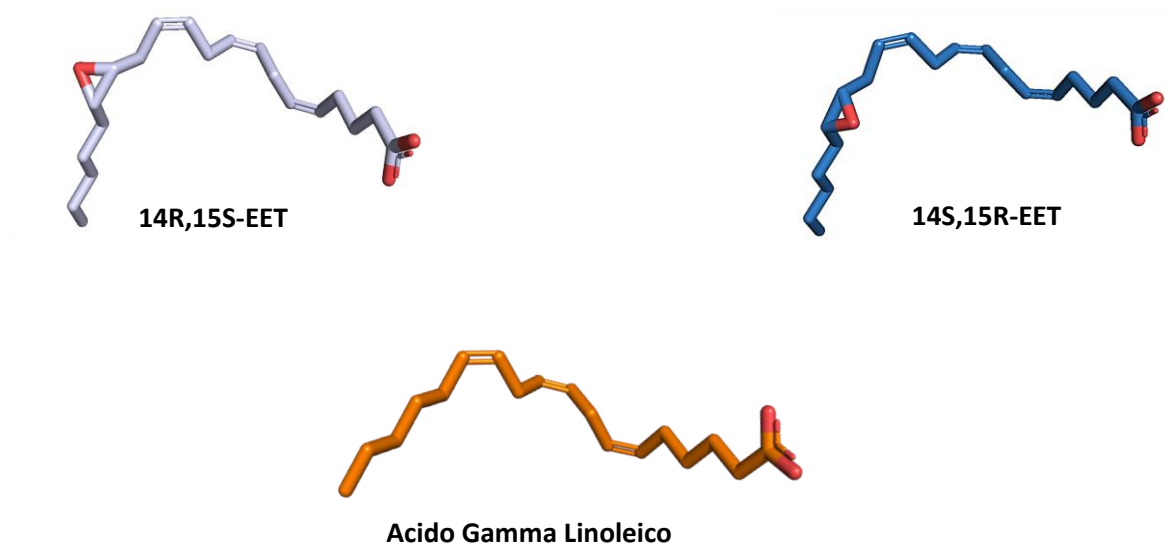


Figura 16: En esta figura se muestra los EETs con el grupo epóxido en la posición que esta entre el carbono 14 y 15 tanto en configuración RS como SR. En color naranja figura el ácido gamma linoleico el cual es agonista endógeno conocido del GPR40.

El programa VMD (*Visual Molecular Dynamics*) se utilizó para crear los archivos de topología y de coordenadas tanto de la proteína, como de los ligandos de interés. Además de las cargas parciales de cada átomo, el archivo de topología contiene la conectividad de los sistemas moleculares, la cual es fundamental para poder utilizar la técnica de simulaciones clásicas de dinámica molecular. Los archivos de topología se obtienen en formato PSF mientras que los archivos de coordenadas en formato PDB. El campo de fuerza utilizado para todos los átomos, incluidos aquellos que constituyen a la proteína y a los ligandos, fue el campo de fuerza de CHARMM36. El protocolo se realizó de manera independiente para cada uno de los ligandos.

7.4 Modelado de la membrana, agregar moléculas de agua, iones y crear PSD del sistema.

Se modeló la membrana celular utilizando el programa VMD utilizando el fosfolípido POPC. Después de combinar a la proteína (receptor GPR40) y a la bicapa lipídica, se agregaron moléculas de agua y iones, para así generar los archivos finales en formato PSF (topología) Y PDB (coordenadas) del sistema completo (ver figura 17). Dicho sistema contiene al receptor GPR40 embebido en una capa lipídica (POPC) hidratada y ionizada. Dicho sistema se denominó como sistema APO.

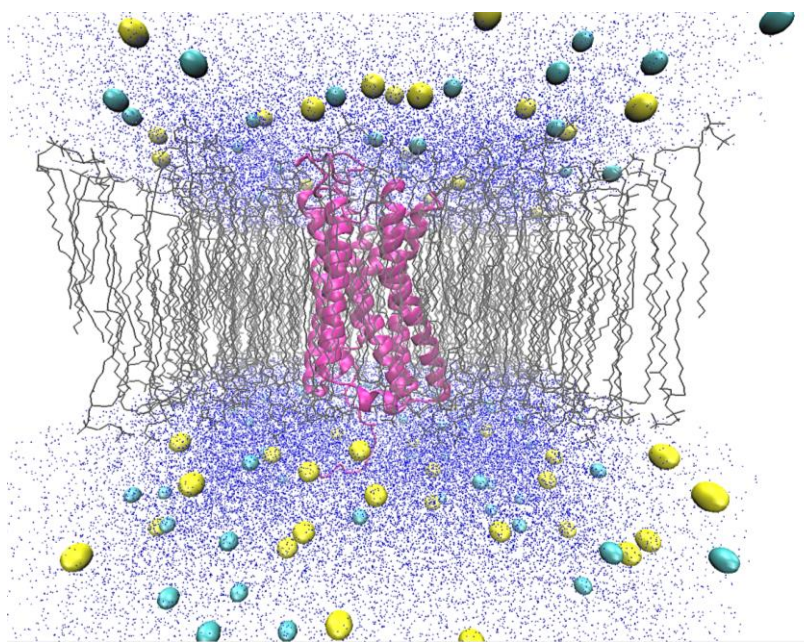
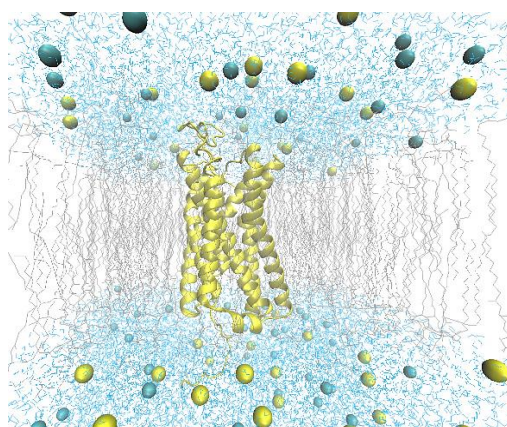


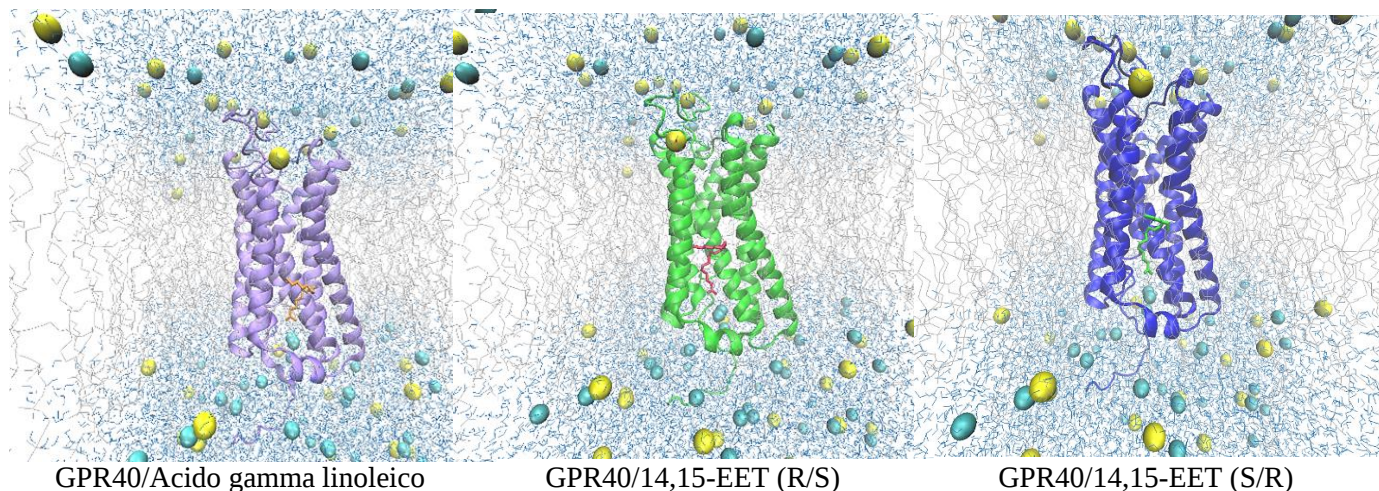
Figura 17: Imagen del sistema completo creado en el programa conocido como VMD. En esta imagen el GPR40 se muestra en color rosa, el agua en azul, iones en cian y amarillo y lípidos de membrana en color gris.

7.5 Juntar el ligando en el sistema y creación de los archivos PSF y PDB

Posteriormente con el programa conocido por sus siglas como VMD, se usó para integrar al sistema APO con cada uno de los ligandos, es decir, se agregó el ácido gamma linoleico y los EETs, 14R, 15S-EET y 14S, 15R-EET. Para así crear cada uno de los tres sistemas adicionales, (1) GPR40/ácido gamma linoleico, (2) GPR40/14,15-EET (R/S) y (3) GPR40/14,15-EET (S/R), se generó un archivo PDB y PSF, los cuales son indispensables para realizar posteriormente la simulación de dinámica molecular de los sistemas. Así, los sistemas generados fueron cuatro, el sistema que solo contiene la proteína nombrada GPR40-APO el cual tendrá función de un control de las conformaciones inactivas del receptor, el sistema GPR40/14,15-EET (R/S) así como el sistema GPR40/14,15-EET (S/R) y por último el sistema GPR40/ácido gamma linoleico.



GPR40 APO



GPR40/Ácido gamma linoleico

GPR40/14,15-EET (R/S)

GPR40/14,15-EET (S/R)

Figura 18: Imagen de los cuatro sistemas creados con el programa VMD en el cual en el sistema GPR40 APO no tiene un ligante, mientras que el resto de los sistemas tienen a uno de los ligantes como se observa en la imagen.

7.6 Ingreso al super cómputo para realizar las Simulaciones de Dinámica Molecular

Una vez generado los archivos necesarios para los cuatro sistemas a investigar, es decir el sistema APO, los dos sistemas GPR40/14,15-EET (R/S) y GPR40/14,15-EET (S/R), así como el sistema GPR40/ácido gamma linoleico, se ingresó al súper cómputo para realizar los cálculos de la simulación de dinámica molecular, la cual tuvo una duración de 2.0 μ s, es decir 2000 nanosegundos. Para obtener los 2000 nanosegundos de simulaciones de cada uno de los sistemas utilizando un tamaño de paso de 2.0 femtosegundos, se requirieron en promedio 11-12 meses de uso continuo de los equipos de supercómputo.

7.7 Analizar las interacciones de la DM y comparar resultados con el ácido gamma linoleico

Durante y al final de la culminación de las diferentes trayectorias generadas a partir de los cálculos de simulaciones de dinámica molecular, se realizó análisis visual de los diferentes sistemas. Posteriormente se realizaron varios análisis numéricos para obtener información cuantitativa sobre las interacciones resultantes relevantes (a través de distancias), la estabilidad global del receptor and el ambiente fisiológico (a través del cálculo de la raíz cuadrática media de las distancias; RMSD), la estabilidad estructural (fluctuaciones) de segmentos específicos (a través del cálculo de la raíz cuadrática media de las fluctuaciones; RMSF) y los cambios en la estructura secundaria de diferentes regiones. Aunado a esto, se analizaron las consecuencias conformacionales en el receptor GPR40 debidas a la presencia de los dos ácidos epoxiecosatrienoicos seleccionados y del ácido gamma linoleico, el cual es considerado un ligando agonista de GPR40.

8. Resultados

El primer resultado generado es la obtención del receptor GPR40 completo el cual se modeló a partir de los cristales, en formato PDB, disponibles del GPR40 en la base de datos *Protein Data Bank*. La figura 19 muestra al receptor completo, resultado del modelamiento de los pequeños fragmentos faltantes. Además de las estructuras disponibles de GPR40, la figura 19 muestra en distintos colores los fragmentos que hacían falta en el cristal que se usó de plantilla, principalmente (5KW2.pdb). Es importante tener un receptor completo ya que de esta manera los resultados de las simulaciones de dinámica molecular podrán mostrar cambios conformacionales y estructurales en todas las regiones, incluidas tanto las de la región N-terminal y C-terminal, así como todos los *loops* intracelulares y extracelulares.

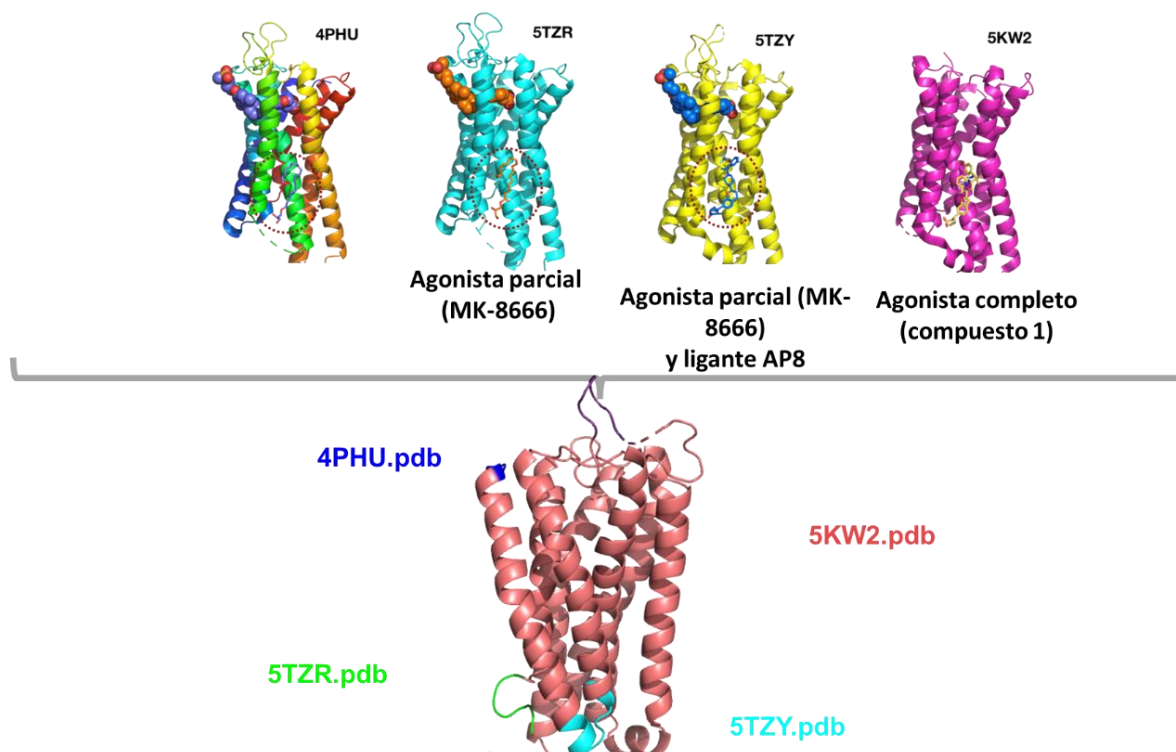


Figura 19: Estructura completa del receptor acoplado a proteínas G número 40 de humano modelado a partir de las estructuras disponibles en *Protein Data Bank*.

Una vez obtenido el GPR40 humano completo se hizo la selección de los ácidos epoxiecosatrienoicos. En este contexto, de acuerdo con diversas investigaciones por Campbell y colaboradores, el regio isómero EET-14,15, presenta una mayor actividad biológica, mostrando efectos antiinflamatorios en endotelio y corazón, mejorando así la condición de ratas con afecciones cardiovasculares (Campbell et al., 2017). Por esa razón para poder realizar este estudio de simulaciones de dinámica molecular propusimos el ácido epoxiecosatrienoico con el grupo epóxido entre el carbono 14 y 15 tanto en configuración “R” como “S” (Véase la figura 20). Así, se obtuvieron las estructuras tridimensionales de dichas moléculas en el formato mol2, el cual contiene la información necesaria para obtener los archivos que se necesitan y así poder integrar dichas moléculas al sistema macromolecular de estudio.

