



# **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Fisicoquímica**

**Tesis Profesional**

**Estudio teórico del canal de calcio bTRPV3  
y su interacción con diversos aceites esenciales**

**Para obtener el título de:**

**Químico Farmacobiólogo**

**Presenta:**

**Daniel Pérez Lobato**

**Directores de Tesis:**

**Dr. José Manuel Pérez Aguilar**

**Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán**

**Puebla, Pue. Febrero 2022**



**"El secreto de la existencia humana no solo está en vivir, sino también en saber para qué se vive"  
— Fiódor Dostoyevski**

# Agradecimientos

La ciencia ha aportado mucho a la sociedad y también a mi vida. Así como el arte y la música es algo que me apasiona y me permite expresarme, pero no solo eso. El mundo está cambiando a un ritmo asombroso que además de legarnos maravillosas proezas también crea nuevas problemáticas que acechan de manera importante.

A través de este trabajo trato de aportar un poco para avanzar en la resolución de aquellas nuevas cuestiones y culminó una etapa de mi vida en la que recibí el apoyo de varias personas a las que agradeceré perpetuamente.

A mis padres, Onésimo y Rosa, que me han acompañado y guiado durante toda mi vida por medio de sus consejos y de una gran lección: "A pesar de las adversidades, es posible lograr grandes cosas".

A mis asesores, el Dr. José Manuel Pérez Aguilar y la Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán, a quienes conocí por casualidad y me encaminaron en este proyecto científico. Es necesario mencionar la inmensa paciencia y confianza que me dedicaron.

Agradezco también al Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante, la Dra. María Eugenia Castro Sánchez, y la Dra. Norma Angélica Caballero Concha por el tiempo dedicado a la revisión del siguiente material y por sugerir los cambios necesarios para aportar veracidad y mayor calidad al proyecto.

A mis queridos amigos, con los cuales pase grandiosas aventuras dentro y fuera de la universidad. La mayor parte del tiempo riendo y otras ocasiones rompiéndonos la cabeza. Tal vez ahora nos encontremos lejos, pero nuestras vivencias y amistad perduran.

Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) por permitirme el uso de la infraestructura necesaria para poder concluir mi investigación.



No sé que nos depara el futuro, pero disfrutemos los pequeños regalos de la vida que tenemos cada día.

# Índice de contenido

|   |    |
|---|----|
| Agradecimientos .....                           | 1  |
| Índice de contenido .....                       | 2  |
| Índice de tablas .....                          | 4  |
| Índice de Figuras .....                         | 5  |
| Resumen .....                                   | 6  |
| Palabras Clave .....                            | 7  |
| Abreviaturas.....                               | 7  |
| Introducción .....                              | 8  |
| Antecedentes.....                               | 10 |
| Aceites esenciales .....                        | 10 |
| Clasificación y Biosíntesis .....               | 12 |
| Terpenos y Terpenoides .....                    | 12 |
| Fenilpropanoides .....                          | 13 |
| Aceites esenciales y plantas.....               | 13 |
| Características.....                            | 14 |
| Usos.....                                       | 15 |
| Canales TRP y TRPV3.....                        | 17 |
| Ligantes endógenos, sintéticos y naturales..... | 19 |
| Los 3 estados conformacionales de TRPV3 .....   | 21 |
| Justificación.....                              | 25 |
| Hipótesis .....                                 | 25 |
| Objetivo General.....                           | 25 |
| Objetivos Particulares.....                     | 25 |
| Diagrama de trabajo .....                       | 26 |
| Fundamentos Teóricos .....                      | 27 |
| Técnicas computacionales.....                   | 27 |
| Modelado por homología .....                    | 27 |
| Acoplamiento Molecular .....                    | 28 |
| Simulaciones de Dinámica Molecular.....         | 30 |
| Campo de fuerza .....                           | 33 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Metodología</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>1) Construcción del modelo de TRPV3 de <i>Bos Taurus</i></b> .....                                | <b>35</b> |
| Modeller .....   | 35        |
| <b>2) Ejecución de los cálculos de acoplamiento molecular entre bTRPV3 y diversos ligantes</b> ..... | <b>37</b> |
| Autodock Vina .....  | 37        |
| Acoplamiento de 2 protómeros .....   | 40        |
| <b>3) Ejecución de las simulaciones atomísticas de dinámica molecular</b> .....                      | <b>41</b> |
| NAMD y CHARMM .....  | 41        |
| <b>Resultados y Discusión</b> .....  | <b>43</b> |
| Modelado por homología .....   | 43        |
| Acoplamiento molecular .....   | 45        |
| Simulaciones atomísticas de dinámica molecular del complejo bTRPV3/DHC .....                         | 52        |
| <b>Conclusiones</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>Perspectivas</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>Referencias</b> .....   | <b>57</b> |
| <b>Apéndice</b> .....  | <b>64</b> |
| Código de tres letras y de una letra para los aminoácidos estándar.....                              | 64        |
| Alineamiento de las secuencias plantillas y la secuencia objetivo .....                              | 65        |
| Script para la construcción de los homólogos de bTRPV3.....  | 66        |

# Índice de tablas

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1. Clasificación de terpenoides basados en el número de unidades de isopreno.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Tabla 2. Estructuras de TRPV3 de ratón (<i>mus musculus</i>) y humano (<i>homo sapiens</i>) obtenidas del Protein Data Bank en orden temporal en que fueron depositadas. ....</b> | <b>36</b> |
| <b>Tabla 3. Ligantes agonistas del canal de calcio TRPV3 seleccionados para realizar los cálculos de acoplamiento molecular (<i>molecular docking</i>)......</b>                     | <b>39</b> |
| <b>Tabla 4. Sitios de interacción encontrados en el acoplamiento molecular del homotetrámero bTRPV3.. ....</b>   | <b>45</b> |
| <b>Tabla 5. Resultado de los modos de unión de 9 ligantes en el Homotetrámero de bTRPV3.. ....</b>   | <b>47</b> |
| <b>Tabla 6. Energías de los modos de unión de los nueve ligantes estudiados con el Homotetrámero.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>Tabla 7. Sitios de interacción encontrados en el acoplamiento molecular del homodímero bTRPV3.. ....</b>  | <b>50</b> |
| <b>Tabla 8. Resultado de los modos de unión de 9 ligantes en el Homodímero de bTRPV3.. ....</b>  | <b>51</b> |
| <b>Tabla 9. Energías de los modos de unión de los nueve ligantes estudiados con el Homodímero.....</b>   | <b>52</b> |

# Índice de Figuras

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1. Esquema de la biosíntesis que sucede en plantas de varios terpenoides y fenilpropanoides.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Figura 2. Estructura general de los terpenos.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>Figura 3. Efecto de la estereoquímica del "sabor" y "fragancia". .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Figura 4. Esquema de la función del canal bTRPV3 en el rumen. ....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Figura 5. Diagrama donde se muestra la arquitectura de la estructura de uno de los dominios (protómeros) del canal bTRPV3, y los diversos estímulos que lo activan.....</b> | <b>21</b> |
| <b>Figura 6. Detalles estructurales del dominio de bTRPV3. ....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Figura 7. Diagrama de flujo de una simulación de dinámica molecular. ....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Figura 8. Sistema preparado para las simulaciones atomísticas de dinámica molecular.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>Figura 9. Estructura del protómero del canal de calcio bTRPV3. ....</b>   | <b>43</b> |
| <b>Figura 10. Estructura homotetramérica del canal de bTRPV3.. ....</b>  | <b>44</b> |
| <b>Figura 11. Diferentes sitios de unión entre los ligantes y la estructura de canal bTRPV3.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>Figura 12. Diferentes sitios de unión entre los ligantes y la estructura homodimérica del canal bTRPV3. ....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Figura 13. Estructura del complejo bTRPV3/DHC. ....</b>   | <b>53</b> |
| <b>Figura 14. Resultados de las simulaciones de dinámica molecular del complejo bTRPV3/DHC. ....</b>   | <b>55</b> |

# Resumen

Los canales de calcio de la superfamilia Potencial Receptor Transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) son proteínas transmembranales involucradas en una gran diversidad de procesos fisiológicos, incluyendo señalización, transducción del sabor, nocicepción y sensación de diferentes rangos de temperatura. En particular, el canal de calcio de bovino TRPV3 (bTRPV3), representa un blanco atractivo para modular su función debido a su papel tan relevante en la producción de leche. En particular, ligantes de bajo peso molecular capaces de activar al canal de calcio bTRPV3 podrían servir a la industria ganadera como un suplemento alimenticio. Más aún, si dichos ligantes se encuentran de manera natural, por ejemplo, en el caso de aceites esenciales, dichos suplementos podrían ser rentables.

Con esto en mente, en este estudio se utilizaron técnicas computacionales para caracterizar la estructura del canal de calcio TRPV3 de la especie *Bos taurus*. Una vez obtenida la estructura tridimensional de bTRPV3, se analizó su interacción con varios aceites esenciales para determinar posibles sitios de interacción y poses moleculares. Finalmente, se evaluaron las poses del ligante (+)-dihidrocarveol (DHC), el cuál mostró una alta acción para activar al canal en estudios experimentales, utilizando la técnica computacional de simulaciones de dinámica molecular. Dicha técnica computacional permitió investigar la evolución temporal del sistema bTRPV3/DHC en un medio similar al fisiológico, es decir, en presencia de una capa lipídica hidratada y con una solución salina de 0.15 M a 1 atmósfera de presión y a 37 °C. Nuestro trabajo sienta las bases para estudios detallados sobre la activación del canal del calcio bTRPV3 por ligantes naturales.

# Palabras Clave

Canales de calcio, activación, aceites esenciales, métodos computacionales, estructura terciaria, modelado por homología, acoplamiento molecular, simulaciones de dinámica molecular, *Bos Taurus*.

## Abreviaturas

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>2-APB</b>                | 2-aminoxifetilborato  |
| <b>AFNOR</b>                | Asociación Francesa de Normalización  |
| <b>ARD</b>                  | Dominio de repetición de anquirina  |
| <b>ATP</b>                  | Adenosín trifosfato   |
| <b>hTRPV3</b>               | Canal de Potencial Receptor Transitorio subfamilia Vanilloide<br>Miembro 3 de <i>Bos Taurus</i>   |
| <b>C<math>\alpha</math></b> | Carbono alfa  |
| <b>Cryo-EM</b>              | Criomicroscopía electrónica   |
| <b>CTD</b>                  | Dominio C-terminal  |
| <b>DHC</b>                  | Dihidrocarveol  |
| <b>Ec.</b>                  | Ecuación  |
| <b>EC50</b>                 | 50% de la concentración efectiva máxima   |
| <b>Exp. 2-APB</b>           | Posición reportada experimentalmente de 2-APB   |
| <b>Exp. Alcanfor</b>        | Posición reportada experimentalmente de Alcanfor  |
| <b>FDA</b>                  | Administración de Alimentos y Medicamentos  |
| <b>fs</b>                   | Femtosegundos   |
| <b>hTRPV3</b>               | Canal de Potencial Receptor Transitorio subfamilia Vanilloide<br>Miembro 3 de <i>Homo sapiens</i> |
| <b>M</b>                    | Concentración Molar   |
| <b>mTRPV3</b>               | Canal de Potencial Receptor Transitorio subfamilia Vanilloide<br>Miembro 3 de <i>Mus musculus</i> |
| <b>NOMPC</b>                | Sin mecanoreceptor potencial C  |
| <b>ns</b>                   | Nanosegundos  |
| <b>PAL</b>                  | Fenilalanina amoniaco liasa   |
| <b>PDB</b>                  | Protein data bank   |
| <b>PI (4,5)P2</b>           | Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  |
| <b>POPC</b>                 | 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina  |
| <b>RMN</b>                  | Resonancia magnética nuclear  |
| <b>TRP</b>                  | Canales de Potencial Receptor Transitorio   |
| <b>TRPV3</b>                | Canal de Potencial Receptor Transitorio subfamilia Vanilloide<br>Miembro 3                        |
| <b>XRC</b>                  | Cristalografía de rayos X   |

## Introducción

La leche es una secreción de una composición química compleja producida por las glándulas mamarias de los animales mamíferos. La principal función de la leche es la de nutrir a las crías de los mismos durante su edad temprana donde aún son incapaces de ingerir otros alimentos y donde es fundamental en el desarrollo óseo y la función inmunológica (1). Sin embargo, gracias a la domesticación animal, el hombre pudo incorporar este alimento a otras etapas de su vida desde hace unos 8500 años y a partir de ese momento, ha tomado importancia nutricional así como cultural (2) Así, la leche es actualmente uno de los alimentos más consumidos e importantes en la dieta humana a nivel mundial, de hecho, es el primer alimento ingerido al nacer.

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) define a la leche como: la secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida por el ordeño completo de una o más vacas sanas (3). La composición en peso de la leche de vaca es de aproximadamente un 87% de agua y un 13% de sólidos totales. Los sólidos totales contienen en promedio, 4% de grasa, 3.4% de proteínas (entre las cuales encontramos a la caseína), 4.8% de lactosa y 0.8% de minerales. Las proteínas de la leche se consideran de alto valor biológico por su alta digestibilidad, biodisponibilidad y porque contiene todos los aminoácidos esenciales para el cuerpo humano. Adicionalmente, cerca de un 5% de su peso corresponde al carbohidrato lactosa y un 1.2% de minerales, principalmente calcio y fósforo, pero también potasio, magnesio, zinc y selenio, así como las vitaminas solubles en agua del grupo B (riboflavina y B12) y vitaminas liposolubles (por ejemplo, A y E) (4–6).

La diversidad de macro y micronutrientes hace a la leche uno de los alimentos más completos, de hecho, desde 1894, W. O. Atwater, fundador de la ciencia de la nutrición en los Estados Unidos, analizó la relación costo-valor nutricional y definió a la leche como el alimento casi perfecto (7). Atwater no se encontraba tan equivocado ya que actualmente en la salud y la alimentación, la leche se ha posicionado en un gran número de tablas nutricionales nacionales e internacionales, todas apuntando en la directriz de su consumo diario para un crecimiento y desarrollo adecuado (8).

Hoy en día la producción mundial de leche es de 860 millones de toneladas siendo la leche de vaca (*Bos taurus*) la predominante en el mercado con un 81%. A ésta le sigue la leche de búfalo (*Bubalus bubalis*) con un 14%, y el porcentaje restante correspondiente es procedente de otras especies (9). Para el caso particular de México, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) reportó que la producción de leche en 2019 fue de 12.6 millones de toneladas posicionándonos como el décimo cuarto país productor a escala global (10).

En 2010, la producción mundial de leche fue de 600 millones de toneladas, lo que nos permite ver que, en tan solo una década, la producción de leche aumentó un 43% e inevitablemente se estima que la demanda seguirá creciendo en los siguientes años (9). Sin embargo, hay que tener en consideración que los recursos naturales no son infinitos, es decir; la producción de alimentos está limitada por la superficie terrestre y esto plantea varias problemáticas en la demanda a futuro por lo cual la producción de alimentos, incluyendo a la leche, debe mejorar

la eficiencia alimentaria (es decir, la eficiencia de conversión de recursos naturales en leche). Esto último consiste en modificar la fermentación ruminal para minimizar las pérdidas de carbono en forma de metano o para cambiar la fermentación a productos finales que son utilizados de manera más eficiente por el animal (11). La modificación en el proceso de digestión parece ser la solución para mejorar la eficiencia alimentaria y esto puede realizarse mediante diversas estrategias. La más común es la orientación de la alimentación a través de dietas altas en forraje. Sin embargo, se están explorando otras opciones como: la inclusión de suplementos como el lactato de cobalto, productos de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) y el uso de aceites esenciales (12,13).

Los aceites esenciales son un grupo de componentes de plantas extraídos por destilación, que cuentan con múltiples aplicaciones en el área de la salud, farmacia y en la industria alimentaria por mencionar algunos. Desde 1965 se han realizado estudios *in vitro* que han evaluado el potencial de los aceites esenciales para manipular la fermentación microbiana del rumen (14), sin embargo, hasta hace pocos años se comenzó a focalizar en la respuesta de aceites esenciales en estudios *in vivo*. Los resultados han mostrado que incluir aceites esenciales en la dieta de las vacas puede incrementar la producción de leche, así como también reducir el riesgo de hipocalcemia en las mismas (15).

Las investigaciones sugieren que este efecto producido por los aceites esenciales puede ser atribuido a una serie de canales que se expresan en el epitelio ruminal. Dichos canales son conocidos como **TRPV3** y pertenecen a la familia de los canales catiónicos TRP (16). A través de experimentos *in vitro* y utilizando técnicas como *Patch clamp*, se ha demostrado que algunos de los componentes principales de los aceites esenciales activan a este receptor, sin embargo, el mecanismo mediante el cual dichos compuestos modulan la función de estas proteínas no está perfectamente elucidado (17,18).

Gracias al progreso que han presentado diversas técnicas computacionales, actualmente es posible estudiar a nivel molecular la función de diversas proteínas y cómo diversos ligantes son capaces de activar o bloquear su función. Esto ha permitido avances significativos en el diseño de fármacos con mayor estabilidad, mejor efecto terapéutico, menores efectos adversos y un menor sacrificio de animales en el ensayo de prueba y error. Para el caso de la proteína TRPV3 de *Bos Taurus* (**bTRPV3**) no existe aún un consenso no solamente sobre los determinantes principales de la interacción que ocurre en el sitio de enlace sino en un mecanismo detallado sobre la activación del canal catiónico. Nuestra investigación se centra en contribuir al entendimiento sobre las interacciones de ligantes con el canal bTRPV3 utilizando métodos computacionales, así como buscar compuestos potenciales con alta afinidad por el canal que sean capaces de activarlo. El trabajo sentará las bases para una búsqueda subsecuente de compuestos de origen vegetal (por ejemplo, aceites esenciales) que puedan aprovecharse para modular este canal y mejorar la producción de leche en la vaca.

# Antecedentes

## Aceites esenciales

A través de la historia, el hombre se ha alimentado de lo que encuentra a su alrededor, incluyendo en su dieta, animales y plantas. En particular las plantas han tenido relevancia desde las primeras civilizaciones ya que han sido ampliamente utilizadas en el ámbito farmacológico para el tratamiento de algunas enfermedades. Diversas plantas han sido descritas en diversos textos antiguos como el libro chino sobre raíces y hierbas "*Pen T' Sao*", escrito por el emperador Shen Nung alrededor del 2500 a. C. o el papiro de Ebers escrito alrededor de 1550 a. C (19).

Antiguamente el uso de plantas era intuitivo y sensorial, pero con el avanzar de los años se han ido evidenciando las propiedades de éstas de una manera más precisa. Las plantas presentan una diversidad de componentes dentro de los que destacan algunos por sus características aromáticas y volátiles. Estos componentes se originan a partir de tres categorías de sustancias químicas (Ver **Figura 1**), que incluyen compuestos fenólicos, derivados de ácidos grasos e isoprenoides. Los isoprenoides son generalmente el componente mayoritario de los aceites esenciales (20,21).

A los compuestos volátiles derivados de plantas denominados aceites esenciales, también se les suele conocer como esencias, aceites volátiles, aceites etéricos o aetheroleum (21). Se les ha denominado *aceites* debido a su naturaleza oleosa con características hidrofóbicas, y *esenciales* debido a que se refieren a las fragancias exhaladas que son secreciones naturales producidas por diferentes órganos vegetales (22). La primera mención registrada de las técnicas y métodos utilizados para producir aceites esenciales es la de Ibn al-Baitar (1188-1248) (23). Aunque desde hace 2000 años los egipcios y persas ya realizaban la extracción de fragancias por destilación para preservar a sus momias (24).

De manera más formal la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR), de acuerdo con la ISO 9235:2013 y la Farmacopea Europea, definió a un aceite esencial como “un producto elaborado por destilación con agua o vapor o por procesamiento mecánico de cáscaras de cítricos o por destilación en seco de materiales naturales. Después de la destilación, el aceite esencial se separa físicamente de la fase acuosa” (25).

Es importante mencionar que éstos deben ser distinguidos de los extractos aromáticos, ya que son obtenidos por diferentes técnicas de extracción como extracción con disolventes (concretos, absolutos), extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas. Los aceites esenciales también se diferencian de los aceites fijos o grasos en sus propiedades químicas y físicas. Los aceites grasos contienen glicéridos de ácidos grasos y dejan una mancha permanente en el papel de filtro, mientras que los aceites esenciales contienen compuestos volátiles y se desvanecen rápidamente sin dejar ninguna mancha (26).