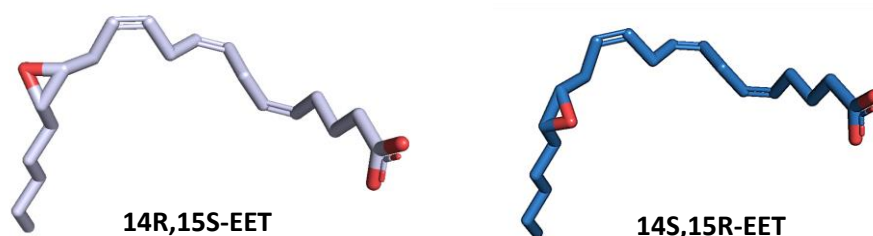
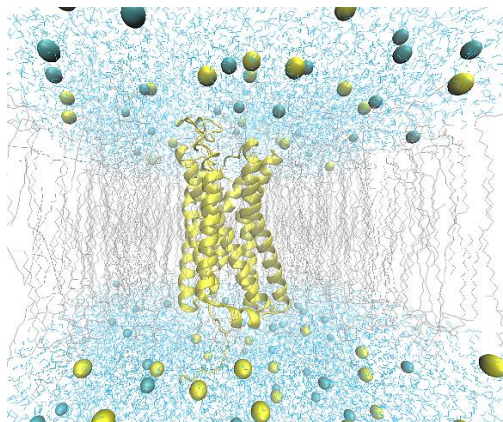


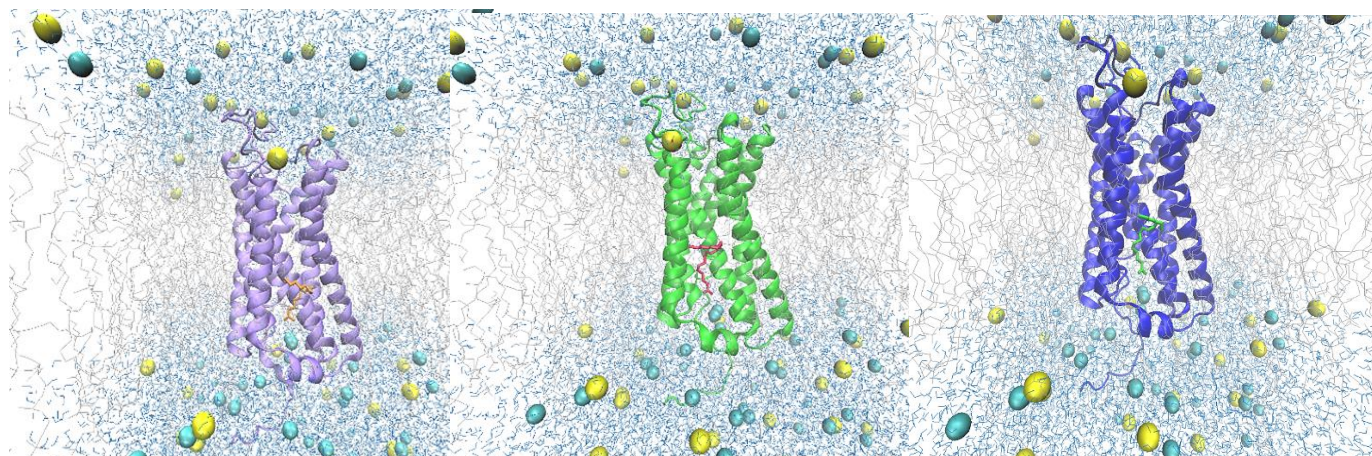
Figura 20: Estructura tridimensional de los ácidos epóxiecosatrienoicos seleccionados para usarlos como ligantes en nuestra simulación de dinámica molecular.

De manera final para poder realizar la simulación de dinámica molecular se realizó el modelamiento completo de los sistemas GPR40/APO, GPR40/ácido gamma linoléico, GPR40/EET(R/S) y GPR40/EET (S/R), los cuales en la figura 21. Dicha figura muestra a los cuatro sistemas resultantes en condiciones fisiológicas, es decir con los fosfolípidos de membrana que contienen al receptor, el agua que solvata tanto al receptor como a la membrana y por ultimo los iones de Cl^- Na^+ que están en una concentración de 0.15 molar. Los archivos de estos sistemas contienen la información de los átomos en el espacio, el cual está dado por el formato PDB, así como la conectividad de cada uno de ellos (topología), la cual se encuentra depositada en el archivo denominado PSF. Ambos archivos son indispensables para que pueda ejecutarse correctamente la simulación de dinámica

molecular. Sin estos archivos no es posible calcular las trayectorias propias de las simulaciones clásicas de dinámica molecular.



GPR40 APO



GPR40/Acido gamma linoleico

GPR40/14,15-EET (R/S)

GPR40/14,15-EET (S/R)

Figura 21: Imagen de los cuatro sistemas creados en el cual en el sistema GPR40 APO no tiene un ligante, mientras que el resto de los sistemas tienen los ligantes objetivos de estudio.

Antes de iniciar el análisis de los resultados de las simulaciones de dinámica molecular se, realizó un análisis preliminar en el cual se generó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los cuatro receptores de ácidos grasos libres de humano, es decir del GPR120 (FFAR4), GPR40 (FFAR1), GPR43 (FFAR2) y GPR41(FFAR3) para determinar la conservación del motivo estructural E/DRY, que se encuentra localizado en la región intracelular y que se ha demostrado como de gran importancia en la activación de esta familia de receptores. De acuerdo con la nomenclatura de Ballesteros-Weinstein, está localizado en las siguientes posiciones: **E/D^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}**. Encontramos resultados interesantes, como se observa en la figura 22, donde se puede ver que en el caso del GPR40 (FFAR1) el motivo estructural está formado por la triada **G^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}** (Glicina, Arginina y Tirosina coloreado en amarillo) mientras que en el caso del receptor GPR120 (FFAR4), el motivo estructural es **E^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}** (ácido glutámico, Arginina, Metionina, coloreado en cian). El cambio de identidad en la posición **3.49** entre la glicina del GPR40 y ácido glutámico del GPR120 se encuentra en proximidad del sitio alostérico 2 de unión a ligandos y por lo tanto podría generar diferencias significativas entre ambos receptores y su capacidad por unirse a diferentes ligandos. Es decir, ligandos con grupos carboxilato podrán tener una mayor posibilidad de unirse al sitio alostérico 2 del GPR40 que del GPR120, ya que la presencia de un residuo cargado negativamente como el ácido glutámico en la posición **E^{3.49}** del GPR 120, crearía una repulsión electrostática. Véase la figura 23 para observar la comparación del motivo estructural del sitio alostérico número dos del GPR40, donde el motivo se constituye por los aminoácidos **G^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}** y el motivo estructural del receptor del GPR120 que está formado por la triada **E^{3.49}R^{3.50}M^{3.51}**. Este resultado es un punto importante para tomar en cuenta ya que la cadena lateral del residuo de glicina ocupa un menor espacio que la correspondiente cadena del residuo de glutamato. Aunado a esta diferencia de volumen, la presencia de una carga negativa en la cadena lateral en el caso del GPR120, podría desfavorecer la interacción del grupo carboxilato de un ácido graso libre para unirse en esta región del receptor debida a la ya mencionada repulsión carga-carga.

GPR120	FFAR4_HUMAN	VMTLSGSVTILTLAAVSL ERY VCIVHLQRGV--RGPGRRARAVLLALIWGYSAVAALPLC	174
GPR40	FFAR1_HUMAN	AHFFPLYAGGGFLAALS AGRY LGAAFPLGYQAFRRPCYS--WGVCAAIWALV-----LC	136
GPR42	FFAR2_HUMAN	GFYSSIYCSTWLLAGIS ERY LGVAFFPVQYKLSRRPLYG--VIAALVAWVMS-----FG	139
GPR41	FFAR3_HUMAN	IFFTTIYLTALFLAAVSI ERY FLSVAHPLWYKTRPRLGQA--GLVSVACWLLA-----SA	145

Figura 22: Alineamiento de secuencias realizada en Clustal Omega de los diferentes receptores de ácidos grasos libres conocidos hasta ahora. En esta imagen en colores se resalta el motivo E/DRY conservado en la clase A de los GPCR.

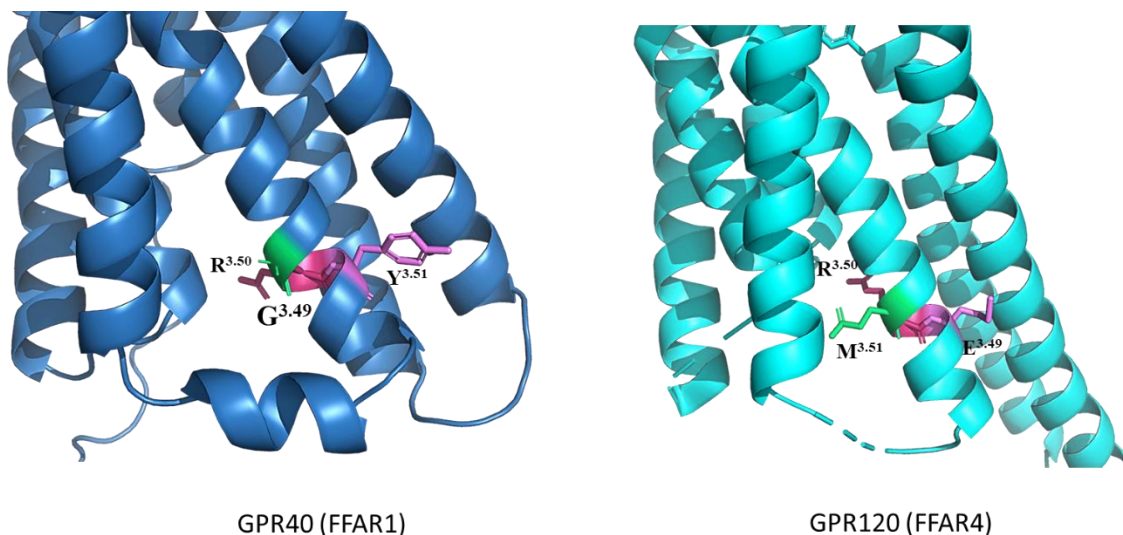


Figura 23: Comparación del motivo G3.49 R3.50 Y3.51 del GPR40 con el E3.49 R3.50 M3.51 de GPR120.

Posteriormente también se realizó un alineamiento en el servidor Clustal Omega (Sievers et al., 2011), pero esta vez con las secuencias del receptor GPR40 tanto en mamíferos como en reptiles y anfibios (véase figura 24) con la finalidad de observar la conservación del motivo **G^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}**, cercano al sitio alostérico 2 de unión a ligandos. En el alineamiento pudimos observar que todos los mamíferos y los anfibios conservan el motivo **G^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}**, sin embargo, únicamente en el caso de las serpientes que provienen de un ancestro en común diferente, existe un cambio en el residuo de Tirosina (**Y^{3.51}**) por el residuo de Fenilalanina (**F^{3.51}**); dicho cambio es mínimo ya que ambos residuos pertenecen al grupo de aminoácidos aromáticos y esta mutación evolutiva no compromete la interacción de ligandos en este sitio de unión.

Mouse	-----MDLPPQLSFALYVSAFALGFPLNLLAIRGAVSHAKLRITPSLVYTLHLGCS	52
Gorilla	-----MDLPPQLSFGLYVAAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRITPSLVYALNLGCS	52
Humano	-----MDLPPQLSFGLYVAAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRITPSLVYALNLGCS	52
Chimpance-H2QG25	-----MDLPPQLSFGLYVAAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRITPSLVYALNLGCS	52
Elefante	-----MDLPPQLFFALYVTAFAFGFPLNVLVIRSAASHARLRITPSLVYALHLGCS	52
Delfin	-----MHLPPQLSFALYMAAFALGFPLNALAIAGAVSHARLRITPSLVYALHLGCS	52
Canis	-----MDLPPQLFFALYVAAAFALGFPLNILAIGGAVSHARLRITPSLVYALHLGFS	52
Rana	VAPNPGHVKMLVDNLLAVYVLTIFLGLPSNIMVLYLFFKEARSRLTPNLIYMINLCVSD	60
Tortuga	-----MDPLDTLALAVYSVTILGLPANALVLYIFYSRARTRLTNPNIYMINLCVSD	52
Cobra	-----MAIWETISLVVYGATILLGLPSNILALYIFYCRARIRLTNPNIYMINLCVSD	52
Serpiente	-----MAIWEIISLVVYGATILLGLPSNILALYIFYCRARIRLTNPNIYMINLCVSD	52
	: : * : : * * * : : : . * : * * * . * : * * *	
Mouse	LLLAITLPLKAVEALASGAWPLPLPFCPVFALAHFAPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Gorilla	LLLTVSLEPLKAVEALASGAWPLPASLCPVFAVAHFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Humano	LLLTVSLEPLKAVEALASGAWPLPASLCPVFAVAHFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Chimpance-H2QG25	LLLTVSLEPLKAVEALASGAWPLPASLCPVFAVAHFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Elefante	LLLAVSLPLKAVEALAEAGAWLLPAALCPVFAVAHFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Delfin	LLLATSLPLKAAEALAGGAWPLPASLCPAFALVHFAPLYAGAGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Canis	LLLAASLEPLKAVEALAGAWPLPAFLCPAFALAHFAPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPF	112
Rana	LVFIMVLPKIKIIEIF- SSTWTLPQILCPLYNLHIFSTIYASVCFLSAVSVGRYLGSTAFFP	119
Tortuga	LAFVLILPLKILEVV- PPGWSPPNFCLCPLYSLAHFGTLYASTCFLTAVSAGRYLGAAFPF	111
Cobra	LVFILFLPLKMLEKG- KMDWTMPGFLCPLYNLHIFGTIYTSACFLTAVSAGRYLGAVYPL	111
Serpiente	LVFILFLPLKMLEKG- KMDWTMPGFLCPLYNLHIFGTIYTSACFLTAVSAGRYLGAVYPL	111
	* : * * * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
Mouse	GYQAIRRPRYSWGVCAIWMALVLCGLGLALGLETSGLSGLNDNSTSSLGINIPVNGSPVCLE	172
Gorilla	GYQAFRRPCYSWGVCAAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWLDHNSNTSLGINTPVNGSPVCLE	172
Humano	GYQAFRRPCYSWGVCAAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWLDHNSNTSLGINTPVNGSPVCLE	172
Chimpance-H2QG25	GYQAFRRPCYSWGVCAAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWLDHNSNTSLGINTPVNGSPVCLE	172
Elefante	GYQAIRRPRYSWGVCAAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWMDNATSSLGISTPVNGSPVCLE	172
Delfin	GYQAARRPRYSWGVCAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWLDNTTSSLGISTPVNGSPVCLE	172
Canis	GYQAARRPRYSWAVCAAIWMALVLCGLGLVFGLEAPGGWVDNTTSSLGINTPVNGSPVCLE	172
Rana	KYNIYKKPRYSCLVVCILMVIVIFHMAFVFLVETSSQNG---SIALFL-TNHDNTWLCYE	174
Tortuga	RYQLYKKPLYSCVCAIWMTLVAFHGIILLILETSLGA---NATLFT-GN---GTACYQ	163
Cobra	HYQAYKKPCYSCLVSVGIWSLVGFHGVLLFALETSRDT---NSSLFA-GN---SSSCYH	163
Serpiente	HYQAYKKPCYSCLVSVGIWSLVGFHGVLLFALETSRDT---SSSLFA-GN---SSSCYH	163
	* : * * * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
Mouse	AWDPD---SARPARLSFSLILFFLPLVITAFICYVGCRLRALVRSGLSHRKLRAAWVAGGA	229
Gorilla	AWDLA---SAGPARFSLSLILFFLPLAITAFICYVGCRLRALAHSGLTHRRKLRAAWVAGGA	229
Humano	AWDPA---SAGPARFSLSLILFFLPLAITAFICYVGCRLRALARSGLTHRRKLRAAWVAGGA	229
Chimpance-H2QG25	AWDPA---SAGPARFSLSLILFFLPLAITAFICYVGCRLRALAHSGLTHRRKLRAAWVAGGA	229
Elefante	AWDPT---LAGPARFSLSLILFFLPLTITAFICYVGCVRALAHSGLSHRKLRAAWVAGGA	229
Delfin	AWDPA---SAGPARFSLSLILFFLPLVITAFICYVGCRLRALARSGLSHRKLRAAWVAGGA	229
Canis	AWDPA---SAGPARLTLSLILFFLPLTITAFICYVGCRLRALARSGLSHRKLRAAWVAGGA	229
Rana	NFTSEQLALVVPVRFEISIVLYFFPLAITLFCYVSCIRILMRSRMHVNLKRAAMRVAVTT	234
Tortuga	EFSEQLALLAVPVRLELSVALFFLPLVITVFCYAGCIHVLIKSLHEQKRRRAVRALAT	223
Cobra	NFSEDQLALLVPVRLELSVILFFLPLITAFICYAGCIRVLVGSHLHLRKKRRRAVRVAVAT	223
Serpiente	NFSEDQLALLVPVRLELSVVLFFLPLITAFICYAGCIRVLVGSHLHLRKKRRRAVRVAVAT	223
	: * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
Mouse	LLTLLCLGFPYNASNVASFIPNDLGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGTGPGRGTC	289
Gorilla	LLTLLCLGFPYNASNVASFIPNLDGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGRGPGKTV	289
Humano	LLTLLCLGFPYNASNVASFIPNLDGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGRGPGKTV	289
Chimpance-H2QG25	LLTLLCLGFPYNASNVASFIPNLDGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGRGPGKTV	289
Elefante	LLTLLCLGFPYNASNVAGFLRPDMGGGWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGGGTGQWVAC	289
Delfin	LLTLLCLGFPYNASNVAGFLHPSIGGCWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGGGTGRGTTR	289
Canis	LLTLLCLGFPYNASNVAGFLRPDIGGCWRKLGLITGAWSVVLNPLVLTGYLGGGTGRVTSV	289
Rana	LVVFIVCFAPYINISHVVGFIHGE-SVMWRKMALEPSTCNAFDLPLIFYFLSSAMDQGFYH	293
Tortuga	LSVFVLCFPGYNLSHVVGFIHGE-DVMWRRTVALLPGACNAFLDPLIFYFLSSAKDHGLAW	282
Cobra	LSVFVLCFPGYNLSHVVGFIHGE-DVMWRRTVALLPGACNAFLDPLIFYFLSSAVDDGIVQ	282
Serpiente	LSVFVLCFPGYNLSHVVGFIHGE-DVMWRRTVALLPGACNAFLDPLIFYFLSSAMDDGIVQ	282
	* : * * * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *	
Mouse	VTRTQRGTIQK-----	300
Gorilla	AARTQGGKSQK-----	300
Humano	AARTQGGKSQK-----	300
Chimpance-H2QG25	AARTQGGKSQK-----	300
Elefante	VAKMQEMTSQK-----	300
Delfin	GAATKGGGSQK-----	300

Figura 24: Alineamiento realizado en Clustal Omega donde se muestra las secuencias del GPR40 en distintas especies de animales, en dichas secuencias se observa lo alto que es la conservación de la estructura y del motivo estructural GRY en las distintas especies animales.

Finalmente se realizó un árbol filogenético utilizando el servidor Clustal Omega para observar cómo cada uno de estos grupos evolucionaron. En la figura 25 se observa que todos los mamíferos provienen del mismo ancestro en común, mientras que los anfibios, reptiles y serpientes provienen de un ancestro en común diferente. Los resultados anteriores de los organismos vivos analizados sugieren que la conservación del motivo estructural **G^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51}** en el receptor GPR40 debe ser importante en la función del receptor ya que existe una presión evolutiva importante para mantenerlo.

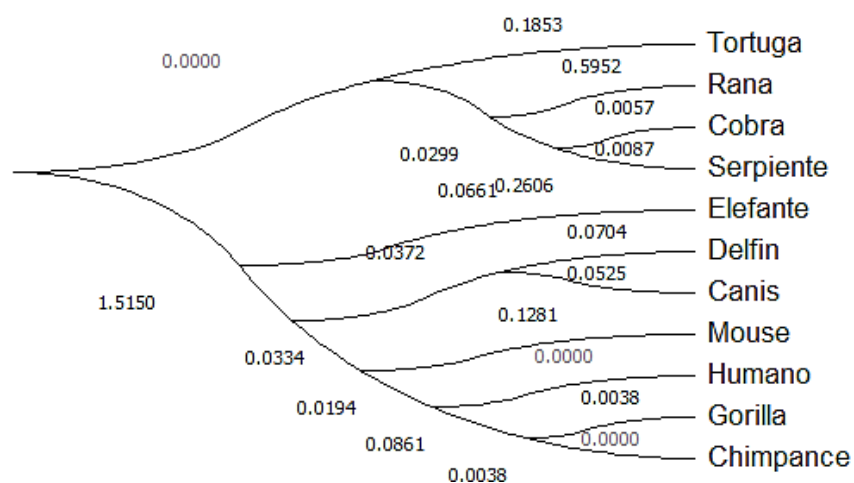


Figura 25: Árbol filogenético obtenido de Clustal Omega donde se muestra la evolución del GPR40 entre las diferentes especies de los animales seleccionados.

8.1 Gráficos de RMSD

Para los sistemas GPR40-APO, GPR40/ácido gamma linoleico, GPR40/14,15-EET (R/S) y GPR40/14,15-EET (S/R), el primer análisis cuantitativo realizado estuvo relacionado con los gráficos de la desviación cuadrática media, conocido por sus siglas en inglés como RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Para este análisis se tomó en cuenta solo los átomos pesados (no hidrógenos) de la cadena principal de los residuos de las hélices transmembranales. El análisis de RMSD tiene como objetivo considerar el comportamiento global del receptor en condiciones fisiológicas a la largo de la trayectoria de la simulación. Tal comportamiento es usualmente utilizado para considerar un equilibrio estructural del sistema protéico. Así, se tomaron en cuenta solo los átomos de las hélices transmembranales ya que los bucles, tanto intracelulares como extracelulares, tienen movimientos más libres por lo cual daría resultados más dispersos sobre el estado de la estructura principal del receptor (las siete hélices transmembranales). Por otra parte, cabe mencionar que el sistema APO (sin ligante) sirve como un control y referencia de las conformaciones inactivas del receptor GPR40 mientras que el sistema GPR40/ácido gamma linoléico sirve como referencia de conformaciones del receptor en presencia de un ligando agonista. Ambas servirán como punto de comparación contra los sistemas que tienen al receptor GPR40 enlazado a los ligandos ácidos epoxiecosatrienoicos (EETs).

Como se observa en la figura 26, los valores de RMSD del sistema APO, los cuales se muestran en el gráfico A, parecen alcanzar un equilibrio estructural después de los 700 ns a un valor relativo a la estructura inicial de menos de 3 Å, lo cual nos indica que sin presencia de ligante se puede observar el equilibrio del cambio global de la proteína después de los 700 ns. Cabe aclarar que el sistema GPR40-APO fue investigado por 1000 ns mientras que los sistemas con ligando se investigaron con una simulación de 2000 ns. Por su parte, en el caso de los sistemas en presencia de ligandos se observa que alcanzan un equilibrio relativamente pronto, es decir, a los pocos cientos de nanosegundos de haberse iniciado la simulación tal y como se puede ver en los gráficos B, C, y D. En los gráficos mencionados se observa que durante la simulación los valores de RMSD relativamente menores a 3 Å en comparación de la estructura inicial, nos sugiere que la presencia de ligandos agonistas puede hacer que el sistema alcance la estabilidad estructural relativamente rápido y a un valor menor

de RMSD, en contraste de cuando el sistema está en ausencia de un ligante, tal y como se observó en el grafico A del sistema GPR40/APO.

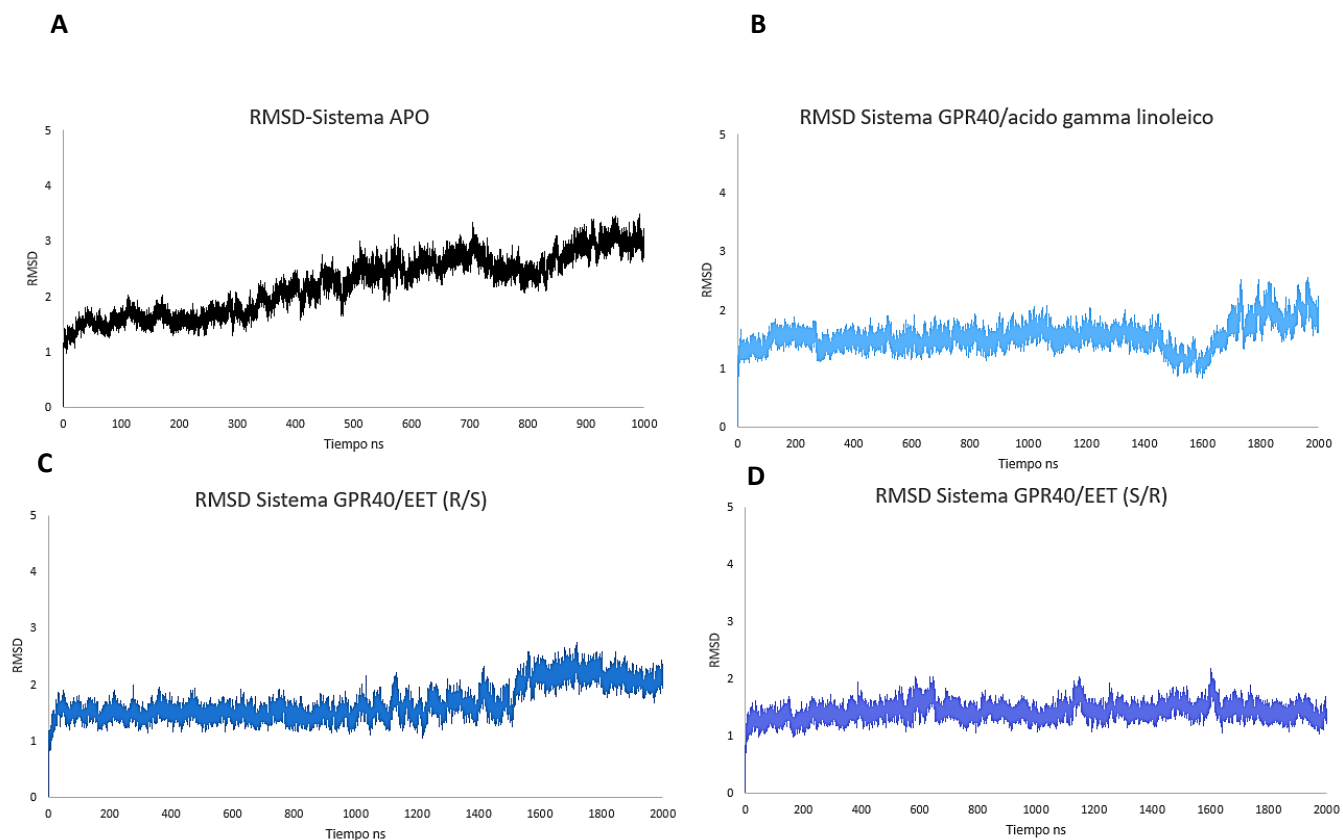


Figura 26: Grafico A muestra el RMSD del sistema APO en el cual el tiempo de simulación de 1000 ns y se estabiliza la proteína en un valor de aproximado de 3 Å, mientras que en los sistemas con ligante (Imágenes B, C y D) con una simulación de 2000 ns, se puede observar que se estabiliza a un valor de RMSD de 1.5 Å al poco tiempo de iniciar la simulación.

8.2 Identificación de los residuos de interés que interactúan con los ligantes

Con base a los antecedentes de los datos experimentales de Yabuki y colaboradores (Yabuki et al., 2013) donde se compara experimentalmente la activación del receptor GPR40, se observó que el compuesto denominado TAK-875 al ser agregado junto con el ácido gamma linoleico (γ -LA; ligando agonista) obtienen resultados que sugieren que ambos ligandos se unen a sitio diferentes. Dicho resultado implicaría que el γ -LA se une en otro sitio distinto al ya identificado por cristalografía para TAK-875, ya que al agregar ambos agonistas se potenciaba la señal de liberación de Ca^{2+} intracelular. Por lo cual con base en esta información y a la información cristalográfica del PDB con el código 5KW2, observamos que los residuos de la cadena lateral que interactúan con el carboxilato de los ligandos serían la Y44, Y114, S123 y R118 (véase figura 27). Este último residuo, R118, mostró interacción directa carga-carga con el carboxilato de los ligandos por lapsos de tiempo durante el análisis de nuestras simulaciones (ver análisis de distancias).

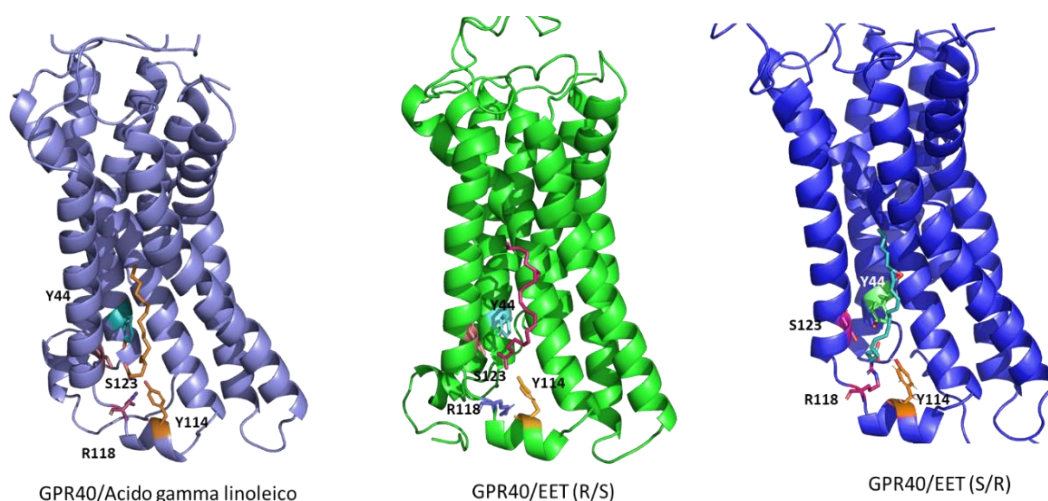


Figura 27: Esta imagen representa los tres sistemas simulados en los cuales se observó que la Y44, Y114, S123 y R118 interactuaban con el carboxilato de los ligantes.

8.3 Gráficos de distancia

Una vez identificado los residuos que interaccionan con el grupo carboxilato (-COO) de los tres ligandos, γ -LA, EET-R/S y EET-S/R, se procedió a obtener las distancias de dichos grupos con los grupos hidroxilo (-OH) de los residuos Y44, Y114 y S123 del receptor. Las distancias se obtuvieron mediante scripts en el lenguaje TCL que fueron ejecutados dentro del programa VMD. Los 100,000 datos resultantes de distancias, correspondientes a 2.0 μ s de simulación, fueron graficados con el programa MS Excel.

Para poder comprender la figura 28 el código de colores indica lo siguiente: los datos graficados en color negro pertenecen a las distancias obtenidas para el ligando γ -LA, los datos graficados en color gris pertenecen al ligando EET-R/S mientras que los datos en color verde pertenecer al ligando EET-S/R. Las gráficas individuales de cada sistema son incluidas en el apéndice A.

El gráfico A de la figura 28 muestra la distancia entre el carboxilato (-COO) de los ligandos con el grupo hidroxilo de la tirosina 44 (Y44). Las distancias de interacción varían entre los 3 Å a los 4 Å para el caso del ligando EET-S/R (línea en color verde). Los valores de distancia muestran lapsos de tiempo relativamente cortos que describen una separación de los dos grupos químicos de entre 5 Å y 6 Å de distancia. Mientras que en el gráfico B se puede observar que el carboxilato de los ligandos se mantiene interaccionando con el grupo hidroxilo de la tirosina 114 y exploran valores de distancia de entre 3 Å a 4 Å. Por su parte, en el gráfico C se muestran las distancias del carboxilato con el hidroxilo del residuo de serina 123 (S123), donde podemos observar que los valores se mantienen entre 3 Å a 4 Å, que asociamos a una interacción estable, siendo el ligando EET-S/R el que se aleja hasta 5 Å por un lapso corto de tiempo.