Los componentes de los aceites esenciales se dividen principalmente en dos clases químicas distintas: terpenoides y fenilpropanoides. Ambas clases se producen en todas las plantas y árboles aromáticos mediante la fotosíntesis a través de dos vías. La biosíntesis de terpenoides involucra las vías del mevalonato y el no mevalonato (desoxilulosa fosfato), mientras que los

fenilpropanoides se forman a través de la vía del ácido siquímico. Los terpenoides son compuestos químicamente muy diversos, mostrando diferentes esqueletos de carbono y una amplia variedad de derivados oxigenados, incluidos alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, éteres, peróxidos y fenoles. Existe una pequeña diferencia entre los pesos moleculares de los terpenos y sus productos oxigenados. Además, también se hace referencia a otros compuestos que se encuentran en los aceites esenciales como los sesquiterpenos, diterpenos, constituyentes que contienen azufre, nitrógeno y lactonas (26,27). Ver **figura 1**.

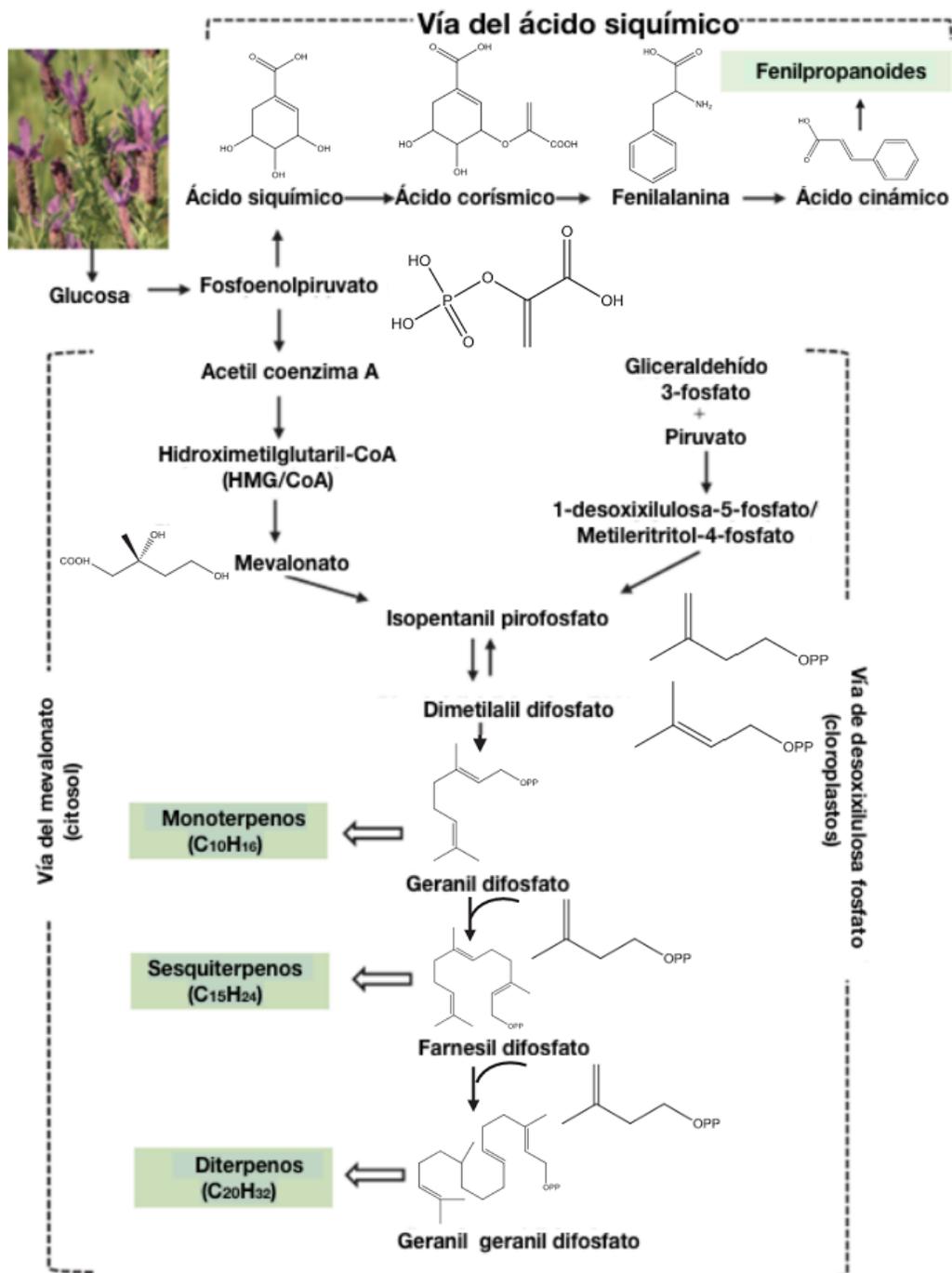
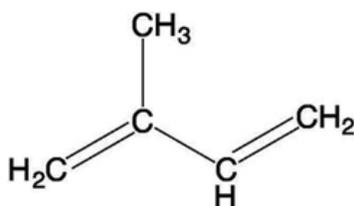


Figura 1. Esquema de la biosíntesis que sucede en plantas de varios terpenoides y fenilpropanoides (26).

## Clasificación y Biosíntesis

### Terpenos y Terpenoides

El término 'terpeno' se deriva de 'τερέβινθος', el nombre griego del árbol terebinto, *Pistachia terebinthus*, cuya resina rica en terpenos ha sido utilizada por personas en todo el Medio Oriente para tratar una variedad de dolencias, incluyendo dolor muscular y quemaduras, por mencionar algunos (28). Los compuestos de terpeno se clasifican como hidrocarburos insaturados y básicamente se sintetizan a partir de la unidad de isopreno que tiene la fórmula molecular  $(\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2)$ . Un terpeno debe estar formado por al menos 2 unidades de Isopreno y cumplir con la regla del isopreno o  $n(\text{C}_5\text{H}_8)$  en la cual  $n$  es el número de unidades de isopreno enlazadas (29). Ver **esquema 1**.



**Figura 2. Estructura general de los terpenos.**

La modificación bioquímica, como la oxidación o el reordenamiento de los terpenos, produce los llamados terpenoides. Por tanto, los terpenoides son derivados oxigenados de terpenos de hidrocarburos como aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, éteres y ésteres. En general, los terpenoides se pueden dividir en al menos cuatro grupos de compuestos que incluyen verdaderos terpenos (ver esquema 1), esteroides, saponinas y glucósidos cardíacos. Los terpenoides se pueden clasificar de acuerdo con el número de unidades de isopreno en la molécula (30). Ver **tabla 1**.

**Tabla 1. Clasificación de terpenoides basados en el número de unidades de isopreno.**

| Número | Tipo de Clasificación | Número de unidades de Isopreno | Fórmula estructural          | Ejemplos                   |
|--------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 1      | Semiterpenos          | Uno                            | $\text{C}_5\text{H}_8$       | Prenol y ácido isovalérico |
| 2      | Monoterpenos          | Dos                            | $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ | Geraniol, limoneno         |
| 3      | Sesquiterpenos        | Tres                           | $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ | Humuleno, Farnesol         |
| 4      | Diterpenos            | Cuatro                         | $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ | Cafestol                   |
| 5      | Sesterterpeno         | Cinco                          | $\text{C}_{25}\text{H}_{40}$ | Geranilfarnesol            |
| 6      | Triterpenos           | Seis                           | $\text{C}_{30}\text{H}_{48}$ | Esteroles                  |
| 7      | Sescuaterpenos        | Siete                          | $\text{C}_{35}\text{H}_{56}$ | Ferrugicadiol              |
| 8      | Tetraterpeno          | Ocho                           | $\text{C}_{40}\text{H}_{64}$ | Carotenoides               |
| 9      | Politerpenos          | Mas de ocho                    | --                           | Hule natural               |

La biosíntesis de terpenos involucra dos precursores universales: pirofosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP). El IPP se biosintetiza a través de dos vías: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del metileritritol fosfato (MEP), también llamada vía del no mevalonato (NMP) (31).

Después de la formación de los precursores de geranyl difosfato (GPP) y farnesil difosfato (FPP), se genera una serie de monoterpenos y sesquiterpenos cíclicos y acíclicos estructuralmente diversos por la acción de una gran familia de enzimas conocidas como terpeno sintasas/ciclasas (TPS) (32).

## **Fenilpropanoides**

Los fenilpropanoides son una clase de metabolitos sintetizados a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina o tirosina, a través de una serie de reacciones enzimáticas en la vía del ácido siquímico.

En general el término “fenilpropanoide” se usa para referirse a cualquier compuesto que contiene un grupo fenilo aromático de seis carbonos y una cadena lateral de propano de tres carbonos (compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Con base en la posición del doble enlace propenilo y el sustituyente en el anillo de benceno, los fenilpropanoides se pueden clasificar en diferentes grupos divergentes de actividad biológica. Recientemente éstos se han dividido en 5 grupos: los flavonoides, los monolignoles, los ácidos fenólicos, los estilbenos y las cumarinas (33).

La biosíntesis de fenilpropanoides comienza con la fenilalanina sintetizada a partir de la vía siquímico. Normalmente, la fenilalanina puede ser desaminada por la fenilalanina amoniaco liasa (PAL) para producir ácido cinámico que es un compuesto determinante de ramificación que conduce a generar diversos compuestos fenilpropanoides (34,35). Ver **figura 1**.

## **Aceites esenciales y plantas**

Los aceites esenciales son importantes en la fisiología y ecología de las plantas. Se ha descubierto que los aceites esenciales son responsables de atraer a los oponentes naturales de los herbívoros (i) para proporcionar protección contra patógenos, (ii) para la señalización de planta a planta, (iii) para atraer a los diseminadores y polinizadores de semillas para facilitar la reproducción de las plantas, (iv) en la termotolerancia de las plantas, (v) en la extinción del ozono, y (vi) en la formación de aerosoles de partículas finas y ozono de la tropósfera (36,37).

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente en las angiospermas dicotiledóneas como en las familias Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae y Rutaceae. En las angiospermas monocotiledóneas, la aparición de estos metabolitos es más restringida, presentándose en algunas gramíneas como especies de Cymbopogon y Vetiveria, y de Zingiberaceae, como especies de Alpinia y Curcuma, entre otras. En las gimnospermas, excepto en las coníferas, rara vez se encuentran aceites esenciales (38).

Los aceites esenciales se pueden almacenar en varios órganos de una planta, como flores (cítricos), hojas (eucalipto), en la corteza de los tallos (Cinnamomum), madera (Santalum), raíces (Vetiveria), rizomas (Zingiber), frutos (Pimpinella) o semillas (Myristica). Aunque todos los órganos de una planta pueden acumular aceites esenciales, su composición química, características fisicoquímicas y olores pueden variar según la ubicación. Más aún, la composición química de un aceite esencial en particular, extraído del mismo órgano de la misma especie vegetal, puede variar significativamente según el momento de recolección, las condiciones climáticas y del suelo. Además, dependiendo del grupo taxonómico al que pertenecen, los aceites esenciales se pueden generar en estructuras secretoras especializadas como en idioblastos, cavidades, conductos y tricomas, entre otros (39).

## Características

La mayoría de los aceites esenciales son líquidos incoloros, lúcidos y móviles a temperatura ambiente. Sin embargo, todo el espectro de color de estos varía de amarillo a marrón oscuro con toda la escala intermedia de colores, excluyendo los aceites esenciales de manzanilla (romanos), que presenta un color azul violeta distintivo debido a la presencia de chamazuleno. Además, se encuentran sólidos como cristales (por ejemplo, estearoptenos) en los aceites esenciales de la rosa, la manzanilla y algunas especies de eucalipto. El olor típico de los aceites esenciales depende de los órganos, las especies y el origen de las plantas. A diferencia de los aceites vegetales, los aceites esenciales son volátiles con un índice de refracción alto y una rotación óptima como resultado de muchos compuestos asimétricos. Su densidad relativa suele ser menor que la del agua, aunque existen varias excepciones. Generalmente se reconocen como hidrófobos, pero son en gran parte solubles en grasas, alcoholes y la mayoría de los disolventes orgánicos. Además, tienen sensibilidad a oxidarse para formar productos resinosos por polimerización (22).

Los constituyentes de los aceites esenciales poseen varias características químicas, como bajo peso molecular (usualmente menor a 500 daltons), alta solubilidad en lípidos, una alta presión de vapor o una alta volatilidad a presión y temperatura normales (27). Además, se encuentran comúnmente en formas isoméricas, cuando hay estereocentros presentes, como en mono y sesquiterpenos. Algunos estereoisómeros exhiben una alta pureza enantiomérica y son útiles en síntesis estereoselectivas, sin embargo, en otros casos se suelen encontrar mezclas racémicas (40). Es importante conocer la quiralidad y estereoquímica de cada componente ya que sus isómeros pueden mostrar propiedades organolépticas completamente diferentes (41). Ver **figura 3**.

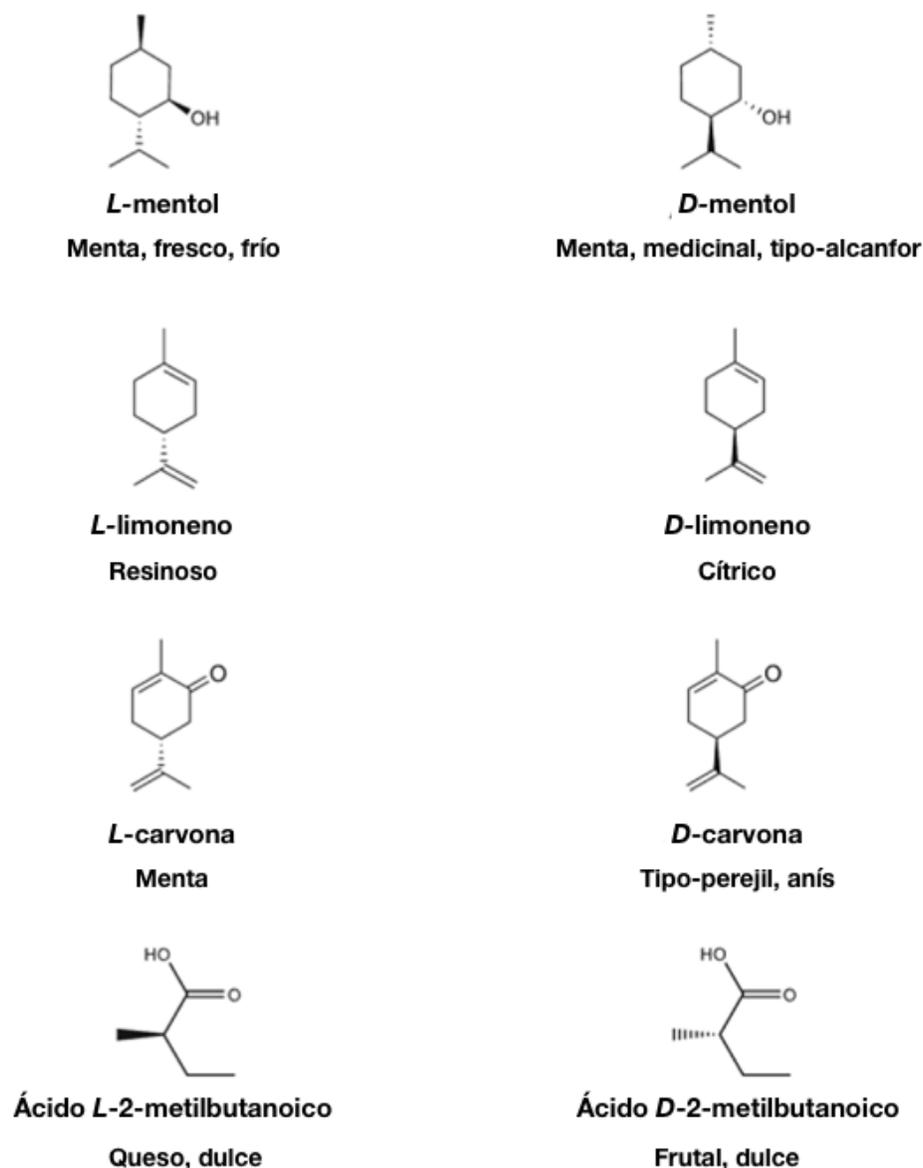


Figura 3. Efecto de la estereoquímica del "sabor" y "fragancia"(41).

## Usos

Actualmente existe un aproximado de 3000 aceites esenciales bien caracterizados extraídos a partir de unas 2000 plantas en todo el mundo, de los cuales alrededor de 300 tienen relevancia comercial y son usados de manera pluripotencial debido a su diversidad de aplicaciones en la industria (42). Los aceites esenciales que componen la mayor parte del mercado estadounidense son el aceite de naranja, el aceite de menta de maíz y el aceite de eucalipto (43).

Los diferentes componentes de los aceites esenciales de origen terpenoide o fenilpropanoide presentan actividad biológica en humanos, animales y plantas. Las principales áreas de aplicación son en la industria de la salud, farmacéutica, cosmética, alimentaria y en el campo de la agricultura. Entre las diferentes propiedades biológicas se incluyen actividades antimicrobianas, antivirales, antimutagénicas, anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antiprotozoarias, así como aditivos alimentarios para la conservación, fabricación de biofilms en frutos y como potenciales repelentes de plagas y pesticidas naturales (44–46).

Con el creciente aumento de la investigación se está trabajando en la identificación y caracterización de la actividad biológica, que en la mayoría de las ocasiones se atribuye a uno o dos componentes principales. Sin embargo, en ocasiones la actividad general no puede atribuirse a ninguno de los constituyentes principales y solo la combinación de componentes es capaz ejercer un efecto significativo (47).

Entre otras aplicaciones innovadoras para el área de alimentos, en las últimas 2 décadas se comenzó a probar la efectividad de la suplementación dietética de aceites esenciales en vacas para aumentar la producción de leche, sin embargo, los estudios *in vivo* han tenido resultados variables (11). Braun et al. encontraron que una mezcla de aceites esenciales compuesta por mentol, eugenol y anetol administrada diariamente fue capaz de elevar la producción de leche y los niveles de calcio plasmático (15). Además de ésta, otras mezclas de aceites esenciales conteniendo compuestos como extracto de pimienta (que contiene capsaicina), carvacrol, cinamaldehído, tiosulfonato de propilpropano, aceite esencial de cilantro, acetato de geraniol y geraniol han mostrado mejorar aumentar la eficiencia lechera (11,48–50).

Sin embargo, no todas las suplementaciones con aceites esenciales han tenido resultados significativos mejorando la producción de leche o la digestibilidad. Estudios *in vivo* realizados con aceites esenciales por otros autores con los mismos componentes no mostraron un aumento en la producción (51–53), lo cual se atribuye a una variedad de factores: tasas de aplicación, condiciones experimentales, así como la fuente y composición de Aceites Esenciales (54).

Por otro lado, los estudios *in vitro* respecto a la modulación con mentol han sido significativos en el epitelio ruminal evidenciando su capacidad de estimular y sensibilizar al canal TRPV3 siendo significativo en la mejora de absorción de calcio y por tanto en la producción de leche, así como la reducción del riesgo de hipocalcemia (55).

Estas evidencias dan pauta a una investigación más profunda de este canal incluyendo su activación y modulación por componentes naturales.

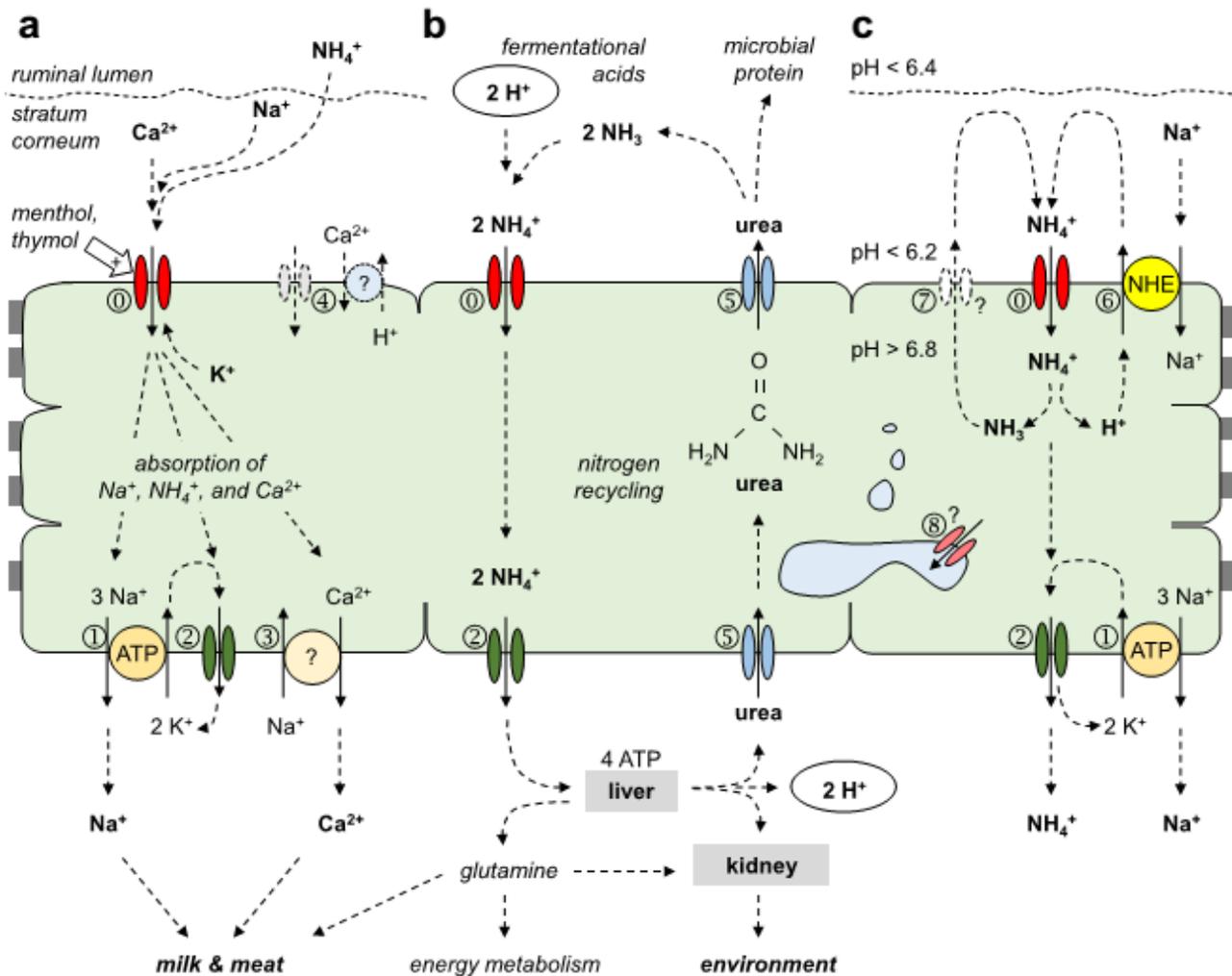
### Canales TRP y TRPV3

Los **canales de Potencial Receptor Transitorio (TRP)** por sus siglas en inglés) son proteínas transmembranales que participan en diversos procesos fisiológicos que van desde funciones sensoriales puras (como la señalización de feromonas, transducción del sabor, nocicepción y sensación de temperatura) y funciones homeostáticas (reabsorción y osmorregulación) a muchas otras funciones móviles, como la contracción muscular y el control vasomotor. Se expresan en casi todos los tipos de células, tanto en los tejidos excitables y no excitables, conducen cationes monovalentes y divalentes, también muestran una amplia diversidad de activación y regulación por temperatura, sabor, entrada mecánica y estímulos químicos (56). La superfamilia de canales TRP está compuesta por 29 canales de cationes activados por ligantes, estímulos y segundos mensajeros. Se ha identificado su presencia en levaduras, el reino *fungi* y *animalia*. Se han agrupado en siete subfamilias basadas en su homología de secuencia y la presencia de dominios estructurales con respecto al TRP de *Drosophila melanogaster* que fue en donde se identificó por primera ocasión. Las siete subfamilias son: TRP canónicos (TRPC), los TRP del receptor vanilloide (**TRPV**), los TRP de melastatina (TRPM), las mucolipinas (TRPML), las policistinas (TRPP), la proteína transmembrana anquirina 1 (TRPA1) y Similar a NOMPC (TRPN) (57).

Estructuralmente los canales TRP son tetrámeros donde cada protómero contiene seis segmentos transmembrana putativos (S1 a S6) con un bucle reentrante entre los segmentos S5 y S6 que forman parte del poro. Los extremos amino y carboxilo son de longitud variable y contienen diferentes conjuntos de dominios. También existe la presencia de otros dominios y motivos que influyen en las funciones características de cada canal, como la respuesta a calmodulina, los sitios de unión, la interacción con lípidos, o sitios de fosforilación. Los dominios suelen ser variables y no se conservan en todas las subfamilias (57).

El receptor de potencial transitorio vanilloide (**TRPV3**) es un canal catiónico polimodal no selectivo con alta permeabilidad al calcio. Este canal responde a temperaturas inocuas que van de 31 °C a 39 °C por lo cual es parte de los termo-TRP's, una serie de canales que aportan información sobre cambios térmicos en el medio ambiente. Así, mientras los canales TRPV1-TRPV4 perciben sensaciones calurosas, los canales TRPM8 y TRPA1 perciben temperaturas frías (58).

La función fisiológica del canal TRPV3 no es completamente conocida, pero se sabe que participa en la formación de la barrera cutánea, el crecimiento del cabello, la cicatrización de heridas, la maduración de los queratinocitos y las sensaciones cutáneas de dolor, picazón y temperatura (59). En la vaca (*Bos Taurus*) el homólogo de este canal bTRPV3 se expresa en el epitelio ruminal desempeñando un papel fundamental en la regulación del metabolismo del calcio como vía de entrada de este nutriente así como de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  necesarios para la producción de leche y contribuye a la conductancia apical de  $\text{K}^+$  (17,60). Ver **figura 4**.



**Figura 4. Esquema de la función del canal bTRPV3 en el rumen.** a) bTRPV3 (©) es un canal catiónico no selectivo que puede servir como vía para la absorción de nutrientes como  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , y contribuye a la conductancia apical para  $K^+$ . La captación de cationes es estimulada por ciertos monoterpenoides como el mentol y el timol. La extrusión basolateral involucra la bomba de sodio-potasio (ATPIA1, ①), los canales de  $K^+$  basolaterales (②) y los intercambiadores de sodio-calcio (③). En el modelo,  $NH_4^+$  es absorbido por la misma vía que  $K^+$  (©, ②). Otros canales e intercambiadores TRP pueden estar involucrados (④). b) Dentro de la luz ruminal, se producen grandes cantidades de ácidos fermentados, liberando protones que pueden eliminarse parcialmente a través de la salida de  $NH_4^+$  a través de bTRPV3 (©) y canales basolaterales de  $K^+$  (②). En el hígado, el  $NH_4^+$  se convierte en metabolitos no tóxicos, principalmente urea, pero también algo de glutamina. Las enzimas de mamíferos solo pueden utilizar glutamina para la síntesis de proteínas. Por el contrario, la urea debe excretarse. Esto puede ocurrir por vía renal, resultando en pérdidas de nitrógeno y daño ambiental. Alternativamente, la urea puede secretarse en el rumen a través de transportadores de urea como UT-B o acuaporina 3 (⑤). Después de la degradación por la microbiota interna, el  $NH_3$  se libera y puede ser utilizado por enzimas microbianas para la síntesis de proteínas. El  $NH_3$  también funciona como un tampón, uniendo protones para formar  $NH_4^+$  que nuevamente se elimina a través de bTRPV3 (©). Este "reciclaje de nitrógeno" puede llegar a 20 mol/día en el ganado. c) En gradientes de pH fisiológicos a través de la membrana apical,  $NH_4^+$  estimula el transporte de sodio a través del intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE, SLC9A3, ⑥) con recirculación apical de  $NH_3$  a través de una vía desconocida (⑦). El transporte electrogénico de  $NH_4^+$  continúa a través de la membrana basolateral (②) (60).

## Ligantes endógenos, sintéticos y naturales.

El canal TRPV3 presenta una diversidad de ligantes que pueden ser clasificados como: Endógenos, Sintéticos y Naturales.

Los ligantes endógenos de TRPV3 que se conocen son el pirofosfato de farnesilo (FPP), un precursor de esteroides y terpenoides el cual actúa como activador. Dentro de este grupo también se encuentra el pirofosfato de isopentenilo, que es un metabolito de la misma vía que FPP y que actúa como un antagonista al igual que el compuesto 17(R)-resolvin D1(17R-RvD1) (61–63).

Entre los ligantes sintéticos el borato de 2-aminoetoxidifenilo (**2-APB**) es el más popular al ser el primer activador sintético identificado con valor de EC<sub>50</sub> de 100-300 µM, donde EC<sub>50</sub> se refiere a la concentración efectiva requerida para producir 50% del efecto máximo del compuesto.

Además, ante repetidos estímulos con este ligante o por temperaturas altas, se sensibiliza el canal de manera intrínseca como resultado de la histéresis de la puerta del canal (64,65). Entre otros compuestos de este tipo también se encuentra el rojo de rutenio, el cual inhibe a todos los miembros de la familia TRPV y la Icilina, que actúa como antagonista de TRPV3, pero como un potente agonista de TRPM8 (63,66). Otro modulador es el ácido glicólico que activa fuertemente el canal, sin embargo, este lo hace por acidificación intracelular por donación de protones (67).

Para el caso de los ligantes de origen natural estos compuestos usualmente son componentes de aceites esenciales y podemos clasificarlos en 6 grupos:

**Monoterpenos bicíclicos aromáticos:** El compuesto más popular en este grupo es el alcanfor (de *Cinnamomum camphora*) que activa al canal con un valor de EC<sub>50</sub> de 10 mM y al Borneol (del género *Artemisia*) (18,68).

**Monoterpenos monocíclicos aromáticos:** Entre estos compuestos podemos encontrar al 6-terc-butyl-m-cresol, carvacrol (de orégano *Origanum vulgare*), timol (de tomillo, *Thymus vulgaris*), eugenol (del árbol de hoja perenne *Syzygium aromaticum*), cresol (un fenol de carbón o alquitrán de madera), cinamaldehído (de la corteza de *Cinnamomum verum*) (18,68–70).

**Monoterpenos monocíclicos no aromáticos:** El mentol pertenece a este grupo y es conocido por ser un fuerte activador de TRPM8 (de menta *Mentha piperita*). También en este grupo se encuentran el limoneno **dihidrocarveol** y el carveol (18,69).

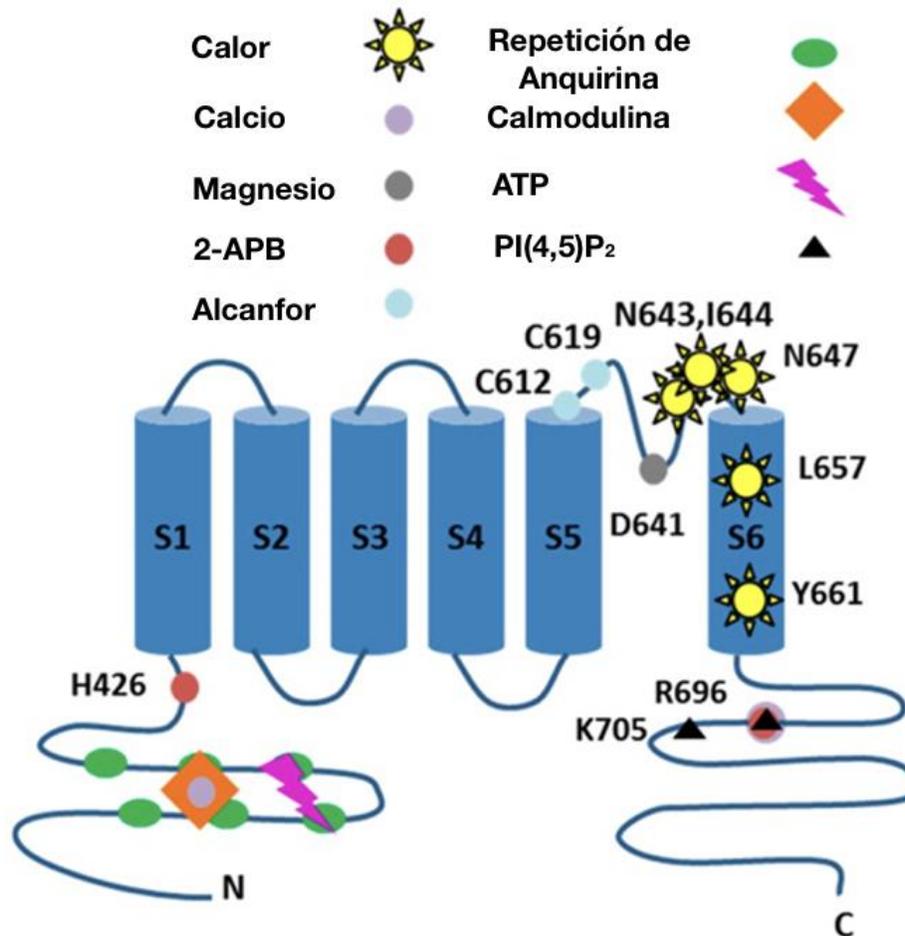
**Monoterpenos acíclicos:** El geraniol (de limoncillo *Cymbopogon citratus*) modula al canal de TRPV3, sin embargo, después de la activación inicial, produce una inhibición del canal, así como del TRPM8. Otros compuestos de esta categoría son el linalol y propofol (18,71).

**Otros compuestos:** Aquí encontramos al acetato de incensol el cual es un alcohol diterpénico obtenido de *Boswellia papyrifera* (72).

**Cannabinoides:** Además de derivados terpenos también se han descrito algunos cannabinoides como el cannabidiol y la tetrahidrocannabivarina (THCV), como compuestos que estimulan al TRPV3 con alta eficacia, mientras que los derivados cannabigerovarina (CBGV) y ácido cannabigerólico (CBGA) desensibilizan el canal (73).

Curiosamente la exposición prolongada a los monoterpenoides produce el efecto opuesto que el del 2-APB al desensibilizar el canal (74). En un análisis de *Patch Clamp* de TRPV3 ante diversos monoterpenoides, se encontraron resultados que mostraron que 6-terc-butil-m-cresol, carvacrol, dihidrocarveol, timol, carveol y borneol tienen valores de EC<sub>50</sub> hasta 16 veces menores que la del alcanfor, esto probablemente es debido a la presencia de su grupo hidroxilo secundario. También se halló que la oxidación de un grupo hidroxilo a ceto reduce la respuesta (18).

Otro aspecto relevante e importante de mencionar relacionado con el canal TRPV3 es que tiene múltiples sitios de activación y por consecuencia, la identidad de los residuos que forman el sitio de interacción es diferente en cada caso. Por ejemplo, un estudio reveló que la mutación de residuo H426, localizado entre los dominios de anquirina y transmembranal y el residuo R696 presente dentro de la caja TRP citoplásmica, afectan la sensibilidad a 2-APB, pero no la de alcanfor ni a voltaje (75). Por otro lado, mutaciones de residuos en la región del poro, específicamente las cisteínas C619 y C612, produjeron la pérdida de respuesta para alcanfor mientras que para 2-APB y dihidrocarveol, permanecieron intactas (76). Algo similar sucede con los residuos N643, I644, N647, L657 y Y661, los cuales están involucrados en la activación debida a altas temperaturas (*calor*). Estos residuos se encuentran presentes en la sexta hélice transmembrana, S6, y el bucle extracelular adyacente dentro de la región del poro. Mutaciones de estas posiciones eliminan específicamente la activación por calor, pero no la respuesta de agonistas químicos ni al voltaje (77). Ver **figura 5**.

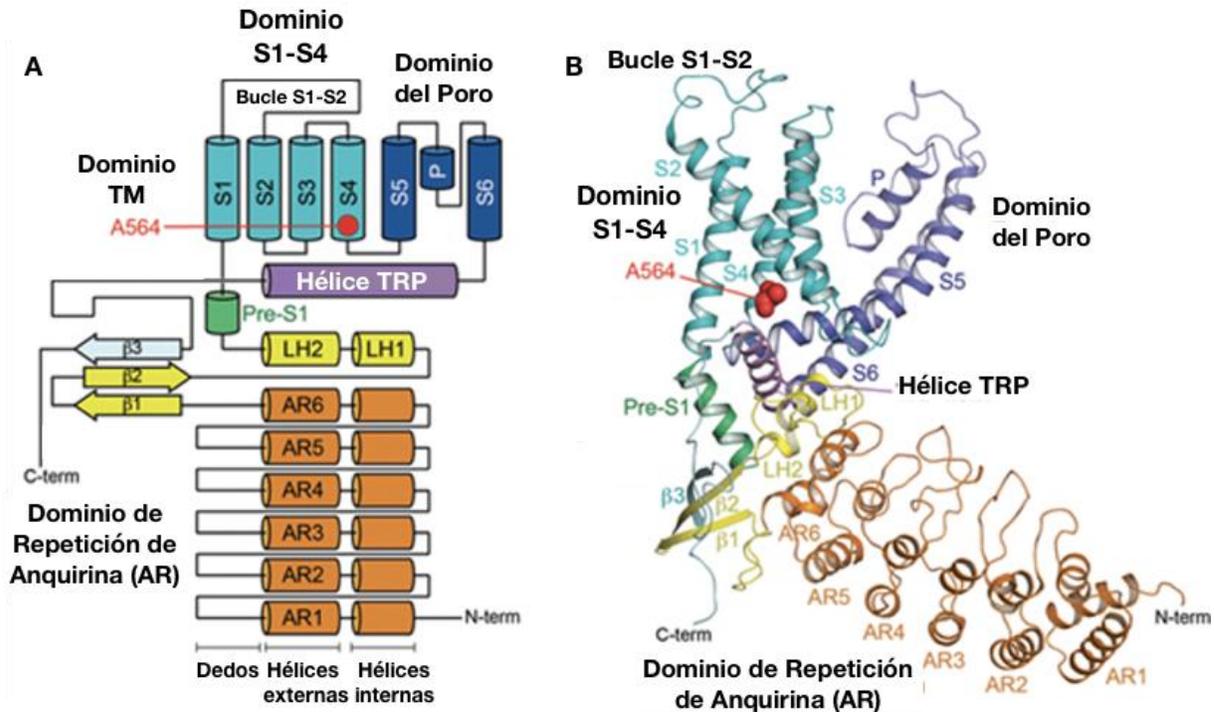


**Figura 5.** Diagrama donde se muestra la arquitectura de la estructura de uno de los dominios (protómeros) del canal bTRPV3 y los diversos estímulos que lo activan(78).

### Los 3 estados conformacionales de TRPV3

Para el caso del canal catiónico TRPV3 se han depositado un total de 22 estructuras obtenidas por Cryo-EM y cristalografía de rayos X, de las cuales 11 son de *Homo Sapiens* y 11 de *Mus musculus*. Esta información tridimensional ha permitido describir la estructura y algunos cambios entre los tres estados conformacionales más distintivos del canal: *cerrado*, *sensibilizado* y *abierto* (79).

Para un mayor entendimiento de la activación describiremos brevemente su arquitectura. El TRPV3 está compuesto de tres dominios, el dominio de repetición de anquirina N-terminal (ARD), el dominio transmembrana que consta de seis hélices transmembrana (S1-S6) y el dominio de acoplamiento (CD) que consiste en la hélice TRP y las cadenas  $\beta$  C-terminales. El dominio transmembrana tiene una arquitectura de intercambio de dominios, en la que el haz helicoidal S1-S4 llamado dominio similar a la detección de voltaje (VSLD) rodea el dominio del poro central que está formado por las hélices S5-S6 y la hélice del poro intermedio (80). Ver **figura 6**.



**Figura 6. Detalles estructurales del dominio de bTRPV3.** (A) Esquema general del dominio del canal TRPV3 donde las hélices se representan como cilindros mientras que las estructuras de  $\beta$  plagadas se representan como flechas. (B) Estructura tridimensional del dominio del canal utilizando el mismo código de colores que en (A)(81).

El estado *cerrado* del canal se ha obtenido usualmente sin ligante y muestra similitud con TRPV1, que tiene dos compuertas para la permeación de cationes, una superior y una inferior. La puerta intracelular está sellada hidrofólicamente por M677 similar a los canales TRPV2(M643), TRPV4(M714), TRPV5(M578) y TRPV6(M577). Otro aspecto general, es que los segmentos helicoidales S6 de cada uno de los cuatro protómeros que recubren el poro del canal, son estabilizados por dos pares de interacciones con el segmento S4-S5. La primera interacción esta formada por los residuos N671 en S6 y Y575 en el segmento S4-S5, mientras que la segunda se forma mediante la interacción entre Y575 en S6 y M672 en S4-S5. Finalmente, el segmento S4-S5 adopta una conformación de  $\pi$ -hélice (82,83).

Singh et al. y Zubcevic et al. en mTRPV3 (de *Mus musculus*) y hTRPV3 (de *Homo Sapiens*) en el estado cerrado, encontraron que, en la vía de conducción de iones, el poro externo, incluyendo el filtro de selectividad (SF, residuos 636-640), está revestido exclusivamente por residuos hidrófilos y carbonilos de la cadena principal, mientras que el poro interno, incluida la cavidad central y la región de la puerta intracelular, está revestido completamente por residuos hidrófobos. Los amplios radios del filtro de selectividad (7 a 7.5 Å) así como la superficie cargada negativamente permiten la permeación de los cationes hidratados  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo cual se sugiere que la puerta superior no es necesaria para la activación. Sin embargo, los homólogos en estado *apo* muestran las siguientes diferencias:

La estructura *apo* de mTRPV3 tiene una disposición única del dominio de poros (S5, S6 y hélice de poros) rotada con respecto a VSLD que no se asemeja a *apo* hTRPV3. De hecho, la posición del dominio de poros de hTRPV3 *apo* en el lado extracelular se alinea mejor con el dominio de poros del canal mTRPV3 abierto. Esto podría ser indicativo de diferencias entre especies, lo que sugiere que el dominio de los poros del canal TRPV3 humano no experimenta un movimiento independiente durante la activación. Además, en hTRPV3 se observa que el Dominio C Terminal (CTD) distal se enrolla alrededor del dominio de acoplamiento (CD)  $\beta$  y establece una serie de interacciones con la ARD del protómero vecino. Aquí los residuos ácidos E751 y D752 en la CTD distal forman un puente salino con el residuo K169 en el ARD vecino (82,83).