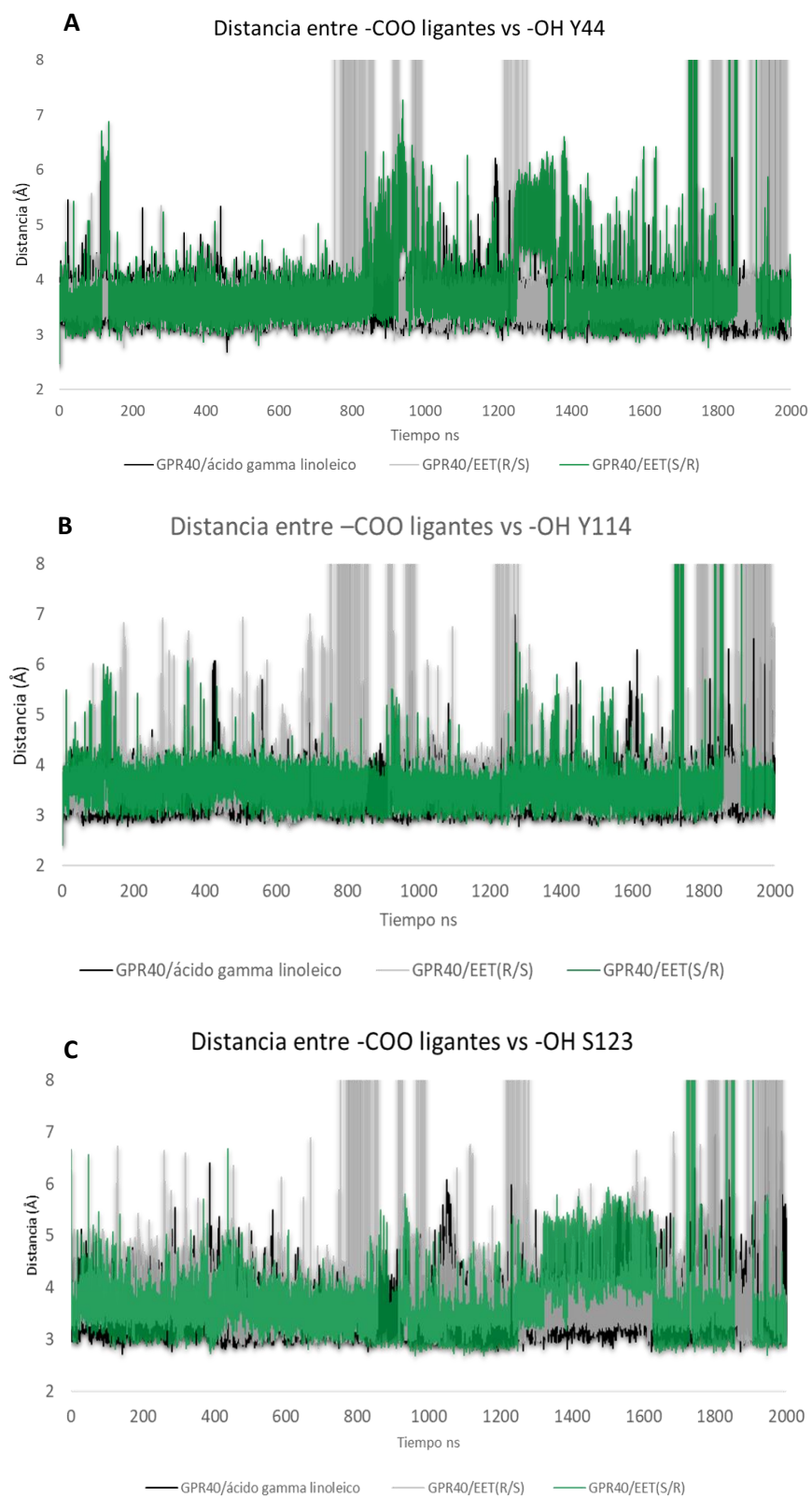


Figura 28: Gráficos de distancias del grupo hidroxilo de la Y44, Y114, S123 contra el carboxilato de los ligantes donde los datos en negro son del ligante γ -LA, en color gris es el EET-R/S y en color verde las distancias del ligante EET-S/R.

Asimismo, se evaluó las distancias entre el carboxilato de los ligandos contra el carbono en la posición Z (CZ) del residuo de arginina 118 (R118), ya que como podemos ver en la figura 29, en el sistema con el ligando EET-S/R, se observan distancias alrededor de 4 Å a partir del nanosegundo 800 que asociamos con interacciones directas carga-carga. En el caso del ligando EET-R/S, aunque se observan acercamientos entre R118 y el grupo carboxilato del ligando, tales acercamientos son poco frecuentes. Un comportamiento similar se observa para el caso de sistema con el ligando agonista, el ácido gamma linoléico. Por último, la figura 30, muestra un análisis de contacto de los ligantes con estos residuos evaluados, donde podemos observar que el EET-S/R durante los 2000 ns de simulación estuvo en contacto el 73% del tiempo con la R118, mientras que el ácido gamma linoleico estuvo en contacto directo el 54% y el EET-R/S el 12% del tiempo de simulación, lo que resume el comportamiento observado en el gráfico de la figura 29. Durante el análisis de contactos se consideró un contacto si cualquier átomo pesado del grupo carboxilato se localizaba a una distancia de contactos a 4 Å de la cadena lateral del residuo R118.

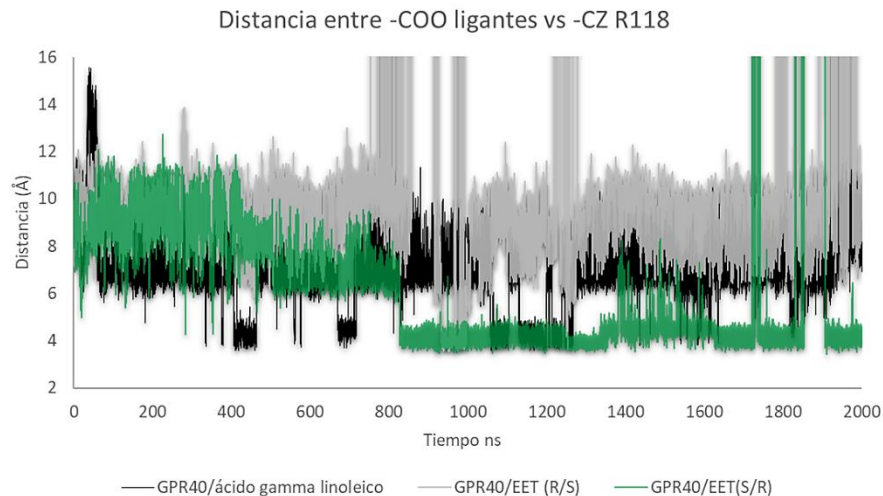


Figura 29: Gráficos de distancias del carbono z (-CZ) R118 con el carboxilato de los ligantes. En verde se muestra el EET-S/R, el cual a los 800 ns se acerca a distancia de 4 Å a 5 Å.

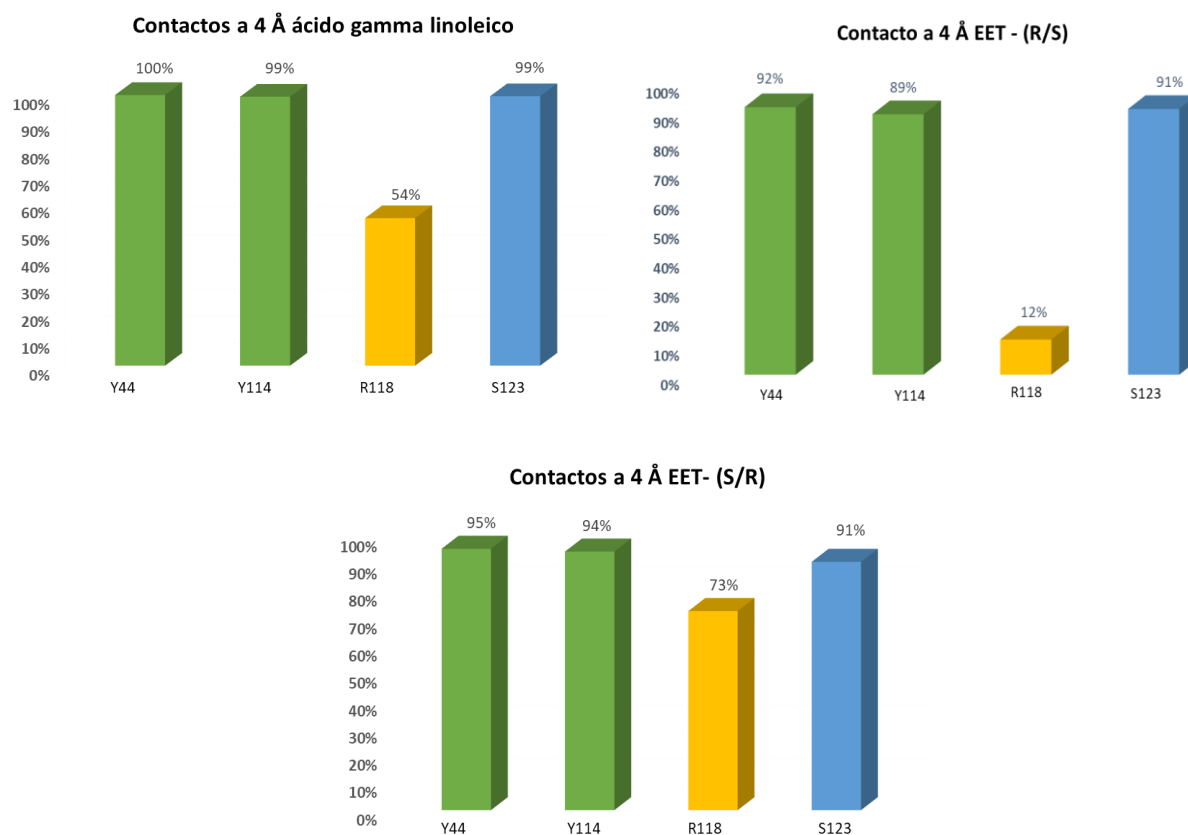


Figura 30: Gráficos del porcentaje de contactos de los residuos Y44, Y114, R118, S12 con los ligantes ácidos gamma linoleico, EET-R/S, EET-S/R.

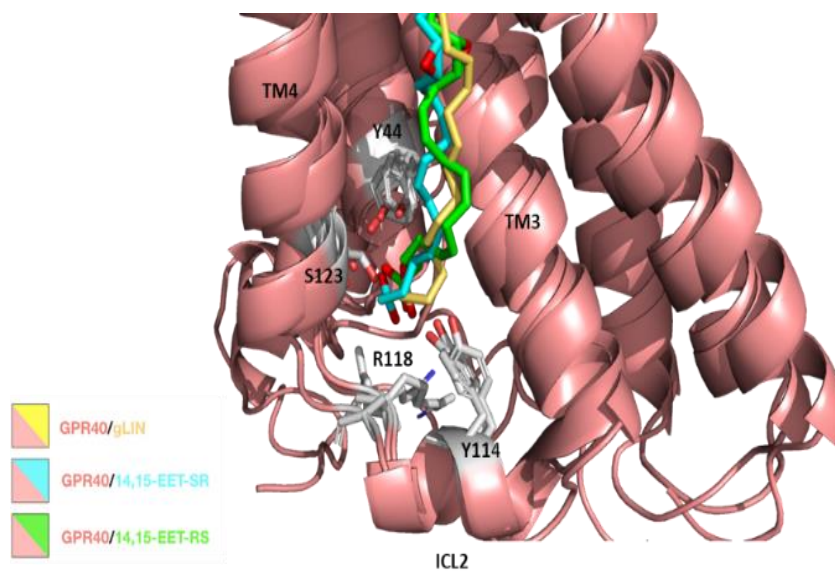


Figura 31: Imagen de la última fase de simulación que representa las interacciones de los ligantes con los residuos identificados en el sitio alostérico número dos.

8.4 Contactos entre los residuos de la cadena lateral que interactúan con los átomos de los ligandos

Para conocer la identidad de los residuos que interactúan con los ligandos se realizó un análisis de contactos, este análisis se encontró como el mejor, ya que la cadena hidrocarbonada es bastante dinámica siendo difícil visualizar en un gráfico de distancias la interacción de los residuos del receptor con los ligandos. Este análisis consistió en obtener los residuos que interactúan a una distancia de 4 Å (y 5 Å) con la cadena hidrocarbonada de los ligandos. Para este análisis se realizó un conteo y solo se consideró relevantes aquellos residuos que contactaban a los ligandos por un porcentaje mayor al 60% de la simulación. Así, de todos los residuos evaluados, utilizando el programa VMD, se obtuvo que los que interactúan con los ligandos a 4 Å de distancia por arriba del 60% son: A102, A99, A98, G95 y I197. Los cuatro primeros se localizan en la transmembrana 3 mientras que el último residuo se localiza en la transmembrana 5. En la figura 32 está la ilustración de donde se encuentran ubicados estos residuos.

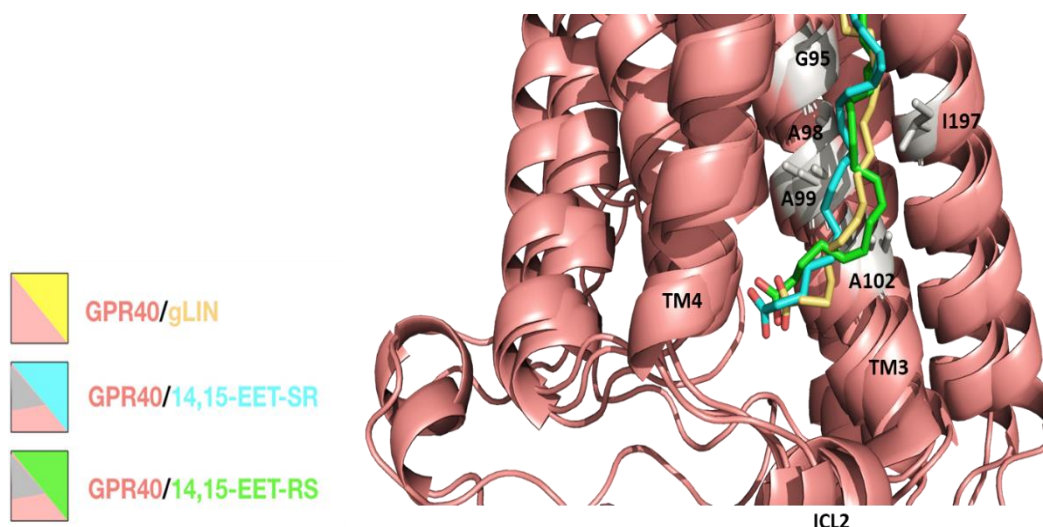


Figura 32: Residuos que interactúan a 4 Å con la cadena hidrocarbonada de los ligandos.

Una vez identificados estos residuos se graficó el porcentaje de veces que contactan los residuos con la cadena hidrocarbonada de los ligantes durante los 2000 ns de simulación. Como podemos observar en la figura 33, de manera general hemos concluimos que la mayoría de los residuos antes mencionados contactan a la cadena hidrocarbonada de los ligandos por arriba del 60% del tiempo. Estas interacciones forman parte de las contribuciones que mantienen estables a los ligantes en el sitio de unión. De manera interesante, el residuo de alanina 98 (A98) e isoleucina 197 (I197), contactan con la cadena hidrocarbonada del EET-S/R, pero no con la correspondiente contraparte del ácido gamma linoleico y del EET-R/S. Detalles son la relevancia de dicho resultado en la selectividad del receptor serán retomadas posteriormente.

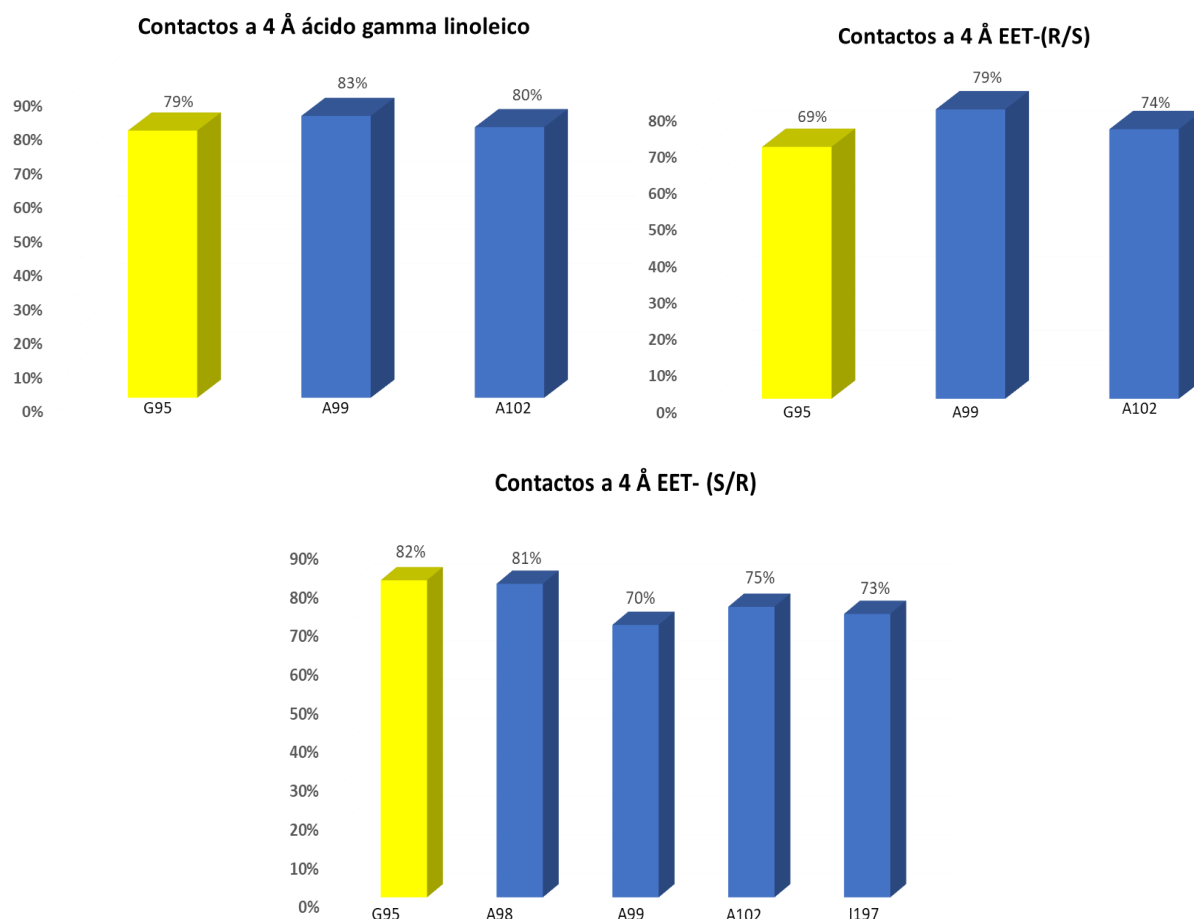


Figura 33: Gráficos que muestran el porcentaje de los contactos a 4 Å de los residuos con la cadena hidrocarbonada de los ligantes.