Por otro lado, Deng et al. y Shimada et al. resolvieron mTRPV3 y hTRPV3 en condiciones similares a una membrana con lípidos y encontraron que los sitios de constricción del poro: superior G638 (radio de 0.61 Å) e inferior I674 (radio de 0.92 Å) son demasiado estrechos para la permeación de cationes deshidratados. También encontraron diversos lípidos interactuando con la hélice S5 y proponen que el desplazamiento de lípidos podría estar involucrado en las transiciones estructurales del estado cerrado al abierto (80,84).

El estado sensibilizado se ha podido obtener mediante la estimulación repetida con el ligante 2-APB. Aquí el cambio más evidente observado es la transición de una estructura de  $\alpha$  hélice a una de hélice  $\pi$  en una región del segmento S6 que recubre el poro sin la apertura del canal lo que sugiere que es un estado cerrado, pero que requiere menos energía para la activación que la esperada para el estado cerrado nativo. En hTRPV3 también se observó que N671 se posiciona frente al poro y parece estabilizar la hélice  $\pi$  interactuando con V667 (82).

Zubcevic et al. hallaron otra manera de sensibilizar hTRPV3 realizando la mutación de K169A, la cual interrumpe la formación de un puente salino con E751 y D752 generando una transición de estructura secundaria de bobina a hélice en el CTD distal. Dicho efecto resulta en la sensibilización del canal sugiriendo que esta interacción actúa como un *switch*. Sin embargo, esta transición es poco probable que suceda en TRPV3 de tipo nativo ya que requiere superar una barrera de energía más grande que la transición helicoidal de  $\alpha$  a  $\pi$  en la hélice S6 (85).

Por otro lado, Singh et al., obtuvieron mTRPV3 de tipo salvaje a 42 °C sensibilizado que muestra la hélice- $\pi$  en S6. Este detalle estructural conduce a una rotación axial de 100° de la mitad C-terminal de S6, que se alarga dos vueltas helicoidales, mientras que la hélice TRP se acorta dos vueltas helicoidales en comparación con la estructura *apo*. La cadena lateral de M677 apunta hacia afuera del poro, sin embargo, el poro permanece cerrado debido al sello hidrófobo en la vecindad del residuo I674 (81).

El estado abierto, a diferencia del estado sensibilizado, ha sido desafiante para su obtención ya que la exposición con 2-APB no permite obtener la apertura del poro y el reordenamiento intracelular para mantener su estabilidad. Para lograr la apertura de mTRPV3 se realizó la mutación Y564A que aumenta la afinidad 20 veces por 2-APB, pero la disminuyó para el lípido putativo del estado *apo*. Para mTRPV3 se encontraron tres sitios de unión para 2-APB: (1) entre el dominio TRP y Pre-S1<sub>CD</sub>, (2) en la cavidad VSLD y (3) en la interfaz extracelular entre las hélices S1 y S3 del VSLD (82).

Para el caso de hTRPV3 la mutación necesaria para la apertura es K169A que es el residuo implicado en la disolución del puente salino con E751 y D752. Para el canal de humano, a diferencia del de ratón, las estructuras revelan sólo un sitio de afinidad de 2-APB que coincide con el sitio 3 de mTRPV3 (84).

Además, tanto mTRPV3 como hTRPV3 experimentan la transición estructural de  $\alpha$  a  $\pi$  en la hélice S6, lo que ocasiona que el poro se vuelva más ancho (I674 9,7 Å). Así, la presencia de residuos hidrofílicos expuestos al agua en la región de poro junto con aquellos residuos cargados negativamente, facilitan la permeación por cationes. Otro aspecto interesante en las múltiples estructuras obtenidas es que se han observado densidades lipídicas que están presentes en el estado *apo*, disminuyen en el estado sensibilizado y desaparecen en el estado abierto. Recientemente, se obtuvieron las estructuras de mTRPV3 a diferentes temperaturas para determinar la apertura mecánica por calor. Los resultados sugieren la participación fisiológica de lípidos en la estabilidad del estado cerrado y la funcionalidad del extremo C-Terminal como pestillo en los estados cerrado y sensibilizado que necesita ser liberado para que se abra el canal (81,84).

Resumidas las múltiples similitudes y diferencias entre mTRPV3 y hTRPV3, parece necesario estudiar mediante técnicas computacionales al homólogo bTRPV3. Dichas técnicas son capaces de proveer una caracterización detallada de los sistemas macromoleculares.

## Justificación

El receptor bTRPV3 es clave en el aumento de la producción de leche al participar en el metabolismo de calcio de *Bos Taurus* sin embargo, actualmente no existe una estructura tridimensional resuelta de este canal para esta especie por lo cual su comportamiento mecanístico no es completamente comprendido.

El estudio por métodos *in silico* de bTRPV3 permitirá entender los aspectos generales de su funcionamiento, así como obtener información de su modulación selectiva, particularmente con aceites esenciales que podrán ser utilizados como suplementos alimenticios rentables para la industria láctea.

## Hipótesis

A partir de las estructuras del canal TRPV3 de *Homo sapiens* (hTRPV3) y *Mus musculus* (mTRPV3) obtenidas experimentalmente será posible generar la estructura particular del homólogo para *Bos Taurus* (bTRPV3) mediante la técnica de modelado por homología.

Además, a través de estudios de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular, dicha estructura permitirá identificar diferentes posibles sitios de unión de ligantes, el entendimiento de los diversos modos de interacción, así como el comportamiento mecanístico entre los ligantes con el canal bTRPV3.

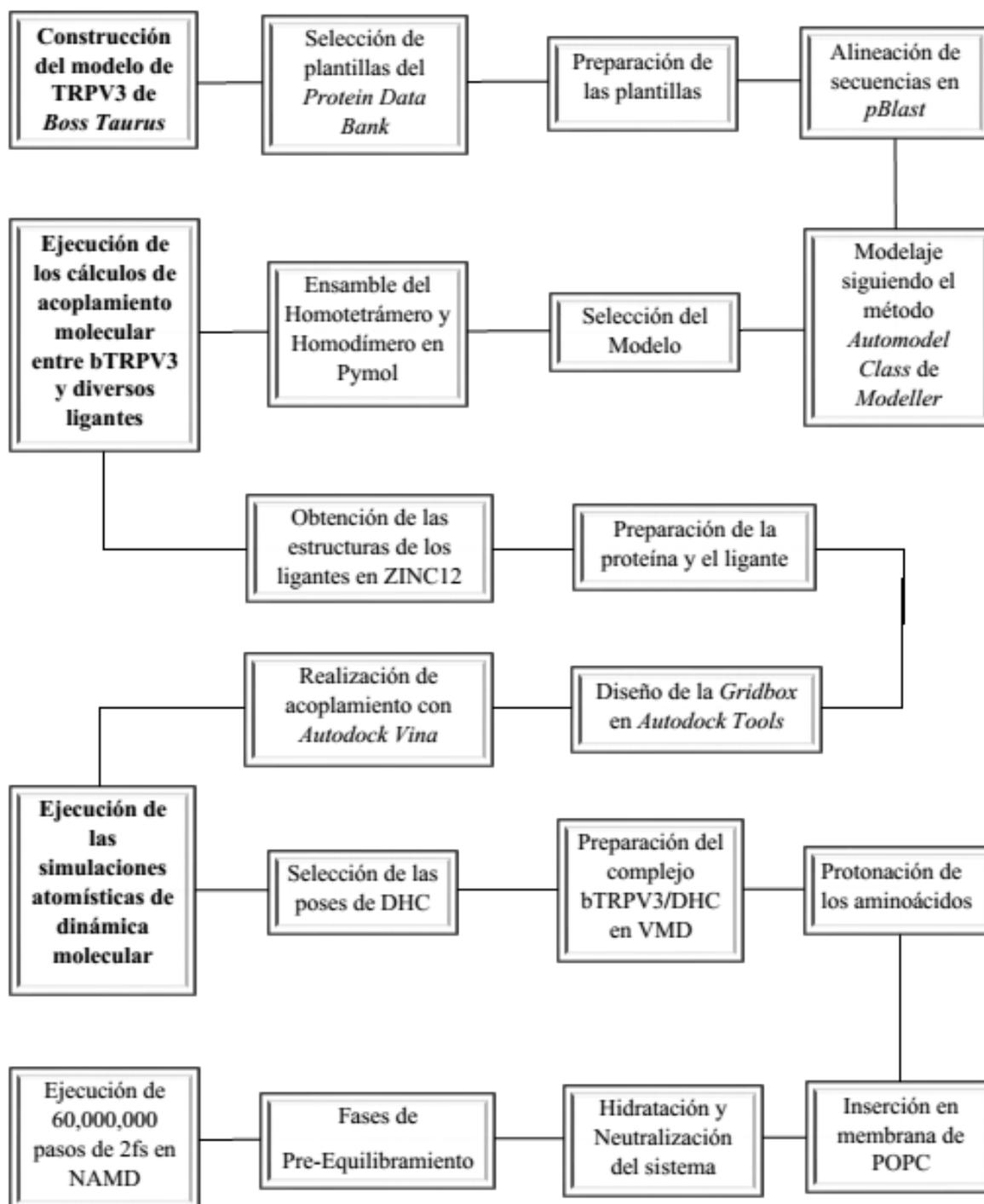
## Objetivo General

Investigar por métodos computacionales (*in silico*) la interacción del canal bTRPV3 de *Bos Taurus* con diversos ligantes que proporcionen datos estructurales y energéticos que permitan la modulación selectiva de este canal.

## Objetivos Particulares

- Generar la estructura tridimensional del canal bTRPV3 por la técnica de modelado por homología.
- Realizar un estudio de acoplamiento molecular (*molecular docking*) para obtener y evaluar datos energéticos de potenciales sitios de unión.
- Preparar el sistema y ejecutar una simulación de dinámica molecular del complejo formado por canal bTRPV3 y el ligante Dihidrocarveol (DHC) bajo condiciones similares a las del medio fisiológico de bTRPV3

## Diagrama de trabajo



# Fundamentos Teóricos

## Técnicas computacionales

En las ciencias químico-biológicas existen diferentes modelos para abordar el estudio de un fenómeno biológico: *in vivo*, *in situ*, *in vitro* e *in silico*. Este último se refiere a la caracterización de sistemas biológicos utilizando algoritmos e infraestructura computacional, lo que presenta diferentes ventajas que incluyen, reducción de costos, tiempo, y el no usar animales de laboratorio. El reciente avance de diferentes técnicas computacionales y en el desarrollo de infraestructura computacional hace que la obtención de resultados a través de modelos *in silico* sean cada vez más confiables y al mismo tiempo, ofrezca un entendimiento complementario al obtenido utilizando tanto métodos *in vitro* como *in vivo*.

## Modelado por homología

La secuenciación de proteínas comenzó en la década de los 60's y hasta abril de 2021 Uniprot, la base de datos de secuencias de proteínas reporta 214 971 037 entradas. Por otro lado, la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) en la actualidad contiene depositadas alrededor de 176,528 estructuras tridimensionales. En este contexto, es evidente la amplia brecha que existe en el número de secuencias de proteínas existentes y el número de estructuras tridimensionales disponibles.

La relevancia de la estructura tridimensional de las proteínas radica en que la función de estas no solo depende de su secuencia de aminoácidos sino de la estructura tridimensional que adopta en el espacio. Dicha importancia ha hecho que exista un esfuerzo muy importante en resolver la estructura tridimensional de diversas proteínas para entender los detalles de su función. Generalmente, las estructuras de proteínas son determinadas a través de metodologías experimentales utilizando técnicas de cristalografía de rayos X (XRC), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía electrónica. Sin embargo, debido no solamente a las dificultades experimentales sino también al enorme número de secuencias, han surgido diversas alternativas para obtener la estructura terciaria de las proteínas; técnicas computacionales que incluyen al modelado.

Los métodos de modelamiento se pueden clasificar en tres grupos: Modelaje comparativo o modelado por homología, Threading y Métodos *Ab initio*. El modelado por homología (*homology modeling*) es una técnica computacional que nos permite predecir la estructura tridimensional (3D) de una proteína a partir únicamente de su secuencia primaria (de aminoácidos) y del conocimiento de la secuencia primaria y terciaria de otra proteína denominada "plantilla" para la cual exista información estructural disponible. Dicha predicción se basa en dos principios importantes; las leyes de la fisicoquímica y la evolución de la biomolécula. De acuerdo con el primer principio, la proteína se pliega en una estructura estable y bien formada minimizando su energía libre mientras que, en los principios evolutivos, una proteína es una consecuencia de cambios graduales en la secuencia y estructura a lo largo del tiempo que le infieran una ventaja en su función. Los enfoques de threading están diseñados para hacer coincidir la secuencia de consulta directamente con las estructuras 3D de proteínas resueltas con el objetivo de reconocer pliegues de proteínas

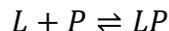
similares incluso cuando no existe una relación evolutiva con la consulta. Finalmente, los Métodos *Ab initio* están diseñados para construir modelos tridimensionales sin información alguna sobre proteínas homólogas o pliegues específicos (86,87).

Los enfoques basados en modelado por homología generalmente constan de cuatro pasos: (i) búsqueda de estructuras relacionadas (plantillas) con la secuencia objetivo, (ii) alineación de la secuencia objetivo y la(s) plantilla(s), (iii) construcción del modelo, y (iv) evaluación del modelo (88).

## Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional utilizado para predecir la interacción de dos moléculas generando un modelo de unión no covalente. Esto se realiza mediante la reproducción de potenciales químicos que determinan la preferencia de conformación unida y la energía libre de unión. Frecuentemente, el acoplamiento se realiza entre una molécula pequeña y una macromolécula, por ejemplo, el acoplamiento ligante-proteína. Sin embargo, el acoplamiento también se aplica para predecir el modo de unión entre dos macromoléculas, por ejemplo, el acoplamiento proteína-proteína (89,90).

Para comprender esta técnica es necesario conocer la teoría de enlazamiento de ligante-proteína en la cual se considera al ligante L y Proteína P en forma libre como reactivos de una reacción química en la cual el producto es el complejo ligante-proteína L-P y puede expresarse así:



*Ec. 1*

En equilibrio, la relación de concentración de reactivos y producto es constante en el tiempo y es igual a:

$$K_b = \frac{[LP]}{[L][P]} = \frac{1}{K_d}$$

*Ec. 2*

donde  $K_b$  es la constante de unión, los corchetes indican la concentración de equilibrio y  $K_d$  es la constante de disociación.

La reacción,  $L + P \rightleftharpoons LP$ , también se puede describir como un sistema termodinámico mediante la energía libre de Gibbs:

$$\Delta G^0 = -k_b T \ln(C^0 K_b)$$

*Ec. 3*

donde  $k_b$  es la constante de Boltzmann, T la temperatura y  $C^0$  es la concentración estándar de 1 M para todas las moléculas que reaccionan. De la ecuación anterior está claro que cuanto mayor es la constante de unión  $K_b$ , más negativa es la energía libre estándar de unión y mayor es la estabilidad termodinámica del complejo (91).

El acoplamiento consta de dos partes: (i) un método de muestreo para probar las estructuras de proteína-ligante en general (poses) y (ii) un sistema de puntuación para evaluar una pose asignándole un valor que refleja su precisión (92,93).

El propósito de la función de puntuación es delinear las posturas correctas de las posturas incorrectas. Las funciones de puntuación se pueden agrupar en tres familias: a) campo de fuerza de la mecánica molecular, b) funciones de puntuación empíricas y c) basadas en el conocimiento. El empleo de cada una de ellas depende de los objetivos a alcanzar (94).

a) En el campo de fuerza de la mecánica molecular, la energía incluye contribuciones intramoleculares e intermoleculares. Las moléculas se representan utilizando tipos de enlaces y átomos específicos del campo de fuerza con cargas parciales centradas en el átomo. La energía de enlace se deriva de un estiramiento de enlace, ángulo de enlace, ángulo de torsión y términos energéticos de ángulo de torsión. La energía electrostática se estima usando la ecuación de Coulomb, mientras que para la contribución de *van der Waals* se usa el término de energía de *Lennard-Jones* (94).

b) En las funciones de puntuación empírica, la energía de enlace se descompone en varios componentes energéticos, como el enlace de hidrógeno, la interacción iónica, el efecto hidrofóbico y la entropía de enlace. Cada componente se multiplica por un coeficiente y luego se suma para dar una puntuación final. Los coeficientes se obtienen a partir del análisis de regresión ajustado a un conjunto de prueba de complejos ligante-proteína con afinidades de unión conocidas (95).

c) Las funciones de puntuación basadas en el conocimiento se componen de múltiples características moleculares ponderadas relacionadas con los modos de unión ligante-receptor. Las características son a menudo las distancias átomo-átomo entre la proteína y el ligante en el complejo, pero también el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares o energías de contacto átomo-átomo. Como base de conocimientos se utiliza un gran número de cristales de difracción de rayos X de complejos proteína-ligante. Un supuesto complejo proteína-ligante puede evaluarse sobre la base de cuán similares son sus características a las de la base de conocimientos. Estas contribuciones se suman en todos los pares de átomos del complejo y la puntuación resultante se convierte en una función de pseudoenergía que estima la afinidad de unión (94).

En el acoplamiento se utiliza un método para muestrear el espacio configuracional de la manera más eficiente posible, generando así muchas estructuras Proteína-Ligante para la puntuación y la clasificación. En el momento de realizar el acoplamiento se deben considerar el algoritmo de muestreo, (ii) cómo se trata la flexibilidad molecular y (iii) si el acoplamiento será ciego (sitio de unión desconocido) o se centrará en una región particular de la proteína (un sitio de unión conocido o sospechado) (92,95).

Los algoritmos surgen debido a que en el acoplamiento existen varios grados de libertad. Seis grados de libertad de traslación y rotación de un cuerpo con respecto a otro y luego los grados de libertad conformacional del ligante y de la proteína. La búsqueda sistemática de todos los enlaces rotativos de una molécula no es eficiente computacionalmente porque el número de posibles combinaciones de los rotámeros aumenta exponencialmente con el número de

enlaces rotativos. La solución a esto son los algoritmos de muestreo que buscan explorar el espacio conformacional de una manera eficiente y rápida. Estos se pueden agrupar en enfoques deterministas y estocásticos. Los algoritmos deterministas son reproducibles, mientras que los algoritmos estocásticos incluyen factores aleatorios que no permiten una reproducibilidad total (93,94).

Por otro lado, para tratar la rigidez-flexibilidad del complejo ligante-proteína, existen cuatro posibilidades. En los extremos encontramos ligante rígido-proteína rígida, pero se comporta de manera tosca e inexacta, mientras que ligante flexible – proteína flexible no es rutinariamente factible. Actualmente los softwares de acoplamiento utilizan un comportamiento semiflexible en el cual se trata a la molécula pequeña (ligante) de manera flexible mientras que la proteína es tratada de manera rígida. Por último, algunos softwares manejan al ligante flexible y permiten la inclusión parcial de flexibilidad proteica usando solo un conjunto de residuos centrados cerca del presunto sitio de unión (92).

## Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular son una técnica computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema físico, químico o biológico compuesto por  $N$  partículas a través del tiempo. Este método se basa en la integración numérica directa de las ecuaciones clásicas de movimiento de Newton con especificaciones de un potencial de interacción interatómico de condiciones iniciales y de frontera adecuadas. El resultado del cálculo es una serie de estados/pasos sucesivos del sistema proporcionando una trayectoria que describe las posiciones y velocidades de las partículas en cada lapso de tiempo (96).

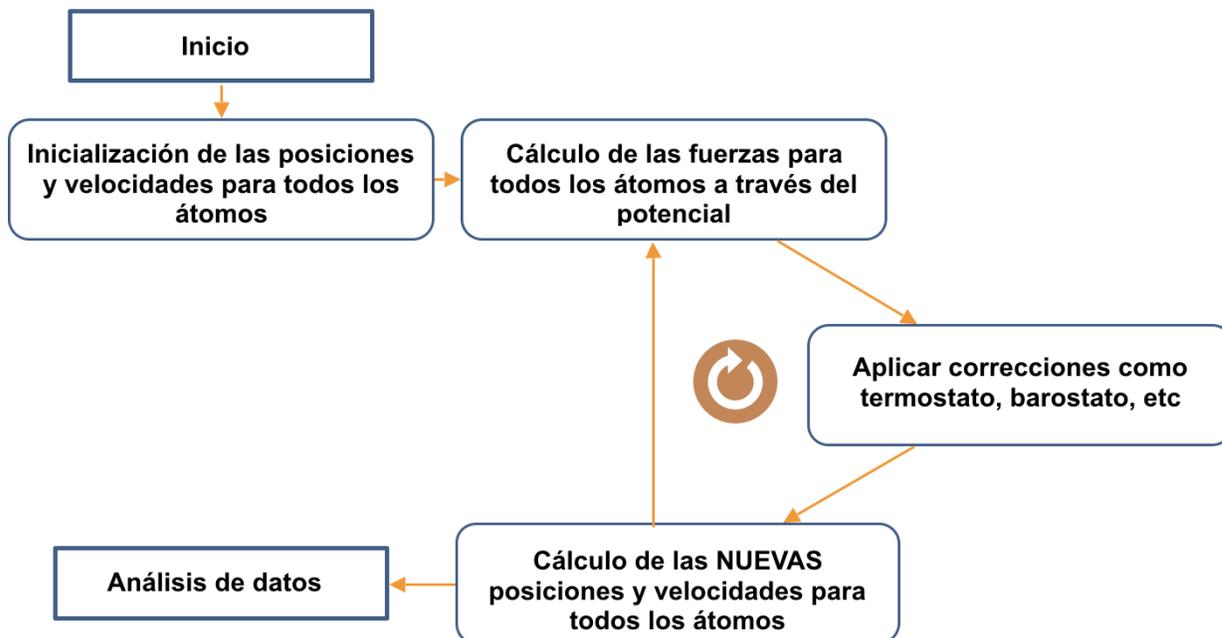
Para garantizar la estabilidad numérica, cada paso de tiempo en una simulación atomística de Dinámica molecular debe ser normalmente de unos pocos femtosegundos ( $10^{-15}$  s). En general, la mayoría de los eventos de interés bioquímico, tienen lugar en escalas de tiempo de nanosegundos, microsegundos o más, por lo que una simulación típica de un sistema biomolecular implica millones o billones de pasos de tiempo.

Por medio de la simulación de dinámica molecular, es posible calcular diferentes propiedades fisicoquímicas macroscópicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad, presión y temperaturas de cambio de fase por mencionar algunas. Además, en sistemas biológicos, permite determinar estabilidad macromolecular, propiedades conformacionales y alostéricas, la dinámica enzimática, el reconocimiento molecular, las propiedades de complejos, transporte de iones o moléculas pequeñas, plegamiento de proteínas, lo cual contribuye en el diseño de fármacos y proteínas, así como en el refinamiento de estos.

Para llevar a cabo una simulación de dinámica molecular la mínima información requerida es:

- Una lista de todos los átomos involucrados en la simulación.
- Coordenadas y velocidades iniciales de estos átomos

Los diferentes pasos generales se indican en la **figura 7**.



**Figura 7. Diagrama de flujo de una simulación de dinámica molecular.** Los diferentes pasos generales involucrados en una simulación de dinámica molecular son presentados. Los tres pasos señalados, cálculos de las fuerzas, aplicación de correcciones y cálculo de nuevas posiciones y velocidades, se realizan de manera iterativa dependiendo de la longitud del cálculo deseado por el usuario.

Es importante mencionar que, al querer realizar una simulación de un sistema biológico, tal como una proteína, es necesario tratar de replicar las condiciones fisiológicas. Otro aspecto importante es que debe comenzar a partir de un estado de mínima energía (97).

En esencia una simulación de dinámica molecular cuenta de 4 pasos:

1. **Preparación del sistema:** Se establece o elige la configuración inicial a utilizar compuesta de  $N$  átomos y se definen las condiciones de equilibrio.
2. **Equilibramiento:** Mediante diferentes esquemas o ensambles de simulación (microcanónico, canónico, isotérmico-isobárico), se lleva el sistema a un estado de equilibrio donde alguna propiedad especificada por el usuario fluctúa alrededor de un valor constante. Dependiendo del esquema a utilizar, se pueden definir condiciones constantes de energía, presión (P) y/o temperatura (T).
3. **Simulación:** Se define el tamaño de paso, tiempo y número de pasos de ejecución, luego se corre la dinámica molecular. Este es el paso que requiere mayor tiempo, pues puede ir de pocos picosegundos a nanosegundos (horas a semanas/meses). A lo largo de cada paso, se realiza el cálculo de las fuerzas que afectan a cada partícula en el sistema, lo que permite conocer su nueva posición y velocidad.
4. **Análisis:** Tenemos acceso a las posiciones atómicas, velocidades e incluso fuerzas en función del tiempo, por lo que se puede calcular cualquier propiedad que pueda expresarse en términos de dichas variables utilizando conceptos de mecánica

estadística. Además, se puede analizar la trayectoria o comportamiento del sistema por medio de visualizadores moleculares con interfaz gráfica (96,98).

En una simulación de dinámica molecular, los átomos se mueven de acuerdo con la segunda ley de Newton también conocida como ecuación de movimiento.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} U(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad i = 1, 2 \dots N$$

Ec. 4

Del lado izquierdo se presenta la fuerza como una función de la masa del átomo  $i$  por la segunda derivada de la posición  $r_i$  con respecto del tiempo  $t$ . Mientras que del lado derecho se presenta a la fuerza como el gradiente negativo de la energía potencial  $U$  que depende de las coordenadas  $(r_1, r_2, \dots, r_N)$  de los átomos. La energía potencial, representada a través del campo de fuerza, es la parte más crucial de la simulación ya que acopla el movimiento de los átomos.

La integración de la ecuación de movimiento para cada lapso de tiempo proporcionará la trayectoria de la simulación, sin embargo, debido a su complicada naturaleza, no existe una solución analítica para las ecuaciones de movimiento; por lo cual deben resolverse numéricamente.

Se han desarrollado diversos algoritmos numéricos para integrar las ecuaciones de movimiento como el algoritmo de Verlet estándar, el algoritmo de *leap-frog*, el algoritmo de velocidad de Verlet, el algoritmo de Beeman, así como el algoritmo de tipo corrector-predicor (98).

Debido a que la ecuación anterior sólo se puede resolver numéricamente, es necesario discretizar la trayectoria y usar un integrador para avanzar en pequeños pasos de tiempo:

$$r_i(t_0) \rightarrow r_i(t_0 + \Delta t) \rightarrow r_i(t_0 + 2\Delta t) \rightarrow \dots r_i(t_0 + n\Delta t)$$

Ec. 5

A continuación, procedemos a utilizar una simple expansión de Taylor:

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + \frac{dr_i(t_0)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 r_i(t_0)}{dt^2} \Delta t^2 + O(\Delta t^3)$$

Ec. 6

Este algoritmo es inestable e inexacto. Así que Verlet propuso una solución mejor. Si sumamos las expansiones de Taylor para  $+\Delta t$  y  $-\Delta t$ , los términos en  $\Delta t$ ,  $\Delta t^3$ , etc. se cancelan y obtenemos:

$$r_i(t_0 + \Delta t) = -r_i(t_0 - \Delta t) + 2r_i(t_0) + a_i(t_0)\Delta t^2 + O(\Delta t^4)$$

Ec. 7

Las velocidades no se utilizan en el algoritmo, pero se pueden obtener como:

$$v_i(t_0) = \frac{1}{2\Delta t} [r_i(t_0 + \Delta t) - r_i(t_0 - \Delta t)]$$

Ec. 8

El error intrínseco del algoritmo es  $O(\Delta t^4)$ . Dos algoritmos equivalentes que producen la misma trayectoria que el integrador de Verlet son el algoritmo de *leap-frog*:

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + v_i\left(t_0 + \frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t$$

Ec. 9

$$v_i\left(t_0 + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t_0 - \frac{\Delta t}{2}\right) + a_i(t_0)\Delta t$$

Ec. 10

Y el algoritmo de velocidad de Verlet:

$$r_i(t_0 + \Delta t) = r_i(t_0) + v_i(t_0)\Delta t + \frac{1}{2}a_i(t_0)\Delta t^2$$

Ec. 11

$$v_i(t_0 + \Delta t) = v_i(t_0) + \frac{1}{2}[a_i(t_0) + a_i(t_0 + \Delta t)]\Delta t$$

Ec. 12

## Campo de fuerza

En una simulación de dinámica molecular cada átomo experimenta una fuerza especificada por un campo de fuerza que representa la interacción de ese átomo con el resto de los átomos del sistema. Aquí se presentan fuerzas intramoleculares e intermoleculares expresados en una función matemática.

A continuación, se muestra la expresión general de un campo de fuerza clásico (por ejemplo, CHARMM) el cual emplea una función de energía potencial común que tiene las siguientes contribuciones:

$$U_{total} = U_{enlace} + U_{angulo} + U_{diedro} + U_{vdW} + U_{coulomb}$$

Ec. 13

$$U_{enlace} = \sum_{bonds\ i} k_i^{bond} (r_i - r_{0i})^2$$

Ec. 14

$$U_{angulo} = \sum_{angulo\ i} k_i^{angulo} (\theta_i - \theta_{0i})^2$$

Ec. 15

$$U_{diedro} = \sum_{diedro\ i} k_i^{diedro} [(1 + \cos(\eta_i \varphi_i - \gamma_i))]$$

Ec. 16

Los tres primeros términos describen las interacciones unidas por estiramiento del enlace, flexión del ángulo y torsión diédrica, donde los “*enlaces*” cuentan cada enlace covalente en el sistema, los “*ángulos*” son los ángulos entre cada par de enlaces covalentes que comparten un solo átomo en el vértice, y el “*diedro*” describe los pares de átomos separados por exactamente tres enlaces covalentes con el enlace central sujeto al ángulo de torsión  $\varphi$  (Phillips et al., 2005).

$$U_{vdw} = \sum_i \sum_{j>i} 4\varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

Ec. 17

$$U_{coulomb} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 r_{ij}}$$

Ec. 18

Los dos últimos términos describen interacciones entre pares de átomos no enlazados que corresponden a las fuerzas de *van der Waals* (aproximadas por un potencial de *Lennard-Jones*) y las interacciones electrostáticas (99).

# Metodología

La metodología de esta investigación ha sido dividida en 3 secciones.

## 1) Construcción del modelo de TRPV3 de *Bos Taurus*

### Modeller

Existen diversos programas para realizar modelado por homología como Modeller, SegMod/ENCAD, SWISS-MODEL, 3D-JIGSAW, Nest y Builder. Sin embargo, un estudio comparativo entre estos programas detalló que Modeller destacaba sobre los demás con base en 4 criterios: 1) la capacidad de producir coordenadas para todos los residuos en la alineación; (2) la velocidad con la que los programas producen modelos; (3) la similitud con la estructura correcta; y (4) la corrección fisicoquímica de los modelos (100).

Modeller es un programa de computadora que modela estructuras tridimensionales de proteínas y sus ensamblajes mediante la satisfacción de restricciones espaciales (101). Las restricciones son presentadas como funciones de densidad de probabilidad que se obtuvieron empíricamente a partir de una base de datos de alineaciones de estructuras de proteínas. Las restricciones pueden operar en distancias, ángulos, ángulos diedros, pares de ángulos diedros y algunas otras características espaciales definidas por átomos o pseudoátomos.

El procedimiento de modelado comienza con una alineación de la secuencia a modelar (objetivo) con estructuras 3D conocidas relacionadas (plantillas). Consecuentemente, las características espaciales, como las distancias  $C\alpha - C\alpha$ , los enlaces de hidrógeno y los ángulos diedros de la cadena principal y la cadena lateral, se transfieren desde las plantillas al objetivo. Así, se obtienen una serie de restricciones espaciales sobre su estructura.

Finalmente, el modelo se obtiene optimizando la función objetivo en el espacio cartesiano. La optimización se lleva a cabo mediante el uso del método de función objetivo variable empleando métodos de gradientes conjugados y dinámica molecular (101).

Para construir el modelo de la estructura de TRPV3 de la especie *Bos Taurus*, primero, se realizó la búsqueda de estructuras cristalográficas de la proteína TRPV3 en el *Protein Data Bank*, donde se encontraron un total de 22 estructuras disponibles de las cuales 11 eran pertenecientes a la especie *Mus musculus* y 11 eran de *Homo sapiens*.

Posteriormente, se resumieron las características de cada modelo en la **tabla 2**, la cual permitió facilitar la selección de plantilla con el fin de obtener las estructuras más adecuadas para los pasos subsecuentes. Los criterios para la selección fueron los siguientes: Conformación de la proteína, presencia de ligantes, identidad de secuencia y resolución.

**Tabla 2. Estructuras de TRPV3 de ratón (*mus musculus*) y humano (*homo sapiens*) obtenidas del Protein Data Bank en orden temporal en que fueron depositadas.**

| PDB ID      | Técnica de obtención | Resolución | Especie | Estado                | Ligante cocristalizado | Mutaciones    |
|-------------|----------------------|------------|---------|-----------------------|------------------------|---------------|
| 6DVW        | Cryo-EM              | 4.3 Å      | Ratón   | Cerrado               | Ninguno                | Ninguna       |
| <b>6DVY</b> | Cryo-EM              | 4.0 Å      | Ratón   | Supuestamente abierto | 2-APB                  | Ninguna       |
| 6DVZ        | Cryo-EM              | 4.24 Å     | Ratón   | Abierto               | 2-APB                  | Y564A         |
| 6MHO        | Cryo-EM              | 3.4 Å      | Humano  | Cerrado               | Ninguno                | T96A          |
| 6MHS        | Cryo-EM              | 3.2 Å      | Humano  | Sensibilizado         | Ninguno                | T96A          |
| <b>6MHV</b> | Cryo-EM              | 3.5 Å      | Humano  | Supuestamente abierto | 2-APB                  | T96A          |
| 6MHW        | Cryo-EM              | 4.0 Å      | Humano  | Supuestamente abierto | 2-APB                  | T96A          |
| 6MHX        | Cryo-EM              | 4.0 Å      | Humano  | Supuestamente abierto | 2-APB                  | T96A          |
| 6OT2        | Cryo-EM              | 4.1 Å      | Humano  | Cerrado               | Ninguno                | T96A<br>K169A |
| 6OT5        | Cryo-EM              | 3.6 Å      | Humano  | Supuestamente abierto | 2-APB                  | T96A<br>K169A |
| 6UW4        | Cryo-EM              | 3.1 Å      | Humano  | Cerrado               | Ninguno                | T96A          |
| 6UW6        | Cryo-EM              | 3.66 Å     | Humano  | Abierto               | Ninguno                | T96A<br>K169A |
| 6UW9        | Cryo-EM              | 4.33 Å     | Humano  | Abierto               | 2-APB                  | T96A<br>K169A |
| 6UW8        | Cryo-EM              | 4.02 Å     | Humano  | Abierto               | 2-APB                  | T96A<br>K169A |
| 6PVP        | Cryo-EM              | 4.48 Å     | Ratón   | Abierto               | Ninguno                | Y564A         |
| 6PVQ        | Cryo-EM              | 4.75 Å     | Ratón   | Sensibilizado         | Ninguno                | Y564A         |
| 6PVN        | Cryo-EM              | 4.07 Å     | Ratón   | Sensibilizado         | Ninguno                | Y564A         |
| 6PVO        | Cryo-EM              | 5.18 Å     | Ratón   | Sensibilizado         | Ninguno                | Y564A         |
| 6PVL        | Cryo-EM              | 4.4 Å      | Ratón   | Cerrado               | Ninguno                | Ninguna       |
| 6PVM        | Cryo-EM              | 4.5 Å      | Ratón   | Sensibilizado         | Ninguno                | Ninguna       |
| 6LGP        | Cryo-EM              | 3.3 Å      | Ratón   | Cerrado               | Ninguno                | Ninguna       |

Determinamos que las mejores plantillas fueron las depositadas con los códigos de PDB **6DVY** de *mus musculus* y **6MHV** de *homo sapiens*. Ambas plantillas están disponibles en el *Protein Data Bank* y se modificaron mediante el programa PyMOL con el objetivo de remover moléculas de agua, surfactantes, lípidos y ligantes, ya que se necesita tener un archivo que contenga únicamente la información relacionada con la proteína para el modelado por homología. La razón por la cual se decidió utilizar dos plantillas en lugar de una fue para obtener un modelo completo, ya que ambas plantillas presentaban *Loop's* no resueltos experimentalmente que se complementan entre sí.

Además de esto es necesario mencionar que TRPV3 es un canal homotetramérico transmembranal lo que quiere decir que está formado de cuatro protómeros idénticos por lo cual se tomó la decisión de modelar solo un protómero ya que esto permite a Modeller realizar

el modelaje de una manera más rápida y precisa; subsecuentemente se ensamblaron para formar el homotetrámero.

Después de esto se hizo la alineación de secuencias de las plantillas de *Mus musculus* y *Homo sapiens* con la secuencia objetivo de *Bos Taurus* con el uso de las herramientas BLASTp y Uniprot(102,103). Posteriormente, se diseñó el archivo script de comandos el cual le indica a Modeller como realizar el cálculo de modelado por homología. Este archivo fue configurado de tal manera que se construyeron 100 modelos con refinado "lento" usando el método de Automodel class.

La construcción de los modelos se llevó a cabo obteniendo como resultado un total de 100 modelos de los cuales se seleccionaron aquellos con las 10 mejores funciones de puntuación. De estos diez se seleccionó el que conservaba mejor las características estructurales.

Recordando que solo se modeló un protómero, se construyó el tetrámero de bTRPV3 alineando estructuralmente cada protómero a los respectivos protómeros en las posiciones de las plantillas utilizando el programa PyMOL.

Finalmente, para llevar a cabo el acoplamiento molecular y la simulación de dinámica molecular de diversos ligantes con bTRPV3 se decidió quitar el dominio de repetición de anquirina ya que este se encuentra en la parte intracelular con PyMOL, conservando así la región más relevante para nuestro estudio que es la región transmembranal la cual comprende las hélices S1 a S6 y el dominio TRP.

## 2) Ejecución de los cálculos de acoplamiento molecular entre bTRPV3 y diversos ligantes

### Autodock Vina

AutoDock Vina es un programa de código abierto para realizar acoplamiento molecular. AutoDock Vina ha sido comparado con un punto de referencia de detección virtual llamado Directory of Useful Decoys por el grupo Watowich, y se encontró que es "*un fuerte competidor e incluso en algunos aspectos superior contra los programas comerciales*".

Autodock Vina combina en su función de puntuación (*scoring function*), las ventajas de los potenciales basados en el conocimiento y las funciones de puntuación empírica de las cuales extrae información de las preferencias conformacionales, así como de las medidas de afinidad experimentales (90).

La forma funcional dependiente de la conformación de la función de puntuación de Autodock Vina es la siguiente:

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

Ec. 19

donde la sumatoria es sobre todo par de átomos que se pueden mover relativamente a otro, excluyendo interacciones 1–4, es decir, átomos separados por 3 enlaces covalentes consecutivos. A cada átomo  $i$  se le asigna un tipo  $t_i$ , y se define un conjunto de funciones de interacción  $f_{t_i t_j}$  de la distancia interatómica  $r_{ij}$ .

Las funciones de interacción  $f_{t_i t_j}$  son definidas con relación a la distancia de superficie teniendo en cuenta los radios de *van der Waals*  $R_t$ :

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j} \tag{Ec. 20}$$

$$f_{t_i t_j}(r_{ij}) \equiv h_{t_i t_j}(d_{ij}) \tag{Ec. 21}$$

En la función de puntuación,  $h_{t_i t_j}$  es la suma ponderada de interacciones estéricas, interacciones hidrófobas entre átomos hidrófobos y, en su caso, enlaces de hidrógeno.

El valor  $c$  también puede verse como la suma de la contribución intramolecular e intermolecular. El algoritmo de Autodock Vina intenta encontrar el menor valor de  $c$ .

$$c = c_{inter} + c_{intra} \tag{Ec. 22}$$

La energía libre de unión se calcula a partir de la conformación con el menor valor de puntuación, designado como 1:

$$S_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) \tag{Ec. 23}$$

Donde  $g$  puede ser una función arbitraria (posiblemente no lineal).

En la salida del programa (*output*) las otras conformaciones se calculan teniendo en cuenta el  $c_{intra}$  del mejor modo de unión:

$$S_1 = g(c_i - c_{intra}) \tag{Ec. 24}$$

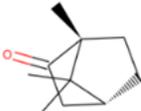
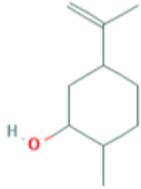
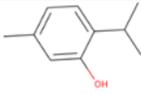
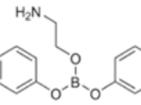
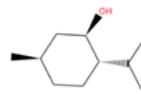
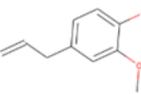
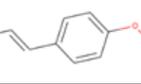
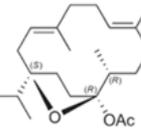
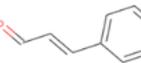
Para la realización de los cálculos de acoplamiento molecular para los sistemas de nuestro interés, se utilizó el programa *Autodock Vina* mientras que la preparación del sistema se realizó con el programa *Autodock tools*. Mientras que *Autodock Vina* tiene la función de realizar el acoplamiento y los cálculos de afinidad, *Autodock tools* permite realizar la preparación, visualización y análisis de los resultados del complejo proteína-ligante.