De igual manera se evaluaron los contactos utilizando 5 Å como la definición de contacto. De acuerdo con la figura 34 se pudieron identificar aquellos residuos que contactan por arriba del 60% del tiempo de la simulación. Los residuos son: V134, L133, I130, V126, G103, L190, L189, L193, P194, P40 y I197.

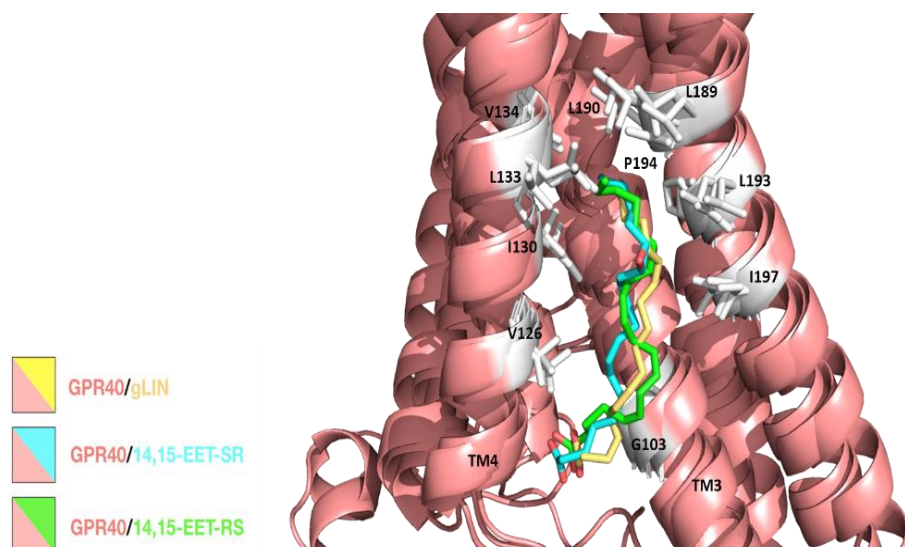


Figura 34: Residuos que interactúan a 5 Å con la cadena hidrocarbonada de los ligantes.

En la figura 35 se observan los gráficos de tipo barras los cuales muestran en porcentajes los residuos que contactan con los ligandos, en estos graficos podemos observar que el grupo epóxido presente en ambos ligandos, el EET-R/S y EET-S/R, establece interacciones por puente de hidrógeno con el residuo de prolina 194 (P194) localizada en la transmembrana 5. En el caso del ácido gamma linoleico, su cadena hidrocarbonada carece de tal grupo químico y por lo tanto solo establece interacciones débiles vía su grupo alquilo. En el resto de los contactos podemos observar que todos se encuentran por arriba del 60%, lo cual nos puede indicar que estos otros residuos también forman parte del sitio de unión a ligando.

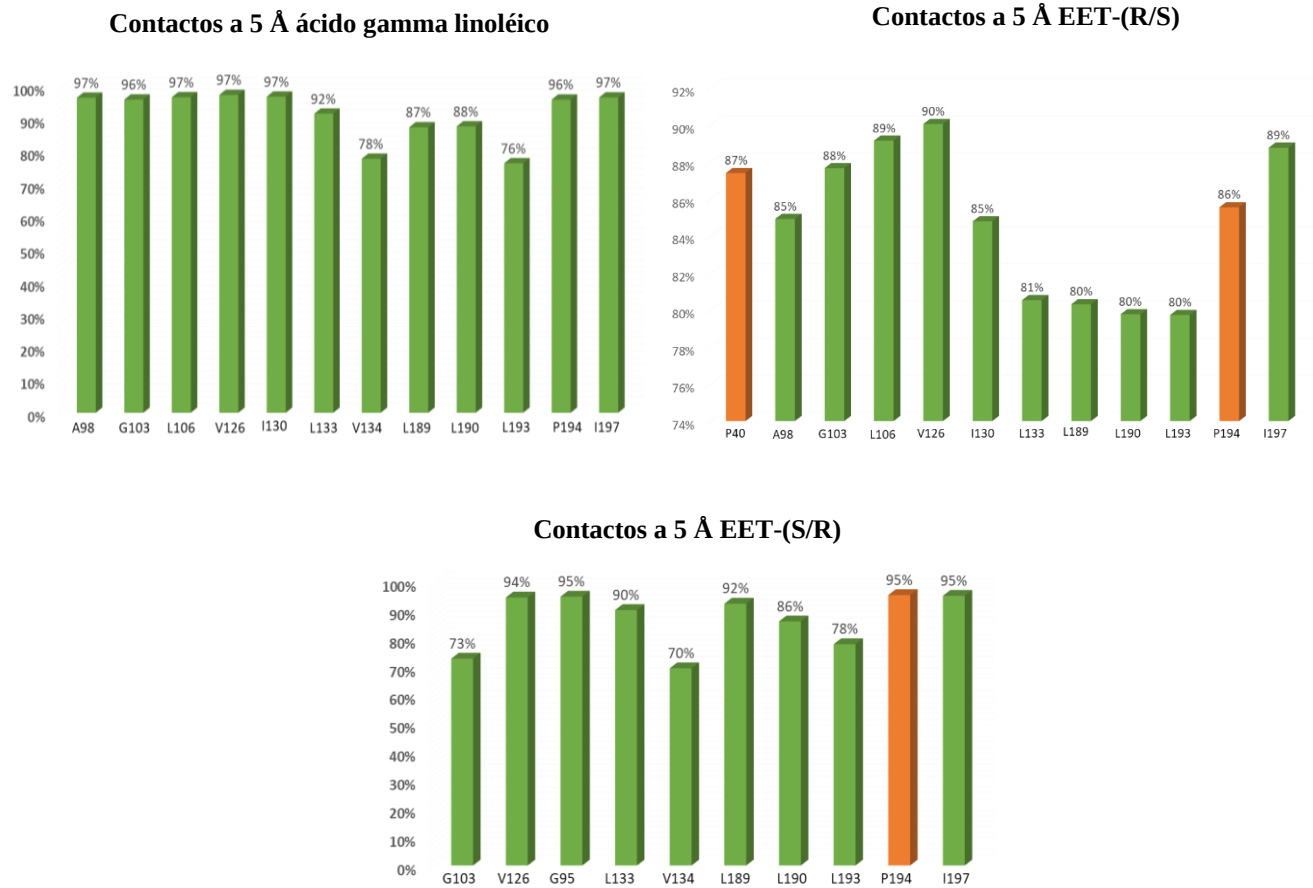


Figura 35: Gráficos que muestran el porcentaje de los contactos a 5Å entre los residuos de la cadena lateral con los ligantes.

8.5 Análisis de estructura secundaria

Para el análisis de estructura secundaria, centramos nuestra atención en dos regiones del receptor GPR40. El primer segmento analizado fue entre los residuos 102 al 124 (véase figura 36, imagen A) que abarca parte de la transmembrana 3 (TM3), el bucle intracelular 2 (ICL2) y parte de la transmembrana 4 (TM4). Esta región se ha postulado como relevante en la interacción con ligandos y en la activación del receptor. En particular, se ha especulado que la parte del bucle intracelular 2 (ICL2) cambia su conformación de desordenada en ausencia de ligando a helicoidal en presencia del mismo. Mientras que el segundo segmento de interés para el análisis de la estructura secundaria fue la parte C-terminal (Figura 36, imagen B). Esta región no se encuentra resuelta en las diferentes estructuras disponibles y nuestro análisis previo indicó que el receptor adquiere una estructura helicoidal entre los residuos 284 al 290.

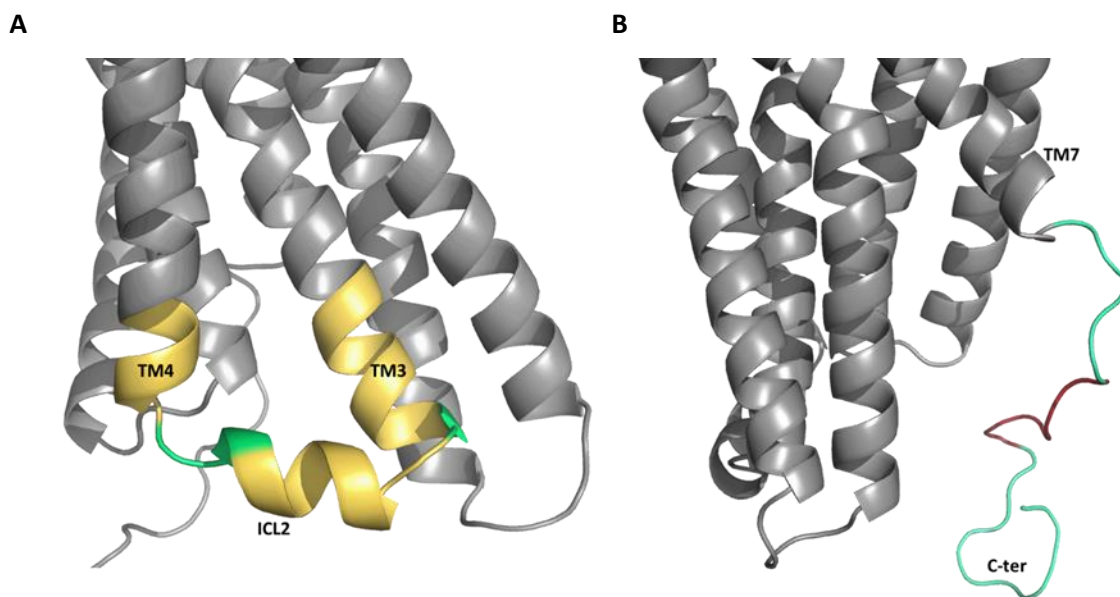


Figura 36: Imagen A: primera región tomada en cuenta para el análisis de estructura secundaria. Imagen B: región C-terminal mostrada en color verde y en rojo la zona donde se encuentran los residuos 284 al 290 que tienen cambios de “coil” a “hélice”.

68

Por otra parte, de acuerdo con el servidor PSIPRED el cual en un código de colores nos da el tipo de estructura secundaria. En nuestro caso el color rosa se refiere a los residuos que forman “hélices” y el color gris claro a aquellos sin estructuras secundarias, es decir “coil”. Con esta aclaración del código de colores para visualizar los resultados de este servidor, se puede observar en la figura número 38 que los residuos 115 al 117, los cuales corresponden al segmento del ICL2 forman una pequeña hélice (resaltada en un recuadro verde). Por otra parte, en la región de la parte C-terminal, se puede observar que hay la formación de una hélice a partir de los residuos 281 a 292.

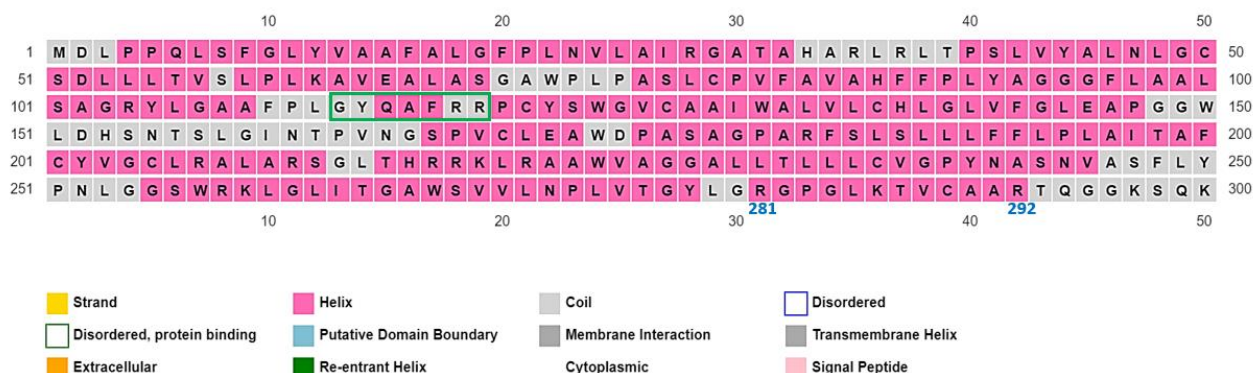


Figura 38: Resultados obtenidos del servidor PORTER de la predicción de la estructura secundaria del GPR40.

Una vez teniendo en cuenta estos resultados de predicción, se procedió a obtener los datos de estructura secundaria del GPR40 de los 2µs de simulación de dinámica molecular con la ayuda del programa VMD. Los resultados son graficados, mediante gráficas de mapas de calor utilizando el R software. Los primeros dos mapas de calor reflejan los cambios en la estructura secundaria del sistema GPR40-APO. En la figura 39 A se muestra el mapa de calor del primer segmento evaluado que va desde el residuo 106 al 122 del receptor y que centra nuestra atención en los cambios estructurales que ocurren en el bucle intracelular 2 (ICL2; residuos 110-117). En particular la estructura secundaria definida como de hélice (H) se muestra en color de negro. Como se puede observar, dicho segmento mantiene una conformación estructural de hélice a lo largo de toda la simulación.

Por otra parte, en la imagen B de la figura 39, se observa graficada la región C-terminal del sistema GRP40-APO. En esta gráfica la estructura de “coil (C)” se muestra de color blanco y “tail (T)” se muestran en color azul rey, mientras que las hélices son representadas en color negro. Como podemos observar, a lo largo de la simulación, no existe la formación de regiones helicoidales “hélix (H)” en dicho segmento, por lo que no observamos al color negro en el mapa de calor. En otras palabras, en la parte C-terminal del sistema GPR40-APO no se observa la formación de segmentos helicoidales en los residuos 284 al 290 como se había sugerido por los métodos de predicción de la estructura secundaria.

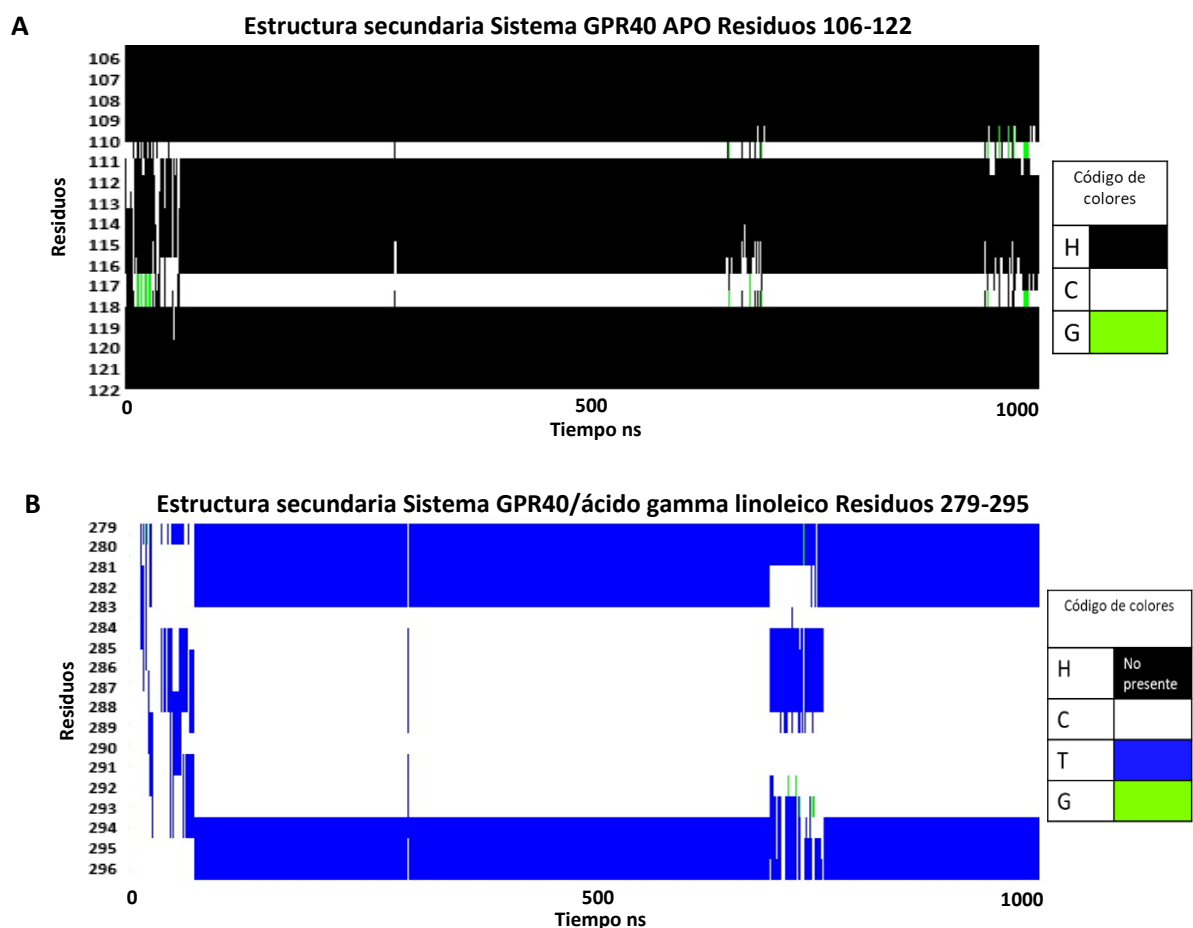


Figura 39: Mapas de calor de la estructura secundaria del GPR40 APO. Imagen A: muestra la región del bucle intracelular dos que va de los residuos (ICL2). Imagen B: la región en la cual se forma una pequeña hélice en los residuos 284 al 290 se debería ver un color negro de hélice, pero no se forma en el GPR40 APO que está ausente de ligante.

Posteriormente se procedió a evaluar los cambios de la estructura secundaria de los sistemas en presencia de los ligandos. A continuación, en la figura 40 se muestran los mapas de calor que evalúan los cambios de estructura secundaria de los tres sistemas con ligando (GPR40/ácido gamma linoleico, GPR40/EET-R/S y EET-S/R). Los tres mapas de calor de la figura muestran al primer segmento analizado que va desde el residuo numero 106 al 122 y del residuo 111 al 117 es el bucle intracelular 2 (ICL2). El resultado del análisis, en el mapa de calor en color negro indica que el ICL2 mantiene una conformación de hélice en los tres sistemas.

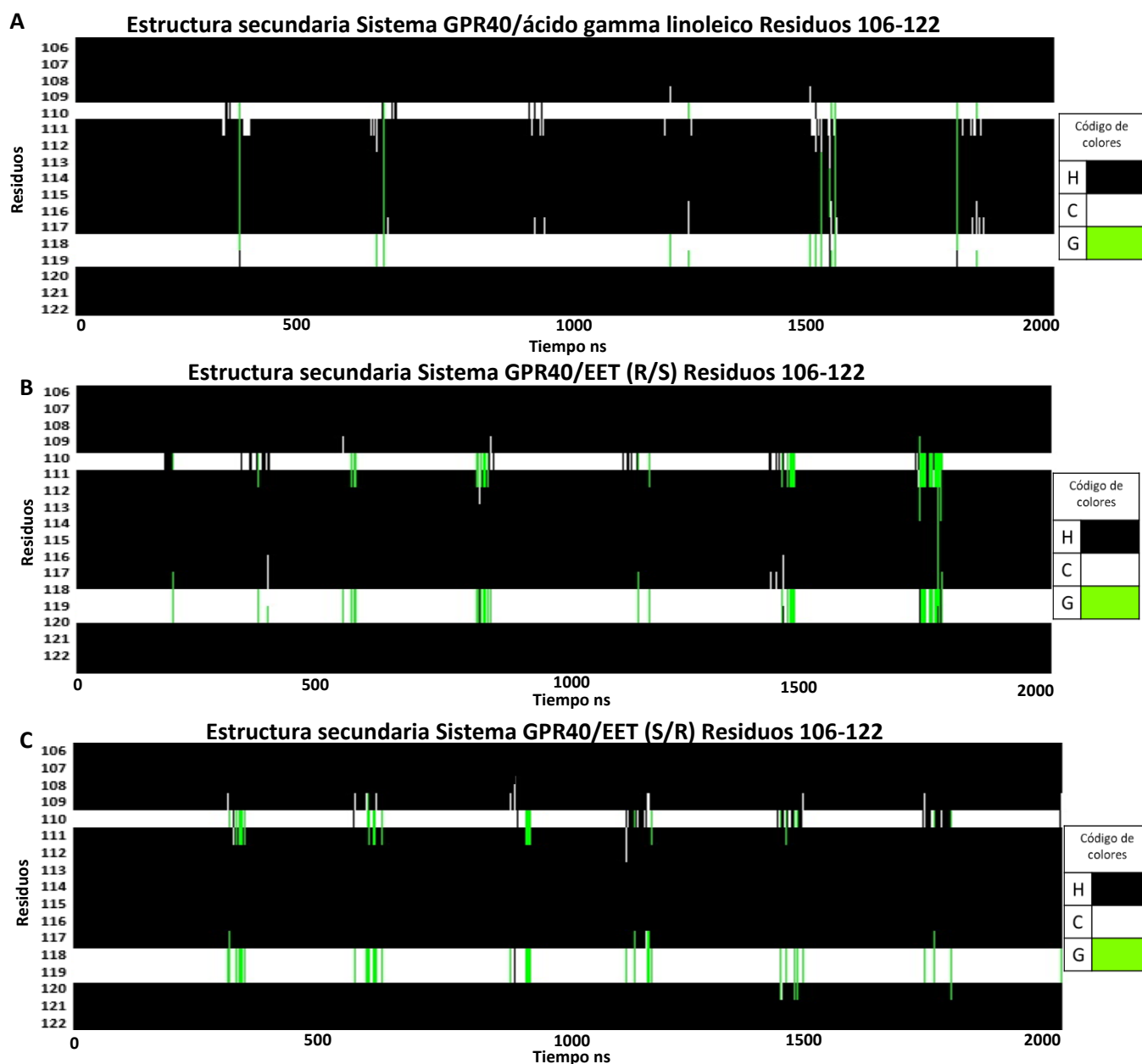


Figura 40: Mapas de calor de los residuos 102 al 124 de los tres sistemas con ligantes. En color negro se muestran los residuos que forman una hélice en el ICL2.

Por último, en la figura 41 se muestran los mapas de calor de los cambios en la estructura secundaria de la región C-terminal para los tres sistemas que contienen ligandos. Como podemos observar en el mapa A, el cual corresponde al GPR40/ácido gamma linoleico, en el segmento compuesto por los residuos 284 al 290, durante varios lapsos de tiempo se observa la formación de un segmento helicoidal, el cual se muestra en color negro. Por otro lado, en el mapa de calor de la imagen B que corresponde al sistema GPR40/EET-R/S, se muestra la formación de la hélice durante varios lapsos de tiempo, correspondiente al color negro, de manera similar a la observada para el caso del receptor enlazado al ligando agonista (GPR40/ácido gamma linoleico). En el caso del mapa de calor marcado con la letra “C”, el cual corresponde al sistema GPR40/EET-S/R, no se observó la formación de un segmento helicoidal a lo largo de los 2000 ns de simulación, ya que no observamos el color negro en el mapa de calor. De manera interesante, el sistema GPR40/EET-S/R no se comporta de la misma manera que los otros dos sistemas que contienen ligandos en relación con los cambios conformacionales del segmento C-terminal. Las consecuencias de la diferencia en el comportamiento en la región C-terminal por parte del sistema GPR40/EET-S/R serán investigadas subsecuentemente ya que estos cambios significativos de una conformación “coil” a “hélice” podría tener implicaciones en la activación del receptor haciendo que esto explique mejor la actividad en la vía de señalización activada en los procesos antiinflamatorios.

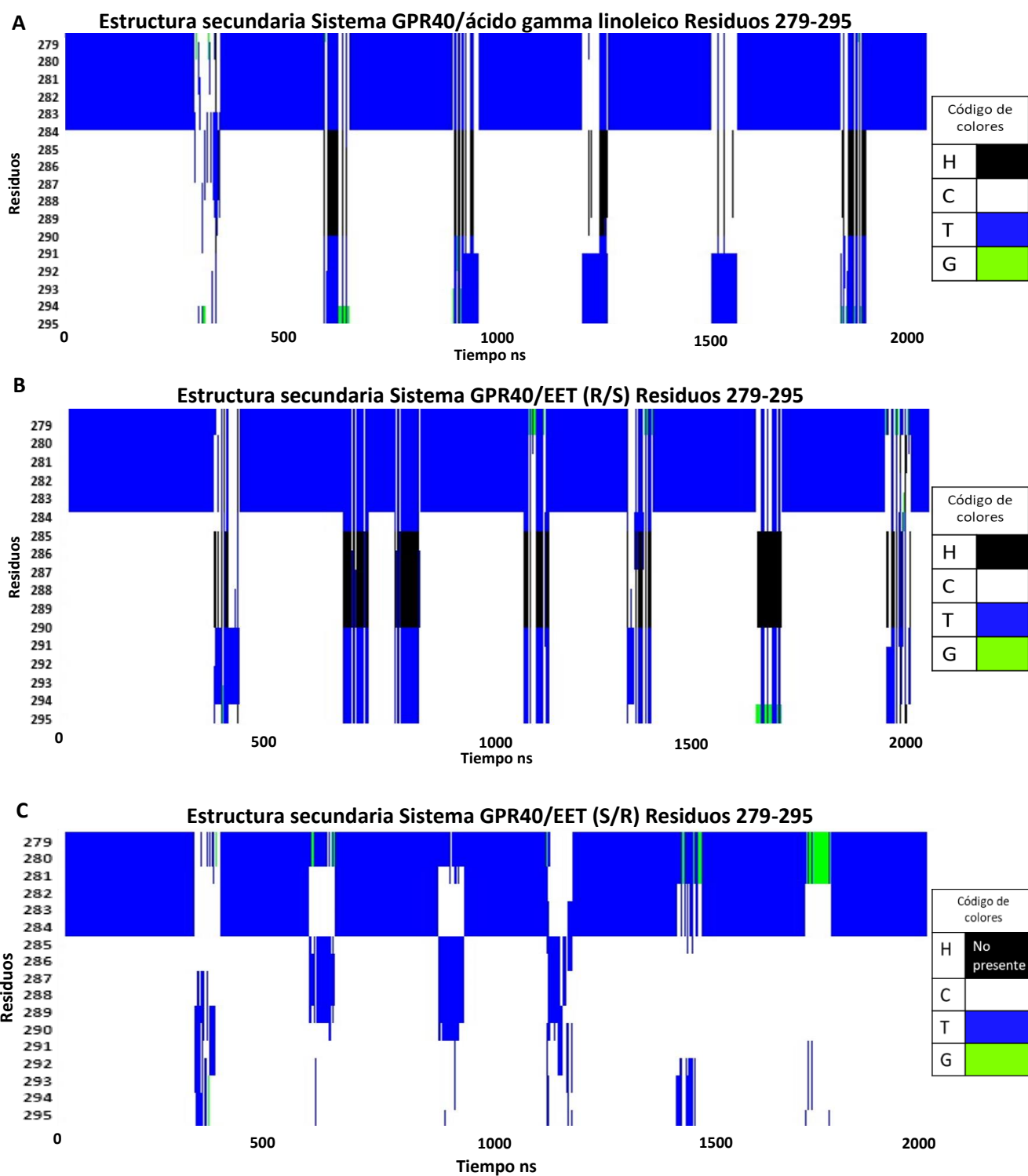


Figura 41: Mapas de calor de los residuos 279 al 300 de los tres sistemas con ligantes. En color negro se muestra los residuos que forman una hélice en los residuos 284 al 290.

8.6 Análisis de la fluctuación cuadrática media (RMSF)

Para este apartado, se hablará del último análisis realizado para conocer cómo cada ligante puede causar que el GPR40 tenga cambios estructurales en diferentes segmentos del receptor, lo cual podría dar información importante que permita identificar a las regiones y los residuos que pueden influenciar cambio conformacionales del estado inactivo a activo y así iniciar la cascada de señalización que pueda resultar en los efectos antiinflamatorios observados en las investigaciones llevadas a cabo en modelos animales por varios grupos de investigación.

De manera visual se encontró que la tirosina 114, la cual se encuentra en el bucle intracelular 2 (ICL2), se posiciona en la misma región en los tres sistemas en presencia de ligandos independientemente de su identidad. De manera interesante, la tirosina 114 en el sistema GPR40 APO se reposiciona y dirige su cadena lateral hacia otra dirección, lo cual está relacionado con un reposicionamiento de todo el segmento ICL2. Esto lo podemos observar en las figuras 42 donde A y B nos muestra el código de colores asignado para cada sistema y C nos muestra la posición de la tirosina 114 de los cuatro sistemas traslapados donde el GPR40-APO está en color gris. Además del reposicionamiento diferenciado del ICL2 en el sistema GPR40-APO, también se observó un cambio diferenciado en la tirosina 278 localizada en el segmento intracelular de la transmembrana 7, es decir, en el caso de los sistemas en presencia de ligandos, la cadena lateral hidrofóbica se posiciona en dirección del resto de las hélices transmembranales mientras que en el sistema GPR40-APO, el mismo residuo se aleja del resto del receptor. En la figura, los sistemas con ligandos se presentan en color salmón mientras que el sistema APO se presenta en color gris.

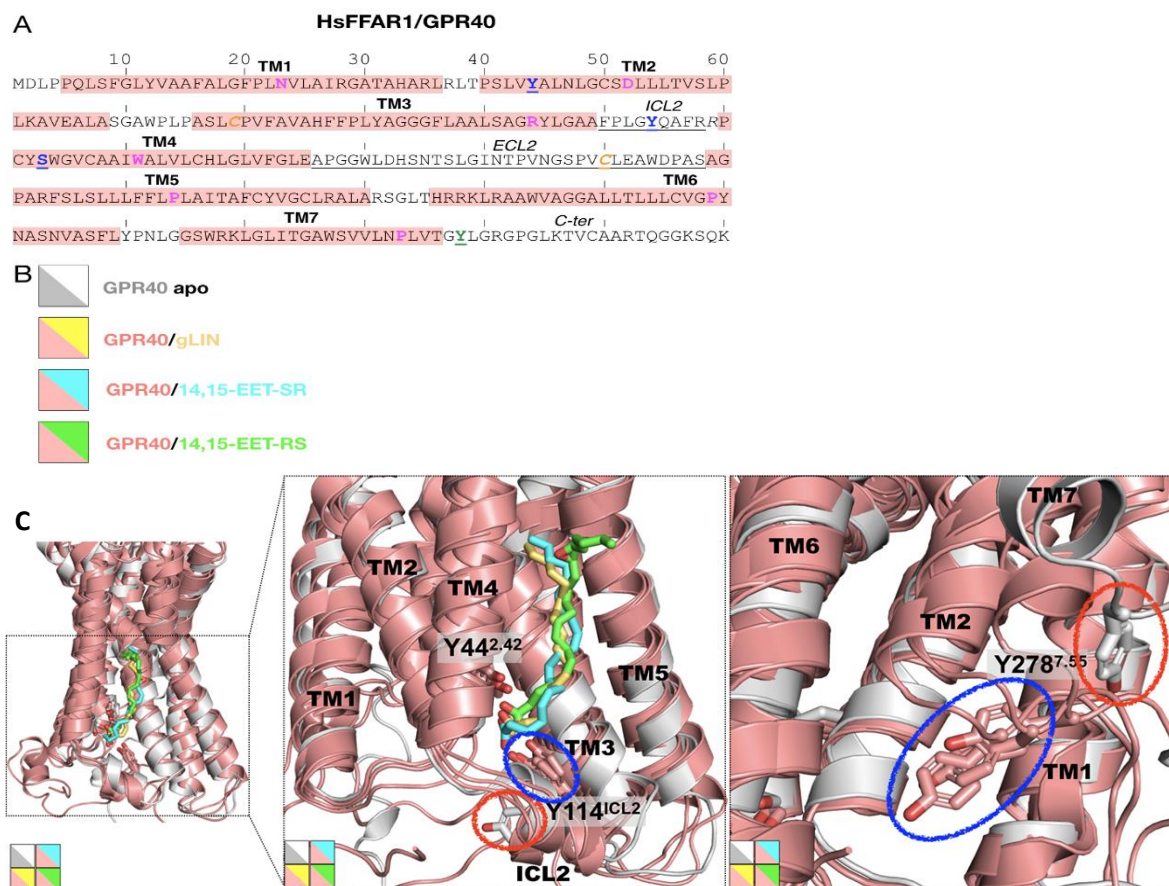


Figura 42: Imagen A muestra secuencia del receptor y sus regiones. En la imagen B se muestra el código de colores para reconocer cada sistema en la imagen C.