Para la preparación de la proteína, usualmente denominada receptor, generalmente se deben seguir una serie de pasos como remover moléculas de agua cristalográfica, corrección de

posiciones o inclusión de átomos, sin embargo, nuestro modelo generado por homología de bTRPV3 ya no presentaba éstos, por lo cual procedimos al siguiente paso que consiste en la adición de átomos de hidrógeno polares y de cargas.

Por otro lado, para los ligantes se decidió seleccionar un total de 9 agonistas considerando datos experimentales de la respuesta electrofisiológica del canal, así como también a las diferentes características químicas de los diversos agonistas, lo que proporciona un amplio panorama de los sitios clave de interacción de este canal (**Tabla 3**). Además, se optó por aquellos ligantes considerados como aceites esenciales.

**Tabla 3. Ligantes agonistas del canal de calcio TRPV3 seleccionados para realizar los cálculos de acoplamiento molecular (*molecular docking*).**

| Ligante                  | Estructura  | Potencial de Patch Clamp | Origen                     | ID Zinc/Pubch em CID | Referencia             |
|--------------------------|---|--------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|
| Alcanfor                 |    | 100%                     | <i>Cinnamomum camphora</i> | ZINC967520           | (Moqrich A, 2005)      |
| (+)-Dihidrocarveol (DHC) |   | 255±60%                  | <i>Tanacetum balsamita</i> | ZINC00967801         | (Vogt-Eisele AK, 2007) |
| Timol                    |  | 245±60%                  | <i>Thymus vulgaris</i>     | ZINC967597           | (Xu H, 2006)           |
| 2-APB                    |  | No reportado             | Sintético                  | PUB1598              | (Chung MK, 2004)       |
| (-)-Mentol               |  | 65±60%                   | <i>Lamiaceae</i>           | ZINC1482164          | (Macpherson LJ, 2006)  |
| Eugenol                  |  | No reportado             | <i>Syzygium aromaticum</i> | ZINC1411             | (Xu H, 2006)           |
| Anetol                   |  | No reportado             | <i>Pimpinella anisum</i>   | ZINC967630           | (Xu H, 2006)           |
| Acetato de Incensol      |  | No reportado             | <i>Boswellia Carterii</i>  | PUB73755086          | (Moussaieff A, 2008)   |
| Cinamal dehído           |  | No reportado             | <i>Cinnamomum verum</i>    | ZINC1532777          | (Macpherson LJ, 2006)  |

Las estructuras tridimensionales de los ligantes fueron obtenidas a partir de 2 diferentes bases de datos, ZINC12 y PUBCHEM(104,105). Tanto los átomos de hidrógeno polares como las cargas utilizando el método de Gasteiger, fueron añadidos utilizando el programa *Autodock tools* para todos los ligantes.

Una vez teniendo la proteína y los ligantes preparados se definió el centro y las dimensiones de la *Gridbox*, es decir; la región espacial en la cual deseamos se realice la búsqueda de la interacción ligante-proteína. El centro de la *gridbox* se estableció en las coordenadas: X=128.102, Y=128.135, Z=110.551 y sus dimensiones para nuestro estudio fueron las siguientes: X=106 Å, Y=90 Å, y Z=72 Å dando como resultado un volumen total de muestreo de 686,880 Å<sup>3</sup> con un espaciamiento de 1 Å.

A continuación, se ejecutó el cálculo usando *Autodock Vina*. Por defecto Autodock asigna una exhaustividad de 8 con 9 modos de unión a generar con intervalos de energía no mayores a 3 kcal/mol entre cada conformación, utilizando una “semilla” aleatoria para evitar posibles sesgos en los resultados. Además, aquí se usó un método semiflexible de acoplamiento ya que se trató a la proteína bTRPV3 de manera rígida mientras que cada ligante fue tratado de manera flexible.

Al finalizar el acoplamiento se obtuvieron un total de 9 archivos con nombre “ligante\_out.pdbqt”. Cada uno contiene un total de 9 posiciones las que corresponden a las más probables y/o estables ya que están determinadas por su energía donde la primera (1) tiene la menor energía y la última (9) es la de mayor energía.

Como último paso se analizaron las conformaciones de cada ligante con el programa PyMOL.

## **Acoplamiento de 2 protómeros**

Éste se realizó para explorar mejor el canal. Para esto, primero se tomó al homotetrámero y con el programa PyMOL se generó un nuevo archivo “bTRPV3pAB” el cual contiene a dos protómeros adyacentes. Posteriormente se definió el centro y las dimensiones de la *Gridbox* para este homodímero.

Las dimensiones en las coordenadas XYZ de la *gridbox* para este segundo acoplamiento fueron: X=78 Å, Y=82 Å, y Z=76 Å dando como resultado un volumen total de muestreo de 486,096 Å<sup>3</sup> con un espaciamiento de 1 Å. Las coordenadas del centro fueron: X=141.636, Y=138.552, Z=110.548.

De manera similar al primer acoplamiento se realizó un docking semiflexible, manteniendo la exhaustividad de 8 con 9 modos de unión a generar con intervalos de energía no mayores a 3 kcal/mol entre cada conformación, también utilizando una semilla aleatoria.

Para este acoplamiento se obtuvieron 9 archivos nombrados “ligante\_outpAB.pdbqt” los cuales también se analizaron con el visualizador PyMOL.

### 3) Ejecución de las simulaciones atomísticas de dinámica molecular

#### NAMD y CHARMM

NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*) es un programa de acceso libre desarrollando en la Universidad de Illinois, Urbana–Champaign en EE. UU. que realiza simulaciones de dinámica molecular. NAMD esta escrito usando el modelo de programación en paralelo Charm++ y ha mostrado gran eficiencia en realizar cálculos en paralelo, lo que permite que NAMD sea utilizado para investigar sistemas constituidos por millones de átomos. NAMD ofrece gran flexibilidad para realizar simulaciones de dinámica molecular utilizando diferentes campos de fuerza, incluyendo CHARMM, AMBER y GROMAC.

CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) es un campo de fuerza muy utilizado en simulaciones de dinámica molecular de macromoléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. De manera interesante, es recomendable utilizar el modelo de agua explícito TIP3P cuando se utiliza CHARMM ya que la parametrización del campo de fuerza se realizó utilizando dicho modelo.

Para la realización de las simulaciones de dinámica molecular se utilizaron los programas: VMD (*Visual Molecular Dynamics*) para visualización y preparación del sistema inicial y NAMD (*Nanoscale Molecular Dynamics*) para realizar los cálculos de simulaciones de dinámica molecular. El campo de fuerza que se utilizó durante las simulaciones fue el campo de fuerza de CHARMM36.

El ligante que se decidió estudiar fue el (+)-dihidrocarveol (**DHC**) debido a la alta actividad que presentó para activar al canal de calcio TRPV3 (**Tabla 3**). Una vez generado el complejo protéico, bTRPV3/DHC, se procedió a generar el sistema conteniendo todos los átomos y los respectivos estados de protonación de los diferentes residuos de la proteína. Por otro lado, los parámetros del ligante fueron adaptados utilizando la plataforma PARAMCHEM, la cual adapta los parámetros del campo de fuerza de CHARMM a nuestra molécula pequeña en particular. Las coordenadas del complejo serán tomadas de los resultados de acoplamiento molecular del ligante DHC de los modos de unión 1 y 7 de la **Tabla 8**.

El complejo fue embebido en una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina), hidratada con moléculas de agua. El sistema (Ver **Figura 8**) fue neutralizado utilizando iones de sodio (Na<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) de tal manera que se tenga una concentración salina de 0.15 M.

El sistema final está compuesto por alrededor de 115,000 átomos y fue expuesto a una etapa de pre-equilibrio que constó de cinco etapas:

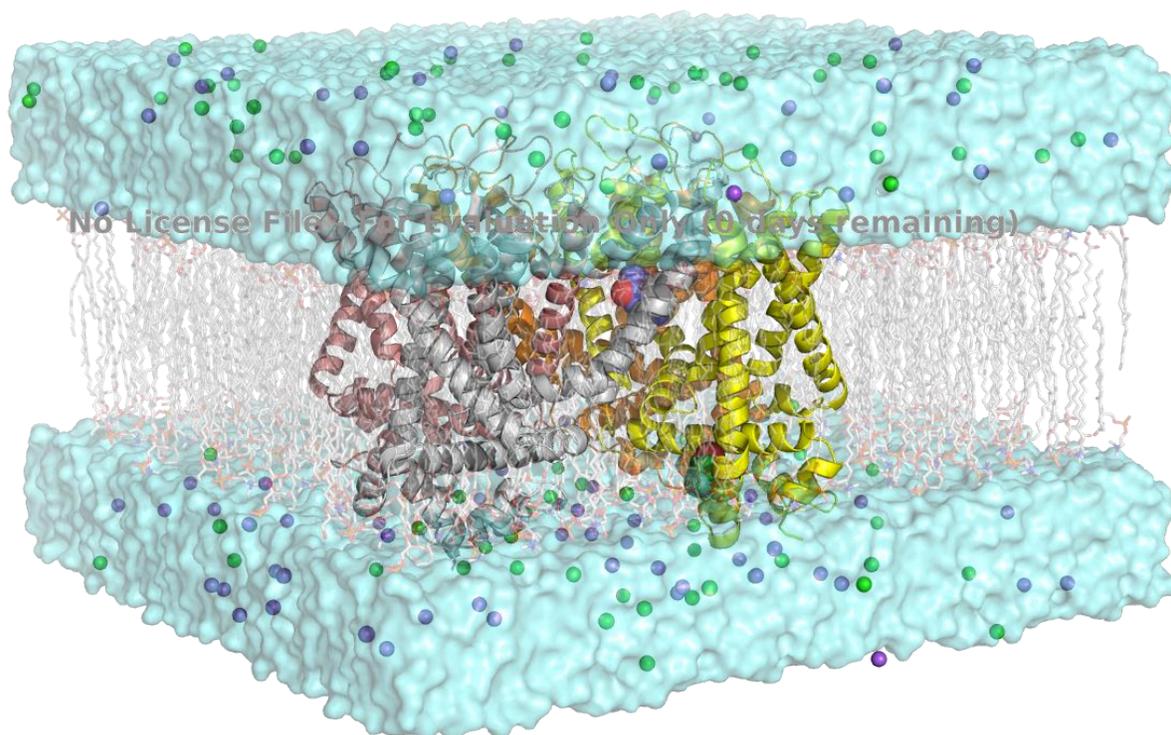
- 1) Minimización (10000 pasos de gradiente conjugado) del sistema y simulación corta de 100,000 pasos de 0.5 fs donde las colas de los fosfolípidos son permitidas moverse (*tail melting*).
- 2) Minimización (5000 pasos de gradiente conjugado) del sistema y simulación corta de 500,000 pasos de 1.0 fs donde se produce una fuerza en las moléculas de agua que penetran al interior de la membrana.

3) Minimización (2500 pasos de gradiente conjugado) del sistema y simulación corta de 500,000 pasos de 2.0 fs donde se restringen las posiciones de la proteína y el ligante con una constante de fuerza de  $1.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^2$ .

4) Minimización (2500 pasos de gradiente conjugado) del sistema y simulación corta de 500,000 pasos de 2.0 fs donde se restringen las posiciones de la proteína y el ligante con una constante de fuerza de  $0.5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^2$ .

5) Minimización (2500 pasos de gradiente conjugado) del sistema y simulación corta de 500,000 pasos de 2.0 fs donde se restringen las posiciones de la proteína y el ligante con una constante de fuerza de  $0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^2$ .

Después de la fase de pre-equilibrio se calculó una simulación de dinámica molecular por un tiempo de 120 ns utilizando un tamaño de paso de 2.0 fs, lo que corresponde a 60,000,000 pasos. En la **figura 13** se presenta una conformación representativa del sistema después del tiempo de simulación.



**Figura 8. Sistema preparado para las simulaciones atómicas de dinámica molecular.**

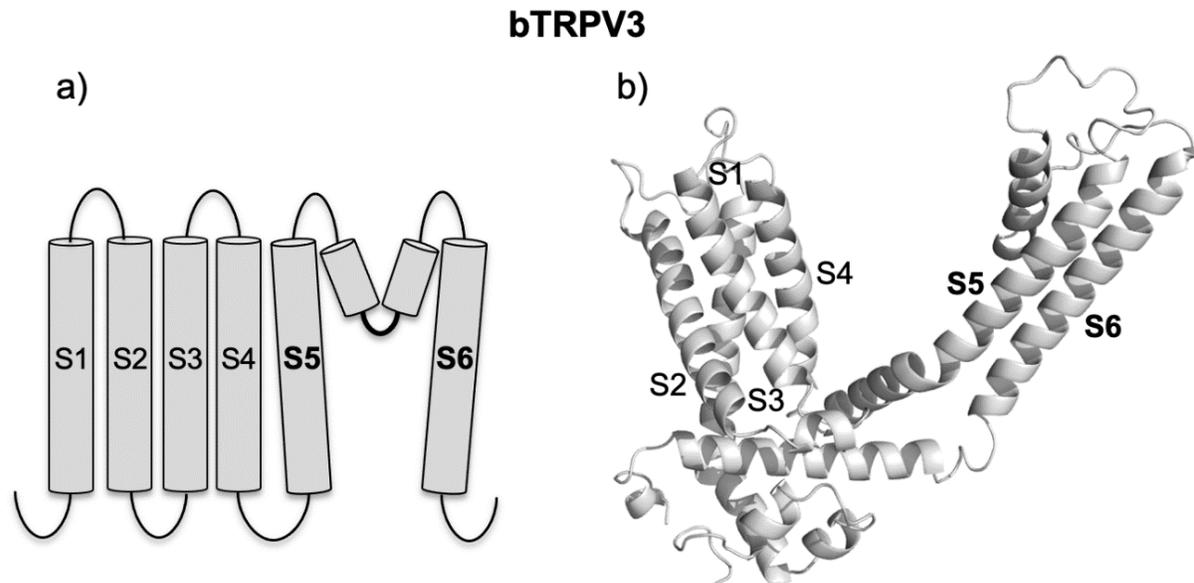
Se puede observar el homotetramero bTRPV3 hidratado con moléculas en agua en azul claro, rodeado del lípido POPC que simula la membrana celular en gris la región hidrófoba y rojo la región hidrófila, y neutralizado a concentración fisiológica de 0.15M con los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  representados por las esferas verdes y moradas.

## Resultados y Discusión

### Modelado por homología

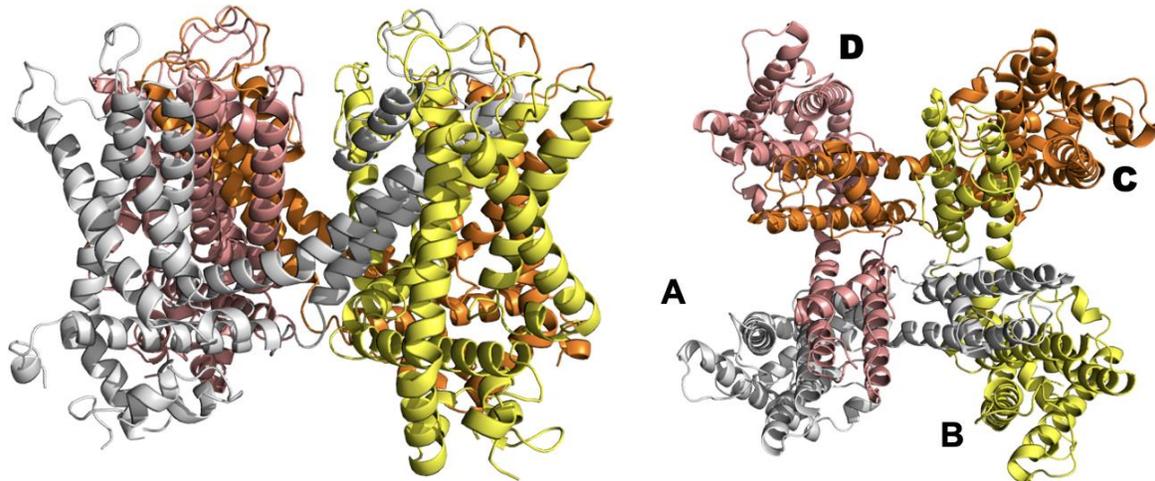
Utilizando el programa Modeller, el alineamiento de las secuencias de TRPV3 de las especies de *Bos Taurus*, *Homo Sapiens* y *Mus musculus* y las estructuras de los dos últimos depositadas en la base de datos PDB, **6MHV** y **6DVY**, respectivamente, se generaron 100 modelos de bTRPV3 que contienen a los átomos pesados (N, C, O y S).

Usando consideraciones tanto de la función de puntuación de Modeller como de la extensión de los segmentos denominados *loop*, se eligió el modelo representativo ilustrado en la **figura 9**. El modelo consta de los cuatro protómeros donde se observan las seis hélices transmembranales características de los canales de calcio; siendo las hélices S1-S4 las hélices que forman el dominio que forma el sensor de voltaje, mientras que las hélices S5 y S6 son aquellas que forman el dominio del poro (Ver **figura 9**). De manera interesante, el *loop* extracelular que conecta a las hélices S5 y S6 forma una estructura que penetra parcialmente al interior de la membrana y vuelve a salir hacia la región extracelular. Dicha estructura forma el filtro selectivo del canal. El modelado por homología solo incluyó la parte transmembranal del canal del calcio bTRPV3 (Ver **figura 9**), donde el dominio de anquirina fue excluido debido a que se consideró que el sitio de interacción con diferentes ligantes es más probable que se localice en la región transmembranal.



**Figura 9. Estructura del protómero del canal de calcio bTRPV3.** a) Esquema de la arquitectura de protómero del canal de calcio bTRPV3, donde se observan las seis hélices transmembranales, S1-S6. b) La estructura tridimensional del canal de calcio bTRPV3 obtenida a partir del modelado por homología.

El protómero obtenido durante el modelado por homología fue replicado y alineado estructuralmente a la estructura del hTRPV3 para generar la estructura homotetramérica característica del canal. En la **figura 10** se observa una vista extracelular del canal de calcio bTRPV3 que muestra los distintos dominios.



**Figura 10. Estructura homotetramérica del canal de bTRPV3.** Vistas laterales y extracelular del canal bTRPV3 donde las cadenas A, B, C y D, están mostradas con el color gris, amarillo, naranja y rosa, respectivamente.

A diferencia de las estructuras de las plantillas 6DVY y 6MHV, la estructura de bTRPV3 generada es la estructura nativa de la proteína debido a que no tiene ninguna mutación. Además, gracias al uso de 2 plantillas se generó un modelo completo, es decir, que no contiene *loop's* no resueltos.

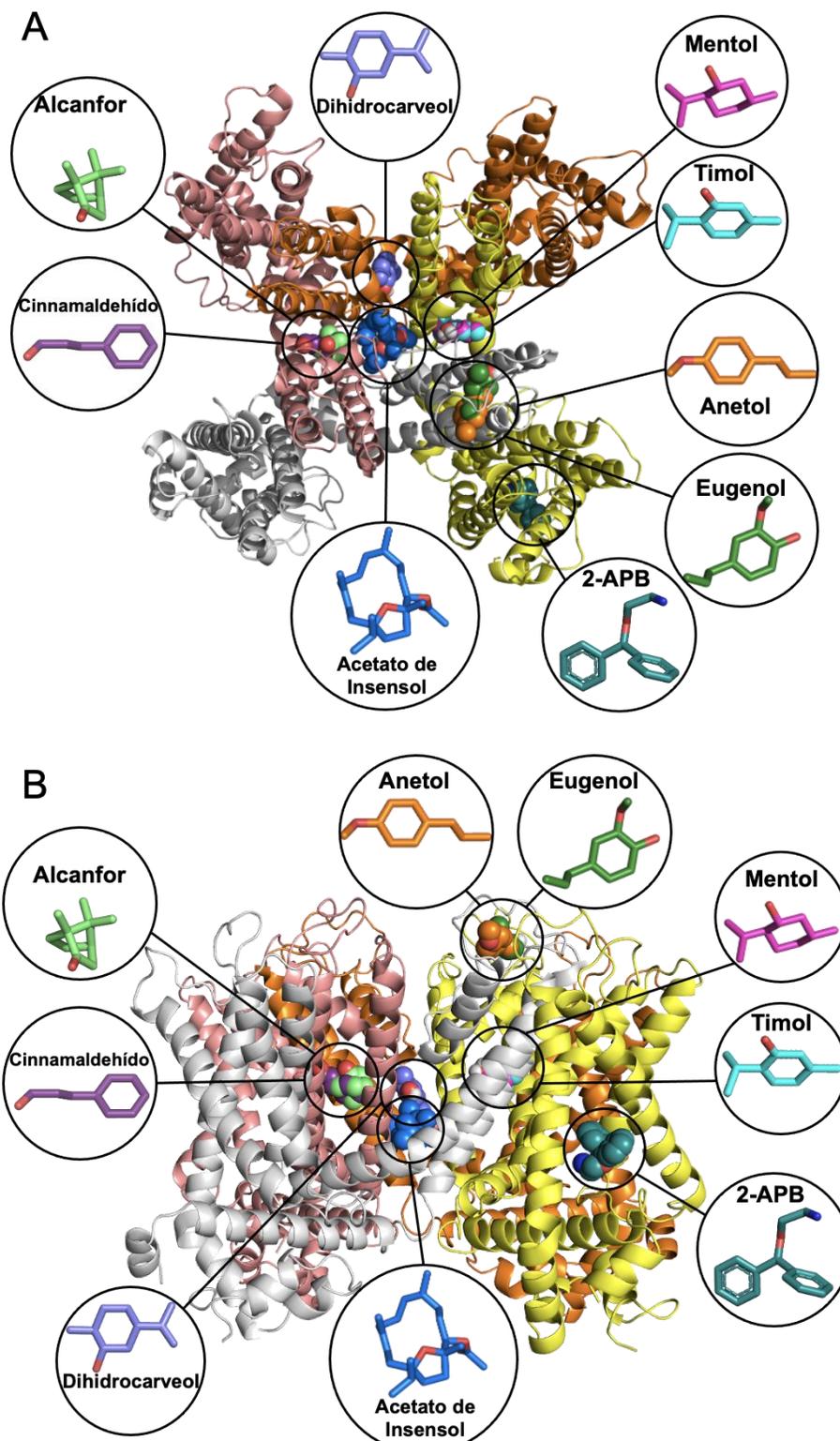
## Acoplamiento molecular

Para el cálculo de acoplamiento molecular se eligieron 9 aceites esenciales: (1) Alcanfor, (2) 2-APB, (3) Acetato de Insensol, (4) Dihidrocarveol, (5) Cinamaldehído, (6) Mentol, (7) Anetol, (8) Eugenol y (9) Timol. Los resultados del primer acoplamiento molecular con el homotetrámero de bTRPV3 reveló un total de 8 posibles sitios de interacción (ver **Tabla 4** y **figura 11**).

En la **tabla 5**, se resumen los 9 modos de unión en los 8 posibles sitios de interacción de los 9 ligantes seleccionados.

**Tabla 4. Sitios de interacción encontrados en el acoplamiento molecular del homotetrámero bTRPV3.** Ocho posibles sitios de interacción fueron identificados utilizando los cálculos de acoplamiento molecular.

| Sitio de unión  | Característica  |
|---|---|
| 1. Exp. Alcanfor (posición para alcanfor determinada experimentalmente) | Se reportó como potencial sitio de interacción de Alcanfor y los a.a. involucrados en este sitio se sitúa en el loop formado entre la hélice S5 y el dominio P. |
| 2. Hélice del poro  | La posición se centra entre las hélices del poro S5 de un protómero y la hélice S5 y el dominio P del protómero contiguo.                                       |
| 3. Dominio VSLD-TRP   | Se localiza entre las hélices S1 y S2 del dominio TRP.  |
| 4. Centro del poro S6   | Se sitúa en el centro del poro rodeado por las hélices S6 de los cuatro protómeros.   |
| 5. VSLD S1- Hélice S5   | Se localiza entre la hélice S1 de un protómero y la hélice S5 y el dominio P de otro protómero.   |
| 6. VSLD S1S4- Hélice S5   | Se sitúa entre las hélices S1 y S4 de un protómero y la hélice S5 del protómero continuo.   |
| 7. Doble dominio P  | Se centra entre 2 dominios P de dos protómeros.   |
| 8. Dominio P – Hélice S6  | Se localiza entre la hélice S6 de un protómero y el dominio P de otro protómero.  |



**Figura 11. Diferentes sitios de unión entre los ligandos y la estructura de canal bTRPV3.** Vista extracelular (A) y lateral de la estructura del canal bTRPV3 y la mejor posición, en términos energéticos, de nueve aceites esenciales. Las estructuras moleculares de todos los ligandos es indicada. Los protómeros de la estructura de bTRPV3 son ilustrados utilizando los mismos colores que en la **figura 10**.

**Tabla 5. Resultado de los modos de unión de 9 ligantes en el Homotetrámero de bTRPV3.** Se analizaron un total de 9 posiciones de cada ligante donde cada número corresponde a una posición.

| Ligante<br>Sitio de unión | Alcanfor            | 2-APB           | Acetato de<br>Insensol | Dihidrocarveol | Cinamaldehído | Mentol            | Anetol  | Eugenol | Timol         |
|---------------------------|---------------------|-----------------|------------------------|----------------|---------------|-------------------|---------|---------|---------------|
| Exp. Alcanfor             |                     | 9               |                        |                | 7             |                   | 1       | 1,2,8   |               |
| Hélice del poro           | 1,2,3,4,5,<br>6,7,8 |                 |                        | 1,2,3,4,5,6,7  | 1,2,3,4,5,6,8 | 1,2,3,5,6,<br>7,8 | 2,4,6,8 | 3,4,5   | 1,2,3,5,<br>7 |
| Dominio VSLD-TRP          | 9                   | 1,4             |                        |                |               | 4                 | 9       |         |               |
| Centro del poro S6        |                     |                 | 1,2,3,4,5,6            |                |               |                   |         |         |               |
| VSLD S1- Hélice S5        |                     |                 |                        | 8,9            |               | 9                 | 3,5,7   | 6,7,9   | 8,9           |
| VSLD S1S4- Hélice S5      |                     | 2,3,5,6,<br>7,8 |                        |                | 9             |                   |         |         | 4             |
| Doble dominio P           |                     |                 |                        |                |               |                   |         |         | 6             |
| Dominio P – Hélice S6     |                     |                 | 7,8,9                  |                |               |                   |         |         |               |

**Tabla 6. Energías de los modos de unión de los nueve ligantes estudiados con el Homotetrámero.** La energía relacionada con la afinidad de los ligantes en los distintos sitios de unión es reportada en unidades de kcal/mol.

| Ligante                    | Pose 1 | Pose 2 | Pose 3 | Pose 4 | Pose 5 | Pose 6 | Pose 7 | Pose 8 | Pose 9 |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Alcanfor</i>            | -6.7   | -6.7   | -6.7   | -6.6   | -6.6   | -6.5   | -6.5   | -6.5   | -6.4   |
| <i>2-APB</i>               | -7.0   | -6.7   | -6.7   | -6.7   | -6.6   | -6.6   | -6.5   | -6.5   | -6.4   |
| <i>Acetato de Incensol</i> | -8.6   | -8.6   | -8.6   | -8.6   | -8.2   | -8.2   | -7.5   | -7.5   | -7.5   |
| <i>Dihidro carveol</i>     | -6.6   | -6.5   | -6.5   | -6.4   | -6.3   | -6.3   | -6.1   | -6.1   | -6.0   |
| <i>Cinamal dehído</i>      | -5.9   | -5.9   | -5.7   | -5.7   | -5.7   | -5.6   | -5.5   | -5.5   | -5.4   |
| <i>Mentol</i>              | -6.3   | -6.1   | -6.1   | -6.0   | -6.0   | -6.0   | -5.9   | -5.8   | -5.6   |
| <i>Anetol</i>              | -6.2   | -6.0   | -6.0   | -5.9   | -5.8   | -5.8   | -5.8   | -5.7   | -5.7   |
| <i>Eugenol</i>             | -6.0   | -6.0   | -6.0   | -5.5   | -5.5   | -5.2   | -5.2   | -5.2   | -5.2   |
| <i>Timol</i>               | -6.7   | -6.7   | -6.6   | -6.6   | -6.6   | -6.1   | -6.1   | -6.1   | -6.1   |

Los resultados obtenidos del primer docking con el homotetrámero nos permitieron observar los sitios por los cuales los ligantes tienen preferencia. Una de las regiones que parece más relevante en los resultados es la “hélice del poro” ya que se observa como todos los ligantes, exceptuando al 2-APB y el acetato de incensol, se sitúan ahí. Además, la **tabla 5 y 6** permite ver que los modos de unión de más baja energía lo prefieren y se mantienen ahí.

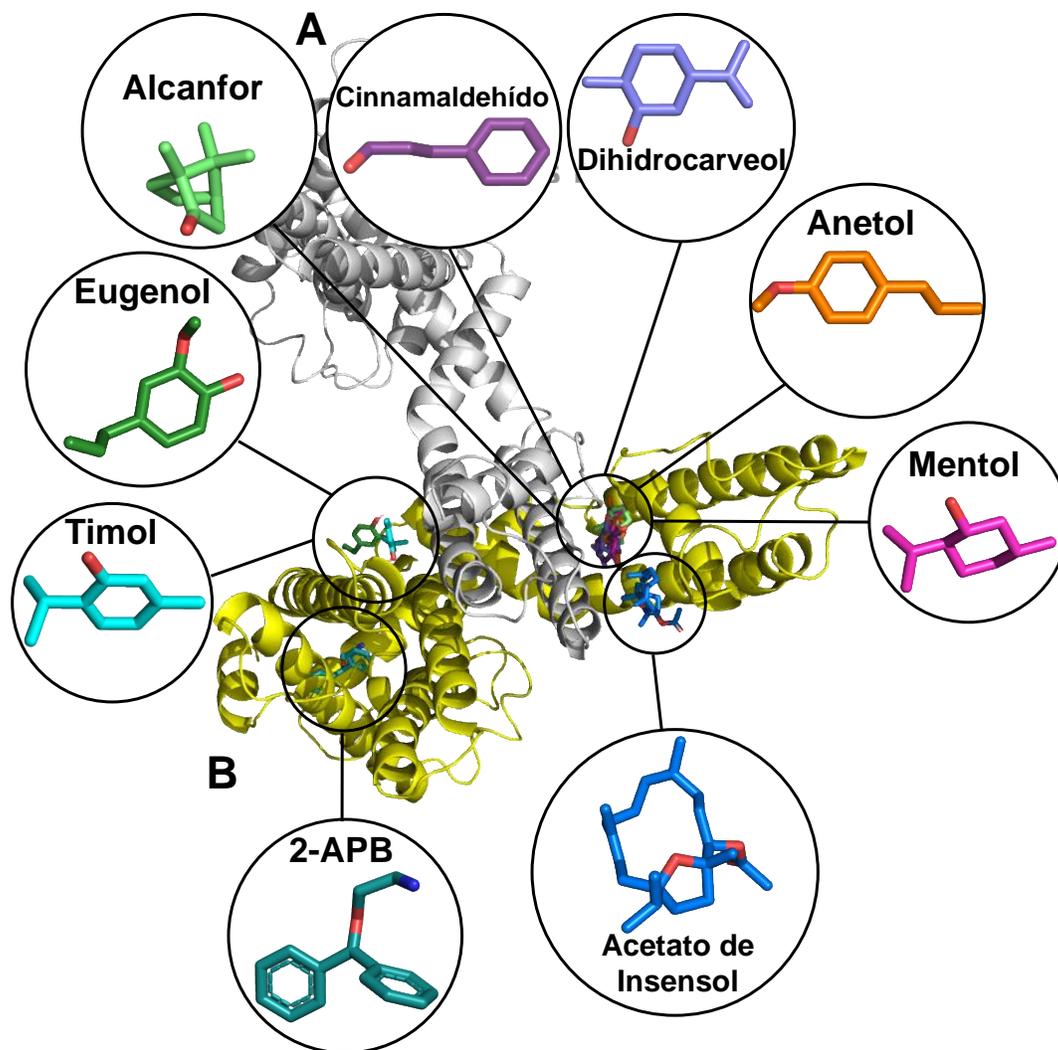
El sitio del “Centro del poro” y “Dominio P – Hélice S6” resultan particularmente interesantes ya que son los únicos sitios en los cuales se posicionó el acetato de incensol manteniéndose ahí, pero cambiando solo de conformación.

Es importante señalar que para el ligante 2-APB existe la posición “**Exp 2-APB**” la cual se ha demostrado de manera experimental como determinante en la permeabilidad a calcio y con mayor potencial de activación con respecto a alcanfor. Sin embargo, en nuestro acoplamiento molecular ningún ligante se posicionó ahí, ni siquiera el 2-APB. Además, para el ligante alcanfor, también existe un sitio de interacción reportado experimentalmente. Curiosamente para este sitio al cual nosotros denominamos “**Exp. Alcanfor**”, no se posiciona en ningún modo de unión por el alcanfor, pero sí para los ligantes: 2-APB posición 9, Cinamaldehído posición 7, Anetol posición 1, y Eugenol posiciones 1,2,3.

Estos resultados fueron obtenidos a partir del homotetrámero, un sistema biológico bastante amplio de aproximadamente 3000 aminoácidos cuyo objetivo primordial era mostrarnos si existía alguna interacción cerca del poro que pudiese modular su actividad y así fue al encontrar la posición “hélice del poro”.

Con el objetivo de evaluar a detalle los resultados anteriores para el canal bTRPV3, decidimos realizar un segundo acoplamiento bajo las mismas condiciones y con los mismos

ligantes, pero usando solo 2 protómeros (**figura 12**). La razón por la cual se decidió usar 2 protómeros en lugar de uno fue para mantener algunas interacciones entre las cadenas del homodímero.



**Figura 12. Diferentes sitios de unión entre los ligantes y la estructura homodimérica del canal bTRPV3.** Vista extracelular del canal bTRPV3 y la mejor posición, en términos energéticos, de los nueve aceites esenciales. Las estructuras moleculares de todos los ligantes es indicada. Las cadenas A y B de homodímero son ilustradas utilizando los mismos colores que en la **figura 10**.

Los resultados del segundo acoplamiento con el Homodímero son los siguientes:

A diferencia con el acoplamiento con el homotetrámero, para el acoplamiento con el homodímero, ningún ligante se posicionó en los sitios: Doble dominio P donde solo se situó timol y Centro del poro S6 donde solo se situó acetato de insensol. Para los demás sitios al menos una pose del ligante se situó en estos. Además, se hallaron 5 nuevas posiciones que se resumen a continuación.

**Tabla 7. Sitios de interacción encontrados en el acoplamiento molecular del homodímero bTRPV3.** Cinco nuevos posibles sitios de interacción fueron identificados utilizando los cálculos de acoplamiento molecular.

| Sitio de unión                    | Característica   |
|-----------------------------------|--|
| 1.Exp.2-APB                       | Fue reportado experimentalmente como el principal sitio de interacción del 2-APB, formando interacciones con los residuos H426 del dominio PreS1 y R696 del dominio TRP. |
| 2.Hélice S1- Hélice S2            | Se localiza por debajo del dominio VSLD entre las hélices 1 y 2 de un mismo protómero.   |
| 3.Transición Hélice 4 - Hélice S5 | Se sitúa por encima de la hélice S5 y a un lado de la hélice S4 de un mismo protómero.   |
| 4.Hélice Transmembranal S1-S2     | Se encuentra en la región transmembranal entre las hélices 1 y 2 de un mismo protómero.  |
| 5. <i>Loop's</i> VSLD             | Se localiza entre los loop del dominio VSLD  |

Todos los ligantes mantienen la preferencia por el sitio de unión “**Hélice del poro**” manteniéndose en esta región, pero cambiando su conformación.

Entre los sitios de unión que más llaman la atención en este segundo acoplamiento son Exp. alcanfor ya que 6 de los nueve ligantes exceptuando a 2-APB, acetato de insensol y alcanfor se posicionaron ahí. Para el caso de la posición “**Exp.2-APB**” solo el ligante dihidrocarveol y cinamaldehído se posicionaron ahí.

**Tabla 8.-Resultado de los modos de unión de 9 ligantes en el Homodímero de bTRPV3.** Se analizaron un total de 9 posiciones de cada ligante donde cada número corresponde a una posición.

| Ligante<br>Sitio de unión       | Alcanfor            | 2-APB            | Acetato de<br>Insensol | Dihidrocarveol | Cinamaldehído | Mentol | Anetol  | Eugenol | Timol   |
|---------------------------------|---------------------|------------------|------------------------|----------------|---------------|--------|---------|---------|---------|
| Exp. Alcanfor                   |                     | 9                |                        | 8,9            | 7             | 8      | 3,5     | 8       | 3,5,6,7 |
| Hélice del poro                 | 1,2,3,4,<br>5,6,7,8 | 1,2,3,<br>4,5,6, | 1,2,3,4,8              | 1,2,3          | 1,2,3,4,9     | 1,2,4  | 1,2,7,8 | 5       | 2       |
| Dominio VSLD-TRP                |                     |                  |                        | 5              | 5             | 3,5    |         | 2       |         |
| VSLD S1- Hélice S5              | 9                   | 3,6,8            |                        | 4,6            | 6             | 6,7    |         | 4,6     | 1,4,8,9 |
| VSLD S1S4- Hélice S5            |                     |                  |                        |                |               |        | 3,5,7   | 1,3     |         |
| Dominio P – Hélice S6           |                     | 2,3,5,<br>6,7,8  |                        |                |               |        |         |         |         |
| Exp.2-APB                       |                     |                  |                        | 7              | 8             |        |         |         |         |
| Hélice S1- Hélice S2            |                     |                  |                        |                |               | 9      |         | 7,9     |         |
| Transición Hélice 4 - Hélice S5 |                     |                  | 5                      |                |               |        |         |         |         |
| Hélice Transmembranal S1-S2     |                     |                  | 6,7,9                  |                |               |        | 4       |         |         |
| Loop VSLD                       |                     |                  |                        |                |               |        | 6       |         |         |

De los 5 nuevos sitios de unión hallados en este segundo docking el Exp. 2-APB nos pareció curioso ya que el dihidrocarveol y Cinamaldehído se posicionaron en esta región, pero el 2-APB no, lo cual resalta los hallazgos y diferencias de la investigación a nivel *in silico* vs *in vitro*.

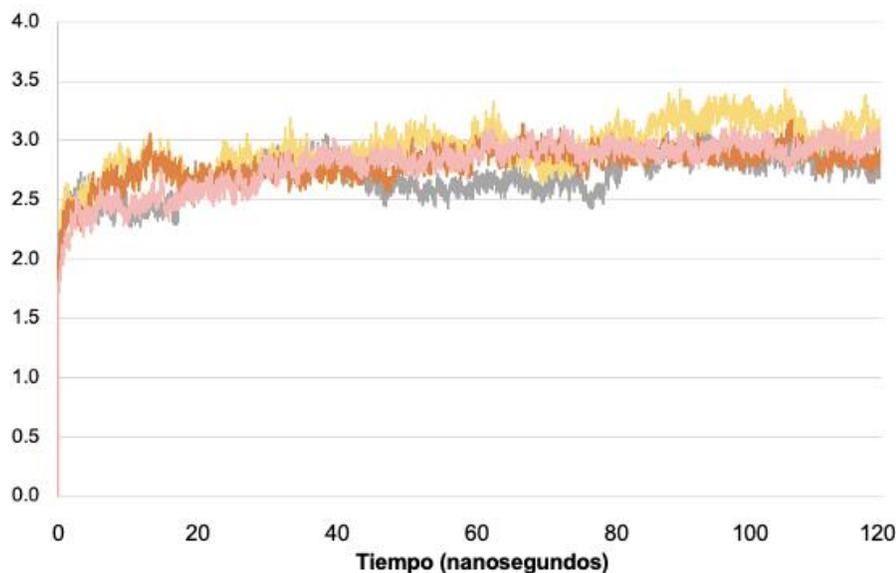
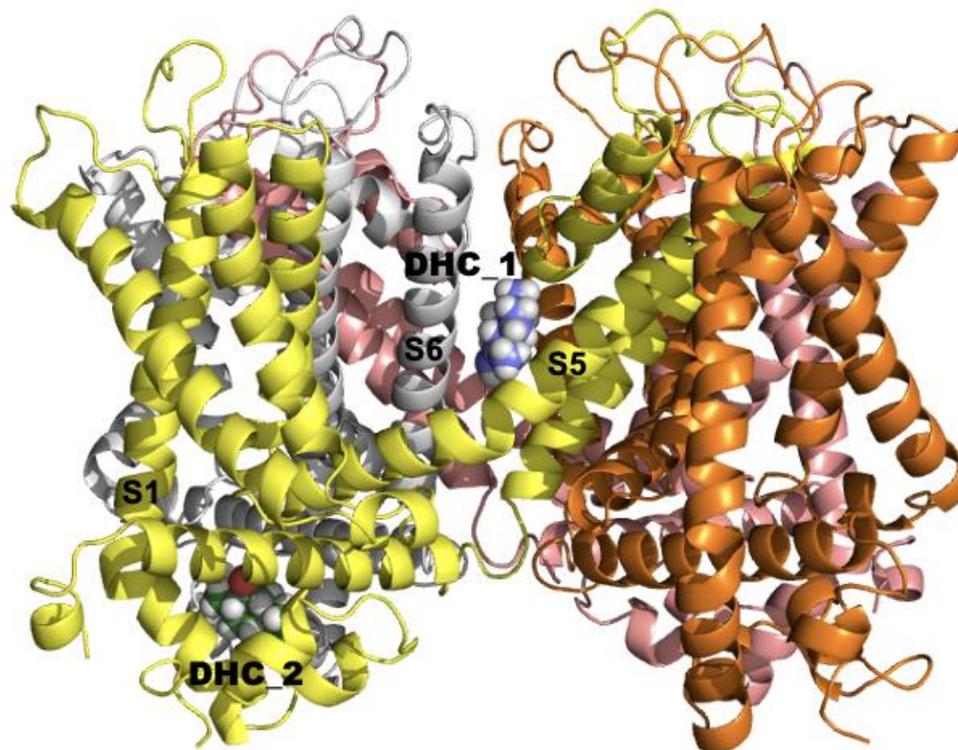
Otro aspecto relevante para resaltar fue que las posiciones con menor energía de afinidad prefirieron el sitio “Hélice del poro” justo como en el acoplamiento con el homotetrámero.