Por esa razón y por el resto de los resultados obtenidos anteriormente se vio la necesidad de realizar un análisis de RMSF el cual nos permite graficar las fluctuaciones de los residuos de cierta región en los últimos 100 nanosegundos de la simulación. Los resultados de las fluctuaciones se muestran en un gráfico para cada hélice transmembranal, así como los bucles intracelulares y extracelulares. De manera global, se encontraron dos regiones interesantes, las cuales fueron entre la TM3 - TM4 que se muestran en la figura 40, y entre la TM4 - TM5 que se muestra en la figura 42.

En la figura 43 se puede ver el gráfico de la región localizada entre las hélices TM3 – TM4, en el cual los valores de RMSF nos muestra que entre los residuos 105 al 120, los cuales corresponde al ICL2, hay fluctuaciones significativas y distintas en los 4 sistemas. En el caso del GPR40-APO (línea negra en el gráfico) se observan las mayores fluctuaciones seguidas

por aquellas del sistema GPR40/ácido gamma linoleico (línea azul). Ambos comportamientos son mayores a los observados en el caso de los ligandos EETs, donde el sistema GPR40-S/R (línea roja) muestra las menores fluctuaciones de los cuatro sistemas investigados seguido por el sistema GPR40/EET-R/S (línea verde).

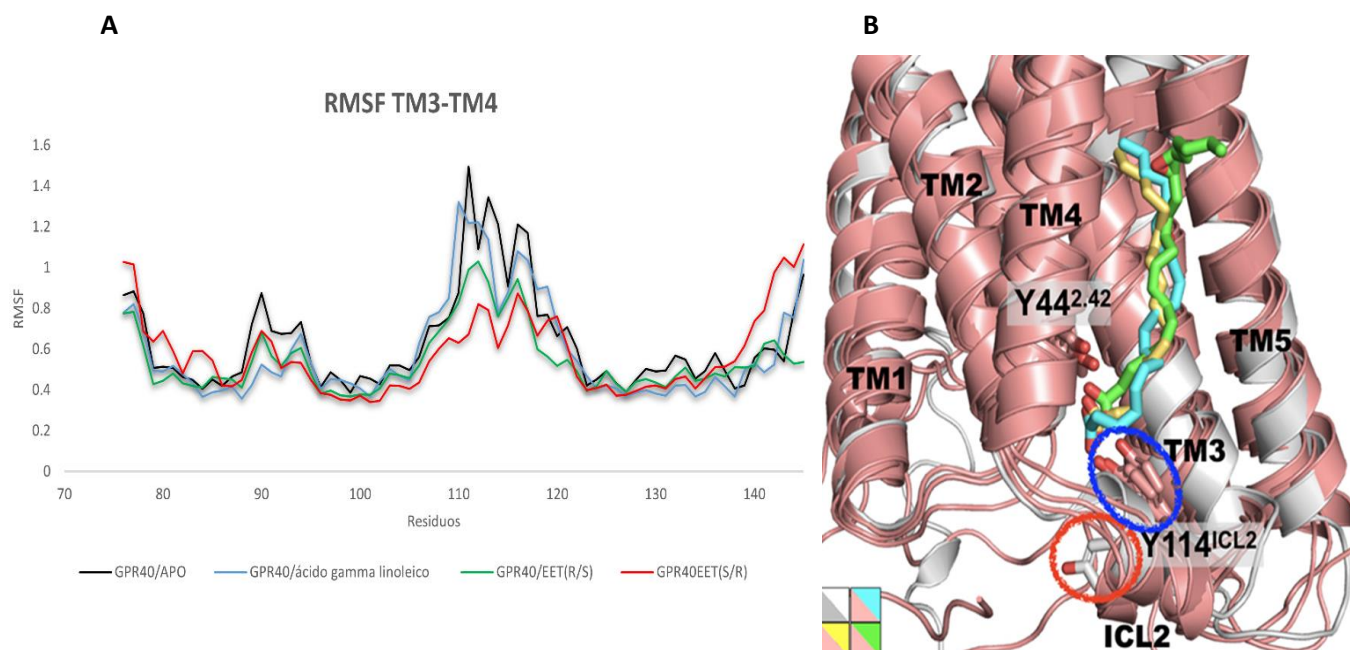


Figura 43: Imagen A muestra el gráfico de RMSF de la TM3 – TM4. Imagen B muestra la región del ICL2 (residuos del 105 al 120) donde se lleva a cabo fluctuaciones diferentes en cada sistema.

En el segundo gráfico que muestra el análisis de RMSF para el segmento TM4 – TM5 (Figura 44). Como podemos ver, las fluctuaciones nos indican que entre los residuos 145 al 170, los cuales corresponde a la región del bucle extracelular 2 (ECL2), los valores de RMSF de esta región en el sistema GPR40/EET-S/R (línea roja) son muy grandes comparados con el resto de los sistemas, mientras que los valores del sistema GPR40/EET-R/S son los menores. Los sistemas GPR40APO (línea negra) y GPR40/ácido gamma linoleico (línea azul) muestran valores intermedios de RMSF a los observados en los sistemas en presencia de los EETs. La relevancia del ECL2 es que cubre al sitio alostérico 1 de unión a ligandos y por lo tanto debe jugar un papel importante en establecer interacciones en este bolsillo de unión de ligandos como el ligante TAK-875.

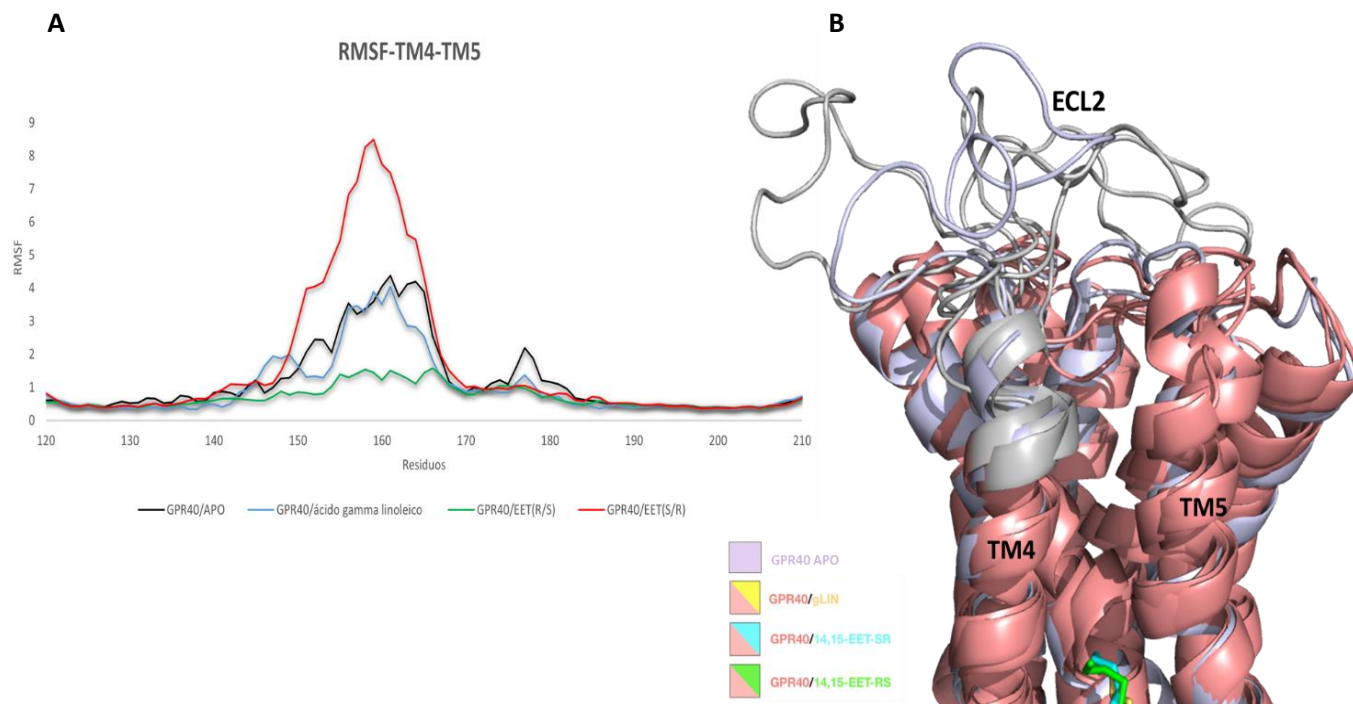


Figura 44: Imagen A muestra el gráfico de RMSF de la TM4 – TM5. Imagen B muestra la región del ECL2 (residuos del 145 al 170) donde se lleva a cabo las fluctuaciones mostradas en la gráfica.

9. Discusión

La inflamación es un proceso complejo que involucra la participación de varias entidades celulares. En particular, datos recientes han sugerido la participación tanto del receptor GPR40 como de los ácidos expoxiecosatrienoicos, particularmente aquellos sustituidos con el grupo epóxido entre los carbonos 14 y 15, como posibles agentes importantes en la regulación de la inflamación (Campbell et al., 2017). Tal sugerencia emerge a partir de la observación de que los ácidos expoxiecosatrienoicos participan en la disminución de la inflamación a nivel endotelial. Sin embargo, los detalles sobre el modo de interacción de los EETs con el receptor GPR40 son aún desconocidos. Dichos detalles potenciarían la explotación de esta vía traslacional con fines terapéuticos. La caracterización a nivel molecular presentada en este trabajo sienta las bases para un mejor entendimiento de la manera en que los EETs interactúan con el receptor GPR40, así como las posibles consecuencias conformacionales de dicha interacción. En particular, el análisis de los cambios en los valores de RMSD sugieren una estabilización conformacional rápida de la estructura de las hélices del dominio transmembranal de manera similar tanto en presencia del ácido gamma linoleico (ligando agonista) como de ambos EETs (An et al., 2021). Además, el análisis de las interacciones y contactos directos, utilizando las distancias entre átomos distintos a hidrógeno como un indicador de ellas, permitió delinear los residuos que forman el sitio de unión de los EETs y compararlos directamente con aquellos que contactan al ligando agonista, el ácido gamma linoleico. Particularmente, los resultados de las simulaciones de dinámica molecular permitieron identificar la interacción del grupo carboxilato común en los tres ligandos establece interacciones polares estables con las cadenas laterales de los residuos Y44, Y114 y S123 (Ho et al., 2018). Más aún, las cadenas hidrofóbicas de los ligandos establecen interacciones similares con residuos localizados en las hélices transmembranales TM3, TM4 y TM5 (G95, A98, A99, A102, I197, L133, I130, V126, V134). En particular, nuestro análisis sugiere que el grupo epoxi de los EET interactúa con la prolina 194, en especial el ácido epoxiecosatrienoico con configuración S/R, el cual mantiene mayor tiempo de contacto con la prolina 194 a diferencia del ácido epoxiecosatrienoico con configuración R/S. En conjunto, el trabajo presentado en este documento muestra una caracterización detallada de

las principales interacciones que participan en la unión receptor-ligando, así como la naturaleza de las mismas.

Asimismo, las trayectorias obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular permiten ver la evolución de los cambios en la estructura secundaria de los diferentes segmentos del receptor GPR40. En particular, elucidar el comportamiento del segmento que constituye al loop intracelular 2 (ICL2, residuos 110 al 119), que conecta a las hélices transmembranales TMIII y TMIV, es de relevancia espacial ya que ha sido considerado como un actor principal en la activación del receptor y se ha postulado que presenta una estructura secundaria diferente en sus formas activa e inactiva (An et al., 2021). Mas aún, en la mayoría de las estructuras resultas de GPR40 hasta el momento, no muestran suficiente información sobre la densidad electrónica en esta región que permita la correcta asignación de las posiciones de los átomos en este segmento (Ho et al., 2018; Lu et al., 2017; Srivastava et al., 2014). Los resultados del sistema muestran que todos los sistemas mantienen una estructura helicoidal en este segmento (An et al., 2021). Por otro lado, ya que se modeló toda la estructura del receptor GPR40, incluyendo la región C-terminal, fue posible analizar el comportamiento de dicha región. En particular, los resultados sugieren que el sistema GPR40/EET-14,15 (S/R) explora por lapsos importantes de tiempo, conformaciones helicoidales en el segmento 284-290, las cuales están ausente en los sistemas GPR40/EET-14,15 (R/S) y GPR40/ ácido gamma linoléico. Este comportamiento característico podría surgir debido a la estereoquímica de los EETs y explicar la diferencia en los resultados relacionados con la actividad antiinflamatoria reportada en los trabajos experimentales de Campbell y Park (Park et al., 2018).

10. Conclusión

El grupo carboxilato de los ligantes es fundamental para mantener las interacciones que estabilizan la unión de los ligandos en el sitio alostérico 2 ya que interactúa con varios grupos polares como son los hidroxilos de la cadena lateral, particularmente de los residuos tirosina 44, tirosina 114 y serina 123. Asimismo, las cadenas hidrocarbonadas tanto de los EETs y el ácido gamma linoleico interactúan con varios residuos del receptor y esto contribuyen significativamente a la estabilidad de los ligandos en el bolsillo de unión.

Por otro lado, el residuo R118, el cual no ha sido reportado anteriormente, es importante en la interacción de ligandos en el sitio alostérico 2, ya que tiene la capacidad de establecer interacciones carga-carga con el carboxilato del EET (S/R). Esta interacción podría influir en los valores de RMSF observado en el análisis de las fluctuaciones del ICL2 del sistema GPR40/EET-S/R, el cual mostró los valores más bajos con relación al resto de los sistemas.

Con los resultados presentados en este trabajo, podemos sugerir que los complejos de GPR40 con los EETs se comportan de manera similar al sistema GPR40/ácido gamma linoleico. Lo que sugiere que tanto EET (S/R) como EET (R/S) podrían funcionar como ligandos agonistas del receptor GPR40 y a su vez este comportamiento puede inducir cambios conformacionales en el GPR40, como el observado en la parte C-terminal al favorecer la formación de la hélice en los residuos 284-290. La formación de este segmento helicoidal nos muestra el carácter dinámico de la simulación de dinámica molecular para explorar los cambios conformacionales de biomoléculas en un medio fisiológico.

Referencias

- An, X., Bai, Q., Bing, Z., Liu, H., & Yao, X. (2021). Insights into the molecular mechanism of positive cooperativity between partial agonist MK-8666 and full allosteric agonist AP8 of hGPR40 by Gaussian accelerated molecular dynamics (GaMD) simulations. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 3978–3989. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.008>
- Aliwarga, T., Evangelista, E. A., Sotoodehnia, N., Lemaitre, R. N., and Totah, R. A. (2018). Regulation of CYP2J2 and EET levels in cardiac disease and diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* , 19:1916. doi: 10.3390/ijms19071916.
- Audet, M., & Bouvier, M. (2012). Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation. *Cell*, P14-23 DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.003>.
- Bartoszek, A., Moo, E. V., Binienda, A., Fabisiak, A., Krajewska, J. B., Mosińska, P., Niewinna, K., Tarasiuk, A., Martemyanov, K., Salaga, M., & Fichna, J. (2020). Free Fatty Acid Receptors as new potential therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Pharmacological research*, 152, 104604. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104604>.
- Bellien, J., & Joannides, R. (2013). Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. . *Journal of cardiovascular pharmacology*, 61(3), 188–196. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318273b007>.
- Bousoik, E., & Montazeri Aliabadi, H. (2018). “Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology* , 8:287. DOI=10.3389/fonc.2018.00287 .
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr, Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kucze (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. . *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- Campbell, W. B., & Falck, J. R. (2007). Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension* , Mar;49(3):590-6. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc>.
- Campbell, W. B., Imig, J. D., Schmitz, J. M., & Falck, J. R. (2017). Orally Active Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 70(4), 211–224. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000523>.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9 (6)204-7218 <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- Christiansen, E., Watterson, K. R., Stocker, C. J., Sokol, E., Jenkins, L., Simon, K., Grundmann, M., Petersen, R. K., Wargent, E. T., Hudson, B. D., Kostenis, E., Ejlsing, C. S., Cawthorne,

- M. A., Milligan, G., & Ulven, T. (2015). Activity of dietary fatty acids on FFA1 and FFA4 and characterisation of pinolenic acid as a dual FFA1/FFA4 agonist with potential effect against metabolic diseases. *The British journal of nutrition*, 113(11), 1677–1688. <https://doi.org/10.1017/S000711451500118X>.
- Chun, L., Zhang, W. H., & Liu, J. F. (2012). Structure and ligand recognition of class C GPCRs. *Acta pharmacologica Sinica*, 33(3), 312–323. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.186>.
- Culhane, K. J., Liu, Y., Cai, Y., & Yan, E. C. (2015). Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Frontiers in pharmacology*, 6, 264. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00264>.
- Du, Y., Duc, N. M., Rasmussen, S. G. F., Hilger, D., Kubiak, X., Wang, L., Bohon, J., Kim, H. R., Wegrecki, M., Asuru, A., Jeong, K. M., Lee, J., Chance, M. R., Lodowski, D. T., Kobilka, B. K., & Chung, K. Y. (2019). Assembly of a GPCR-G Protein Complex. *Cell*, 177(5), 1232–1242.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.022>.
- Duc, N. M., Kim, H. R., & Chung, K. Y. (2015). Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *European journal of pharmacology*, 763(Pt B), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.016>.
- Egyed, A., Kiss, D. J., & Keserű, G. M. (2022). The Impact of the Secondary Binding Pocket on the Pharmacology of Class A GPCRs. *Frontiers in pharmacology*, 13, 847788. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.847788>.
- Falkenburger, B. H., Dickson, E. J., & Hille, B. (2013). Quantitative properties and receptor reserve of the DAG and PKC branch of G(q)-coupled receptor signaling. *The Journal of general physiology*, 141(5), 537–555. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210887>.
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. (1988). Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British journal of pharmacology*, 93(3), 515–524. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb10306.x>.
- Filipek, S. (2019). Molecular switches in GPCRs. *Current opinion in structural biology*, 55, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.017>.
- Ge, Y. J., Liao, Q. W., Xu, Y. C., Zhao, Q., Wu, B. L., & Ye, R. D. (2020). Anti-inflammatory signaling through G protein-coupled receptors. *Acta pharmacologica Sinica*, 41(12), 1531–1538. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00523-1>.
- Governa, P., Caroleo, M. C., Carullo, G., Aiello, F., Cione, E., & Manetti, F. (2021). FFAR1/GPR40: One target, different binding sites, many agonists, no drugs, but a continuous and unprofitable tug-of-war between ligand lipophilicity, activity, and toxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 41, 127969. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.127969>.
- Grabner, B. C., Blonska, M., Lin, P. C., You, Y., Wang, D., Sun, J., Darnay, B. G., Dong, C., & Lin, X. (2007). CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF-

- {kappa}B activation. *Genes & development*, 21(8), 984–996.
<https://doi.org/10.1101/gad.1502507>.
- Hanif, A., Edin, M. L., Zeldin, D. C., Morisseau, C., Falck, J. R., & Nayeem, M. A. (2017). Vascular endothelial overexpression of human CYP2J2 (Tie2-CYP2J2 Tr) modulates cardiac oxylipin profiles and enhances coronary reactive hyperemia in mice. . *PloS one*, 12(3), e0174137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174137>.
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*, 11, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>.
- Ho, J. D., Chau, B., Rodgers, L., Lu, F., Wilbur, K. L., Otto, K. A., Chen, Y., Song, M., Riley, J. P., Yang, H. C., Reynolds, N. A., Kahl, S. D., Lewis, A. P., Groshong, C., Madsen, R. E., Connors, K., Lineswala, J. P., Gheyi, T., Saflor, M. D., Lee, M. R., ... Hamdouchi, C. (2018). Structural basis for GPR40 allosteric agonism and incretin stimulation. *Nature communications*, 9(1), 1645. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01240-w>
- Hollingsworth S.A., & Dror R.O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 1129-1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011.
- Hospital A, Goñi JR, Orozco M, Gelpí JL. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Adv Appl Bioinform Chem*, 19;8:37-47. doi: 10.2147/AABC.S70333.
- Imig J. D. (2019). Epoxyeicosanoids in hypertension. *Physiological research*, 695–704. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934291>.
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. . *Nature*, Mar 13;422(6928):173-6. doi: 10.1038/nature01478. Epub 2003 Feb 23. PMID: 12629551.
- Morrison D. K. Morrison D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>.
- Kaminska B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. . *Biochimica et biophysica acta*, 1754(1-2), 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.017>.
- Karplus, M., & Petsko, G. A. (1990). Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* , 347(6294), 631–639. <https://doi.org/10.1038/347631a0>.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H., & Tsujimoto, G. (2013). The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. . *Nature communications*, 4, 1829. <https://doi.org/10.1038/ncomms2852>.

- Karlin, A. (1967). On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *Journal of theoretical biology*, 16(2), 306–320. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90011-2).
- Krzemińska, J., Wronka, M., Młynarska, E., Franczyk, B., & Rysz, J. (2022). Arterial Hypertension-Oxidative Stress and Inflammation. . *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(1), 172. <https://doi.org/10.3390/antiox11010172>.
- Laeremans, T. S. (2022). Accelerating GPCR Drug Discovery With Conformation-Stabilizing VHHs. *Frontiers in molecular biosciences*, 9, 863099. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.863099>.
- Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(4), 339–357. <https://doi.org/10.1038/nrd2518>.
- Lai, J., & Chen, C. (2021). The Role of Epoxyeicosatrienoic Acids in Cardiac Remodeling. *Frontiers in physiology*, 12, 642470. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.642470>.
- Larsen BT, Campbell WB, Gutterman DD. (2007). Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci.* , Jan;28(1):32-8. doi: 10.1016/j.tips.2006.11.002.
- Liou AP, Lu X, Sei Y, Zhao X, Pechhold S, Carrero RJ, Raybould HE, Wank S. (2011). The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology.*, 140(3):903-12. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.012.
- Lu, J., Byrne, N., Wang, J., Bricogne, G., Brown, F. K., Chobanian, H. R., Colletti, S. L., Di Salvo, J., Thomas-Fowlkes, B., Guo, Y., Hall, D. L., Hadix, J., Hastings, N. B., Hermes, J. D., Ho, T., Howard, A. D., Josien, H., Kornienko, M., Lumb, K. J., Miller, M. W., ... Soisson, S. M. (2017). Structural basis for the cooperative allosteric activation of the free fatty acid receptor GPR40. *Nature structural & molecular biology*, 24(7), 570–577. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3417>
- Lu, Z., Li, Y., Syn, W. K., Li, A. J., Ritter, W. S., Wank, S. A., Lopes-Virella, M. F., & Huang, Y. (2021). GPR40 deficiency is associated with hepatic FAT/CD36 upregulation, steatosis, inflammation, and cell injury in C57BL/6 mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 320(1), E30–E42. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00257.2020>.
- Mafi, A., Kim, S. K., & Goddard, W. A. (2022). The mechanism for ligand activation of the GPCR-G protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(18), e2110085119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110085119>.
- Mancini, A. D., & Poitout, V. (2013). The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends in endocrinology and metabolism*, 24(8), 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.03.003>.

- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature reviews. Immunology*, 9(10), 692–703. <https://doi.org/10.1038/nri2634>.
- Mishra SP, Karunakar P, Taraphder S, Yadav H. (2020). Free Fatty Acid Receptors 2 and 3 as Microbial Metabolite Sensors to Shape Host Health: Pharmacophysiological View. . *Biomedicines*, 8;8(6):154. doi: 10.3390/biomedicines8060154.
- Nikiforovich, G. V., Taylor, C. M., & Marshall, G. R. (2007). Modeling of the complex between transducin and photoactivated rhodopsin, a prototypical G-protein-coupled receptor. *Biochemistry*, 6(16), 4734–4744. <https://doi.org/10.1021/bi700185p>.
- Ode, H., Nakashima, M., Kitamura, S., Sugiura, W., & Sato, H. (2012). Molecular dynamics simulation in virus research. *Frontiers in microbiology*, 3, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00258>.
- Odoemelum, C. S., Percival, B., Wallis, H., Chang, M. W., Ahmad, Z., Scholey, D., Burton, E., Williams, I. H., Kamerlin, C. L., & Wilson, P. B. (2020). G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC advances*, 10(60), 36337–36348. <https://doi.org/10.1039/d0ra08003a>.
- Oliw E. H. (1994). Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Progress in lipid research*, 33(3), 329–354. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)90029-9).
- Park S. K., Hermreiter, A., Pfister S. L., Gauthier, K. M., Falck, B. A., Falck, J. R., Campbell, W, B. (2018). GPR40 is a low-affinity epoxyeicosatrienoic acid receptor in vascular cells. *Journal of Biological Chemistry*, P10675-10691. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001297>.
- Patel, S., Alam, A., Pant, R., & Chattopadhyay, S. (2019). Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. . *Frontiers in immunology*, 10, 2872. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02872>.
- Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., & Rodríguez de Fonseca, F. (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* , Jun;21(6):218-24. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01482-6. PMID: 10838609.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549–555. <https://doi.org/10.1038/nature10361>.
- Ritter, S. L., & Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), 819–830. <https://doi.org/10.1038/nrm2803>.
- Rives, M. L., Rady, B., Swanson, N., Zhao, S., Qi, J., Arnoult, E., Bakaj, I., Mancini, A., Breton, B., Lee, S. P., Player, M. R., & Pocai, A. (2018). GPR40-Mediated $G\alpha_{12}$ Activation by

- Allosteric Full Agonists Highly Efficacious at Potentiating Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Human Islets. . *Molecular pharmacology*, 93(6), 581–591. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111369>.
- Rodrigues DA, Pinheiro PSM, Ferreira TTDSC, Thota S, Fraga CAM. (2018). Structural basis for the agonist action at free fatty acid receptor 1 (FFA1R or GPR40). *Chem Biol Drug Des.*, Mar;91(3):668-680. doi: 10.1111/cbdd.13131. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29068547.
- Srivastava, A., Yano, J., Hirozane, Y., Kefala, G., Gruswitz, F., Snell, G., Lane, W., Ivetac, A., Aertgeerts, K., Nguyen, J., Jennings, A., & Okada, K. (2014). High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*, 513(7516), 124–127. <https://doi.org/10.1038/nature13494>
- Sassone-Corsi P. (2012). The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1;4(12):a011148. doi: 10.1101/cshperspect.a011148.
- Schönege, A. M., Gallion, J., Picard, L. P., Wilkins, A. D., Le Gouill, C., Audet, M., Stallaert, W., Lohse, M. J., Kimmel, M., Lichtarge, O., & Bouvier, M. (2017). Evolutionary action and structural basis of the allosteric switch controlling β 2AR functional selectivity. *Nature communications*, 8(1), 2169. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02257-x>.
- Schulte, G., & Koziulewicz, P. (2020). Structural insight into Class F receptors - What have we learnt regarding agonist-induced activation?. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 126 Suppl 6, 17–24. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13235>.
- Secor, J. D., Fligor, S. C., Tsikis, S. T., Yu, L. J., & Puder, M. (2021). Free Fatty Acid Receptors as Mediators and Therapeutic Targets in Liver Disease. . *Frontiers in physiology*, 12, 656441. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.656441>.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Spector A. A. (2009). Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *Journal of lipid research* , 50 Suppl(Suppl), S52–S56. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800038-JLR200>.
- Spector AA & Norris AW. (2007). Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292: C996–C1012 ; doi:10.1152/ajpcell.00402.2006.
- Sterling T & Irwin JJ. (2009). ZINC 15--Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model.*, Nov 23;55(11):2324-37. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00559.
- Stone WL, B. H. (14 de November de 2022). *Pathology, Inflammation*. Obtenido de StatPearls [Internet]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534820/>
- Sun, L., & Ye, R. D. (2012). Role of G protein-coupled receptors in inflammation. *Acta pharmacologica Sinica*, 33(3), 342–350. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.200>.

- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Thomson, Neil J., Vickery, Owen N., Ives, Callum M., Zachariae, Ulf. (2021). Ion-water coupling controls class A GPCR signal transduction pathways. *bioRxiv*, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.28.271510>.
- Tomita T, Hosoda K, Fujikura J, Inagaki N, Nakao K. (2014). The G-Protein-Coupled Long-Chain Fatty Acid Receptor GPR40 and Glucose Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*, Sep 26;5:152. doi: 10.3389/fendo.2014.00152. PMID: 25309513; PMCID: PMC4176464.
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., & Filipek, S. (2012). Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. *Current medicinal chemistry*, 19(8), 1090–1109. <https://doi.org/10.2174/092986712799320556>.
- van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development (Cambridge, England)*, 136(19), 3205–3214. <https://doi.org/10.1242/dev.033910>.
- Vass, M., Kooistra, A. J., Yang, D., Stevens, R. C., Wang, M. W., & de Graaf, C. (2018). Chemical Diversity in the G Protein-Coupled Receptor Superfamily. *Trends in pharmacological sciences*, 39(5), 494–512. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.004>.
- Vischer, H. F., Hulshof, J. W., de Esch, I. J., Smit, M. J., & Leurs, R. (2006). Virus-encoded G-protein-coupled receptors: constitutively active (dys)regulators of cell function and their potential as drug target. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*, (2), 187–209. https://doi.org/10.1007/2789_2006_009.
- Wang, B., Zeng, H., Wen, Z., Chen, C., & Wang, D. W. (2016). CYP2J2 and its metabolites (epoxyeicosatrienoic acids) attenuate cardiac hypertrophy by activating AMPK α 2 and enhancing nuclear translocation of Akt1. *Aging cell*, 15(5), 940–952. <https://doi.org/10.1111/accel.12507>.
- Westphal, C., Spallek, B., Konkel, A., Marko, L., Qadri, F., DeGraff, L. M., Schubert, C., Bradbury, J. A., Regitz-Zagrosek, V., Falck, J. R., Zeldin, D. C., Müller, D. N., Schunck, W. H., & Fischer, R. (2013). CYP2J2 overexpression protects against arrhythmia susceptibility in cardiac hypertrophy. *PloS one*, 8(8), e73490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073490>.
- Wittlake, A., Prömel, S., & Schöneberg, T. (2021). The Evolutionary History of Vertebrate Adhesion GPCRs and Its Implication on Their Classification. *Int J Mol Sci*, 30;22(21):11803. doi: 10.3390/ijms222111803. PMID: 34769233; PMCID: PMC8584163.
- Wright, S. C., Koziulewicz, P., Kowalski-Jahn, M., Petersen, J., Bowin, C. F., Slodkiewicz, G., Marti-Solano, M., Rodríguez, D., Hot, B., Okashah, N., Strakova, K., Valnohova, J., Babu, M. M., Lambert, N. A., Carlsson, J., & Schulte, G. (2019). A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection. *Nature communications*, 10(1), 667. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08630-2>.

- Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., Niswender, C. M., Katritch, V., Meiler, J., Cherezov, V., Conn, P. J., & Stevens, R. C. (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6179), 58–64. <https://doi.org/10.1126/science.1249489>.
- Yabuki, C., Komatsu, H., Tsujihata, Y., Maeda, R., Ito, R., Matsuda-Nagasumi, K., Sakuma, K., Miyawaki, K., Kikuchi, N., Takeuchi, K., Habata, Y., & Mori, M. (2013). A novel antidiabetic drug, fasiglifam/TAK-875, acts as an ago-allosteric modulator of FFAR1. *PloS one*, 8(10), e76280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076280>.
- Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., & Wang, M. W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2059-3635 <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>.
- Ye, R. D., Boulay, F., Wang, J. M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C. N., & Murphy, P. M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacological reviews*, 61(2), 119–161. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001578>.
- Zeldin D. C. (2001). Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 276(39), 36059–36062. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100030200>.
- Zhang, Y., El-Sikhry, H., Chaudhary, K. R., Batchu, S. N., Shayeganpour, A., Jukar, T. O., Bradbury, J. A., Graves, J. P., DeGraff, L. M., Myers, P., Rouse, D. C., Foley, J., Nyska, A., Zeldin, D. C., & Seubert, J. M. (2009). Overexpression of CYP2J2 provides protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 297(1), H37–H46. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00983.2008>.
- Zhao, J., Deng, Y., Jiang, Z., & Qing, H. (2016). G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 58. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00058>.
- Zhou, Y., Hong, Y., & Huang, H. (2016). Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. *Kidney & blood pressure research*, 41(6), 901–910. <https://doi.org/10.1159/000452591>.

Apéndice A