**Tabla 9. Energías de los modos de unión de los nueve ligantes estudiados con el Homodímero.**  
La energía relacionada con la afinidad de los ligantes en los distintos sitios de unión es reportada en unidades de kcal/mol.

| Ligante                    | Pose 1 | Pose 2 | Pose 3 | Pose 4 | Pose 5 | Pose 6 | Pose 7 | Pose 8 | Pose 9 |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Alcanfor</i>            | -6.7   | -6.5   | -6.5   | -6.3   | -6.3   | -5.9   | -5.9   | -5.8   | -5.8   |
| <i>2-APB</i>               | -7.0   | -7.0   | -6.7   | -6.7   | -6.7   | -6.7   | -6.5   | -6.4   | -6.3   |
| <i>Acetato de Insensol</i> | -7.5   | -7.5   | -7.5   | -7.1   | -6.7   | -6.7   | -6.6   | -6.6   | -6.6   |
| <i>Dihidrocarveol</i>      | -6.5   | -6.1   | -6.1   | -6.1   | -6.0   | -6.0   | -6.0   | -5.9   | -5.9   |
| <i>Cinamaldehído</i>       | -6.0   | -5.7   | -5.5   | -5.5   | -5.5   | -5.5   | -5.3   | -5.2   | -4.8   |
| <i>Mentol</i>              | -6.3   | -6.2   | -6.1   | -6.0   | -5.8   | -5.7   | -5.3   | -5.3   | -5.3   |
| <i>Anetol</i>              | -6.0   | -5.7   | -5.5   | -5.3   | -5.3   | -5.3   | -5.2   | -5.2   | -5.0   |
| <i>Eugenol</i>             | -6.0   | -5.7   | -5.6   | -5.3   | -5.0   | -4.8   | -4.8   | -4.7   | -4.6   |
| <i>Timol</i>               | -6.0   | -5.8   | -5.7   | -5.6   | -5.6   | -5.5   | -5.5   | -5.4   | -5.2   |

### Simulaciones atomísticas de dinámica molecular del complejo bTRPV3/DHC

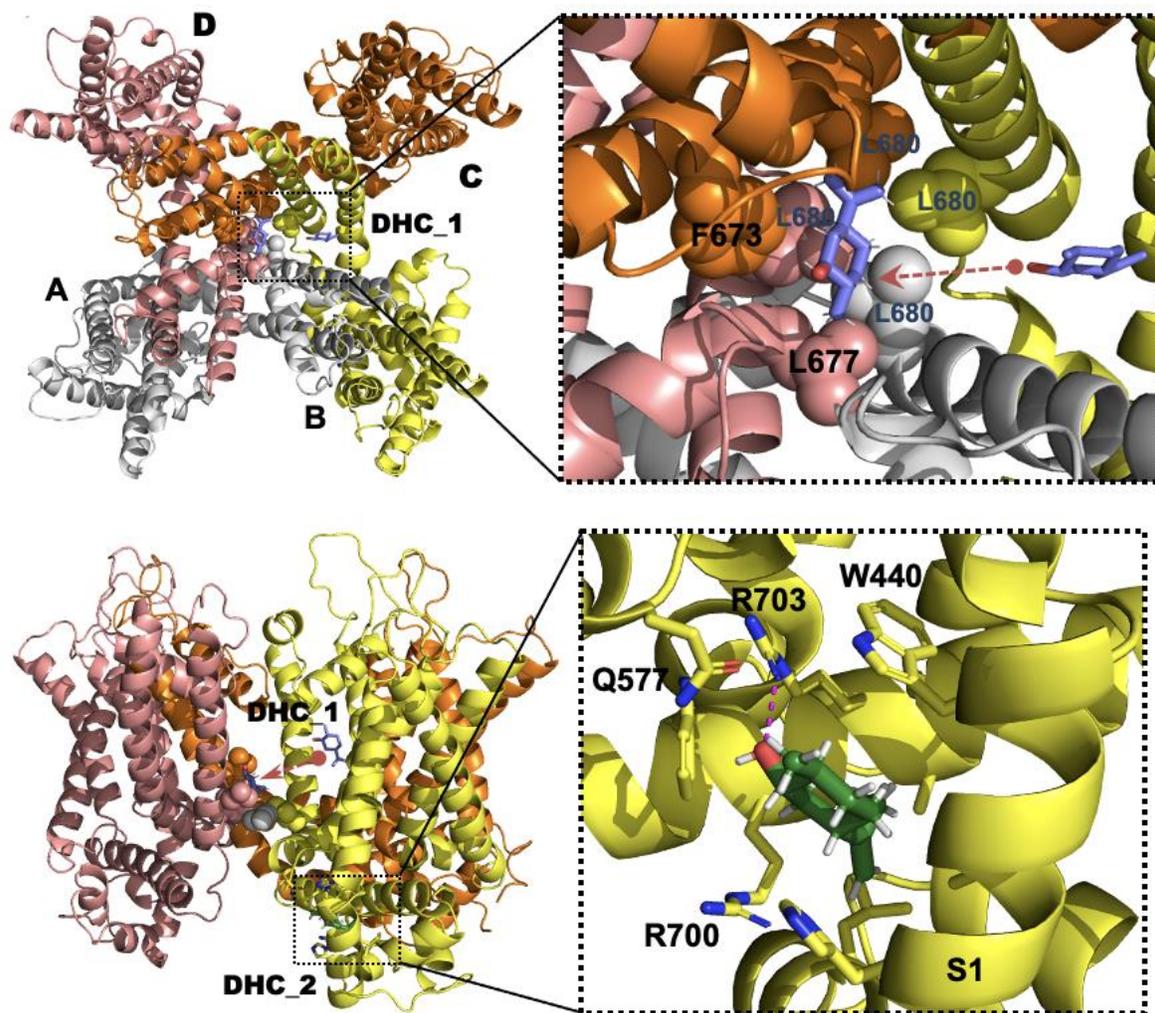
Partiendo de los resultados del acoplamiento molecular para el sistema bTRPV3/DHC se calculó una trayectoria de simulaciones de dinámica molecular. El sistema consta de los 4 protómeros del dominio transmembranal de bTRPV3 embebidos en una bicapa lipídica de POPC hidratada tanto en la parte extracelular como intracelular. El sistema tiene dos moléculas del ligante DHC localizadas en 2 posiciones diferentes, la primera cerca de la región del poro entre las hélices S6 de la cadena A y S5 de la cadena B. La segunda molécula de DHC está localizada en la cadena B del homotetrámero en la parte intracelular de la hélice S1. El sistema tiene una solución salina 0.15 M de cloruro de sodio y fue mantenido a una temperatura de 37 °C y a una presión de 1 atmósfera. El sistema inicial, compuesto por 114,247 átomos, es ilustrado en la **figura 13**.



**Figura 13. Estructura del complejo bTRPV3/DHC.** Vista lateral del complejo bTRPV3/DHC donde se pueden observar las dos posiciones seleccionadas para el ligante DHC. DHC\_1 (coloreada en morado) se encuentra localizada en la región del poro entre las hélices S6 de la cadena A (gris) y S5 de la cadena B (amarillo) mientras que DHC\_2 (verde) se localiza en la cadena B (amarillo) del homotetrámero en la parte intracelular de la hélice S1. En el panel inferior se observa una gráfica de valores de RMSD (*root-mean-square deviation*) para los átomos de la cadena principal de los residuos que constituyen a las seis hélices transmembrales (S1-S6) para cada cadena (A en gris, B en amarillo, C and anaranjado y D en salmón).

El sistema fue examinado utilizando la técnica de simulaciones de dinámica molecular por 60,000,000 de pasos de un tamaño de 2.0 fs para un total de 120 ns. Los cálculos estructurales de los valores de RMSD para los átomos de la cadena principal de los residuos que componen a las 6 hélices transmembranales muestran que la proteína alcanza valores estables cercanos a 3.0 Angstroms alrededor de 40 ns.

**Interacciones ligante-proteína de las poses DHC\_1 y DHC\_2.** En términos de las poses de las moléculas del ligante, los resultados indican que, mientras la pose DHC\_2 se mantiene relativamente estable y cambia muy poco en relación con la posición inicial, la pose DHC\_1 se desplaza hacia la zona central del poro en una posición localizada en la parte superior de la región más estrecha del poro, la cual está formada por los residuos L680 de cada cadena (**figura 14**). En esta posición, el grupo hidroxilo del ligante interactúa con moléculas de agua que se encuentran en la cavidad del poro sin que establezca interacciones polares con la proteína. Aquí, las interacciones ligante-proteína están mediadas enteramente por fuerzas hidrofóbicas. Por su parte, la pose DHC\_2 forma interacciones tanto polares, principalmente con el residuo R703, como interacciones hidrofóbicas con L427 y I707, así como son la región hidrofóbica de las cadenas laterales de R700 y R703.



**Figura 14. Resultados de las simulaciones de dinámica molecular del complejo bTRPV3/DHC.** Diferentes vistas de la estructura del complejo al final de la trayectoria de 120 ns. Mientras que la posición DHC\_2 se mantuvo y sólo hubo un reacomodo de las interacciones del grupo hidroxilo del ligante para permitir interacciones polares con R703 principalmente (línea punteada magenta), la posición de la pose molecular DHC\_1 sufrió cambios importantes. De manera interesante, se observa un desplazamiento del ligante (flechas rojas) hacia el centro del poro y hacia la región más estrecha del mismo, compuesta por los residuos L680 de cada cadena. El ligante se posiciona hacia el residuo aromático F673 de la cadena C y el residuo L677 de la cadena D.

## Conclusiones

Se utilizaron diversas técnicas computacionales para la caracterización de la estructura tridimensional del canal de calcio de *Bos taurus* TRPV3 (bTRPV3). En particular, se utilizó la técnica de modelado por homología, así como las estructuras disponibles de TRPV3 de ratón y de humano, para generar la estructura homotetramérica del canal de calcio bTRPV3. La estructura tridimensional del bTRPV3 sirvió para identificar los posibles sitios de interacción de 9 aceites esenciales: Alcanfor, 2-APB, Acetato de Insensol, Dihidrocarveol, Cinamaldehído, Mentol, Anetol, Eugenol y Timol. El análisis de los resultados del acoplamiento molecular sugiere un total de 13 posibles sitios de interacción para estos ligantes con el canal bTRPV3. Con la idea de validar nuestros hallazgos derivados del acoplamiento molecular debido a las limitaciones conocidas de dicha técnica computacional, se decidió investigar uno de los compuestos mediante la técnica computacional de simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Debido a la alta afinidad identificada experimentalmente del ligante (+)-dihidrocarveol (DHC) por el receptor TRPV3, se eligió como el compuesto a investigar mediante las simulaciones de dinámica molecular. En particular, se evaluaron dos poses posibles del compuesto DHC, denominadas DHC\_1 y DHC\_2. La pose DHC\_1 se localiza cerca de la región del poro entre las hélices S6 de la cadena A y S5 de la cadena B. Por otro lado, la pose DHC\_2 se encuentra en proximidad a la cadena B del homotetrámero en la parte intracelular de la hélice S1. El sistema inicial de la simulación consta de la estructura homotetramérica del canal bTRPV3, dos moléculas del ligante DHC, una bicapa lipídica del fosfolípido POPC hidratada con moléculas de agua a una concentración salina de 0.15 M de cloruro de sodio. El sistema tuvo un número de átomos cercano a 115,000 y fue simulado a una temperatura de 37 °C y a una presión de 1 atmósfera. Los resultados de las simulaciones sugieren que alrededor de 40 ns, la estructura del canal bTRPV3 ha alcanzado un equilibrio estructural ya que sus valores de RMSD para los átomos de la cadena principal de los residuos que componen a las 6 hélices transmembranales varían alrededor de 3.0 Angstroms. A lo largo de la trayectoria de 120 ns, se observaron diferentes comportamientos de las dos poses. Mientras que la molécula DHC\_2 parece estabilizarse en un sitio de unión a ligante muy similar a la pose inicial obtenida en los cálculos de acoplamiento, la molécula de DHC\_1 se desplazó a otra región diferente y más cercana al poro del canal. Los resultados de nuestro trabajo muestran la factibilidad de caracterizar las interacciones de ligantes de bajo peso molecular con el canal bTRPV3 al mismo tiempo que sienta las bases para estudios detallados sobre la activación del canal del calcio TRPV3 por ligantes naturales de origen vegetal.

## Perspectivas

Finalmente, estos datos serán la base para la búsqueda subsecuente de compuestos de origen vegetal, entre ellos aceites esenciales, asequibles para ser considerados como suplementos alimenticios, que sean capaces de modular de manera específica al canal bTRPV3 y mejorar así la producción de leche.

## Referencias

1. Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 2014.
2. Warinner C, Hendy J, Speller C, Cappellini E, Fischer R, Trachsel C, et al. Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. *Sci Rep*. 2014;
3. CFR - Code of Federal Regulations Title 21.
4. Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids in Health and Disease*. 2007.
5. Lindmark-Månsson H, Fondén R, Pettersson HE. Composition of Swedish dairy milk. *Int Dairy J*. 2003;
6. Marangoni F, Pellegrino L, Verduci E, Ghiselli A, Bernabei R, Calvani R, et al. Cow's Milk Consumption and Health: A Health Professional's Guide. *Journal of the American College of Nutrition*. 2019.
7. Drewnowski A. The contribution of milk and milk products to micronutrient density and affordability of the U.S. Diet. *J Am Coll Nutr*. 2011;
8. Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. 2013.
9. Fortuna A, Oreamuno MAA, Maria G, Lucarelli L, Marocco E, Milo M. Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets. *Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets*. 2020.
10. Prevé Agricultura aumento de 2.4 por ciento en producción de leche en 2020 | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2020 Dec 31]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/preve-agricultura-aumento-de-2-4-por-ciento-en-produccion-de-leche-en-2020?idiom=es>
11. Elcoso G, Zweifel B, Bach A. Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating dairy cows. *Appl Anim Sci*. 2019 Jun 1;35(3):304–11.
12. Hippen AR, Schingoethe DJ, Kalscheur KF, Linke PL, Rennich DR, Abdelqader MM, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in dairy cow diets containing dried distillers grains plus solubles. *J Dairy Sci*. 2010;
13. Pretz JP. Improving Feed Efficiency Through Forage Strategies for Increasing Dairy Profitability and Sustainability. 2016;
14. Borchers R. Proteolytic Activity of Rumen Fluid In Vitro. *J Anim Sci*. 1965;
15. Braun HS, Schrapers KT, Mahlkow-Nerge K, Stumpff F, Rosendahl J. Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: Evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. *Animal*. 2019;
16. Rosendahl J, Braun HS, Schrapers KT, Martens H, Stumpff F. Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the ruminal epithelium. *Pflugers Arch Eur J Physiol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Jan 7];468(8):1333–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27184746/>
17. Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F. The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *PLoS One* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Jan 7];13(3). Available from: </pmc/articles/PMC5832270/?report=abstract>
18. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2007 Jun 2 [cited

- 2021 Jan 7];151(4):530–40. Available from: /pmc/articles/PMC2013969/?report=abstract
19. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage [Internet]. Vol. 6, Pharmacognosy Reviews. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2012 [cited 2020 Dec 15]. p. 1–5. Available from: /pmc/articles/PMC3358962/?report=abstract
  20. Caissard J, Joly C, Bergougnot V, Huguency P, Mauriat M, Baudino S. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Res Dev Cell Biol.* 2004;2(January):1–15.
  21. Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* [Internet]. 2001 [cited 2020 Dec 17];34(1):3–21. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013386921596>
  22. Li Y, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F. History, Localization and Chemical Compositions. In Springer, Cham; 2014 [cited 2020 Dec 17]. p. 1–8. Available from: [https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-08449-7\\_1](https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-08449-7_1)
  23. Firenzuoli F, Jaitak V, Horvath G, Bassolé IHN, Setzer WN, Gori L. Essential oils: New perspectives in human health and wellness [Internet]. Vol. 2014, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation; 2014 [cited 2020 Dec 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4090492/>
  24. Vanhaelen M, Pereira FDO, Mendes JM, Lima IO, Mota KSDL, Oliveira WA De, et al. *The Encyclopedia of Essential Oils: The Complete Guide to the Use of Aromatic Oils in Aromatherapy, Herbalism, Health & Well-Being.* Bioresource Technology. 2002.
  25. ISO. Aromatic natural raw materials-vocabulary. In: International Organization for Standardization, editor. International Standard 9235. Geneva, Switzerland; 2013.
  26. Zuzarte M, Salgueiro L. Essential oils chemistry. In: Bioactive Essential Oils and Cancer [Internet]. Springer International Publishing; 2015 [cited 2020 Dec 17]. p. 19–61. Available from: [https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-19144-7\\_2](https://link-springer-com.proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-19144-7_2)
  27. Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Al-sadi M. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants : A review *Biosynthesis of essential oils in aromatic plants : A review.* *Food Rev Int* [Internet]. 2016;32(2):117–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2015.1057841>
  28. Langenheim J. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany.* 2003 [cited 2020 Dec 21]; Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=earth.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=015529>
  29. Abdulwahid Ali Almarie A. Roles of Terpenoids in Essential Oils and Its Potential as Natural Weed Killers: Recent Developments. In: *Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications* [Internet]. IntechOpen; 2020 [cited 2020 Dec 21]. Available from: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
  30. Fotsing Yannick Stephane F, Kezetas Jean Jules B. Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils. In: *Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications* [Internet]. IntechOpen; 2020 [cited 2020 Dec 21]. Available from: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
  31. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem*

- Eng Biotechnol. 2015;148(January 2015):63–106.
32. Nagegowda DA. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. Vol. 584, FEBS Letters. No longer published by Elsevier; 2010. p. 2965–73.
  33. Seigler DS, Seigler DS. Phenylpropanoids. In: Plant Secondary Metabolism [Internet]. Springer US; 1998 [cited 2020 Dec 28]. p. 106–29. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4913-0\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-4913-0_8)
  34. Deng Y, Lu S. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants. CRC Crit Rev Plant Sci [Internet]. 2017;36(4):257–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402852>
  35. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. Mol Plant [Internet]. 2010;3(1):2–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssp106>
  36. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. Vol. 25, Critical Reviews in Plant Sciences. 2006. p. 417–40.
  37. Holopainen JK. Multiple functions of inducible plant volatiles. Trends Plant Sci [Internet]. 2004 [cited 2020 Dec 17];9(11):529–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501177/>
  38. Basílio IJLD, Araujo ND, Silva RC. Pharmacobotanical aspects of aromatic plants. In: Bioactive Essential Oils and Cancer [Internet]. Springer International Publishing; 2015 [cited 2020 Dec 17]. p. 63–79. Available from: [https://link.springer.com/proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-19144-7\\_3](https://link.springer.com/proxydgb.buap.mx/chapter/10.1007/978-3-319-19144-7_3)
  39. Science KE-S, 1960 undefined. Anatomy of seed plants. journals.lww.com [Internet]. [cited 2020 Dec 17]; Available from: [https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1960/08000/Anatomy\\_of\\_Seed\\_Plants.31.a.spx](https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1960/08000/Anatomy_of_Seed_Plants.31.a.spx)
  40. Sousa DP de. Medicinal essential oils [Internet]. Nova Science Publishers; 2012 [cited 2020 Dec 18]. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300003181>
  41. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability - Google Libros [Internet]. [cited 2020 Dec 18]. Available from: [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=ax1OvyH8jGoC&oi=fnd&pg=PA42&dq=chemistry+of+essential+oils+heidelberg&ots=kfCNnDgCYx&sig=2huhibl wqhPM\\_Dh8Qz6WanlQdkk&redir\\_esc=y#v=onepage&q=chemistry of essential oils heidelberg&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=ax1OvyH8jGoC&oi=fnd&pg=PA42&dq=chemistry+of+essential+oils+heidelberg&ots=kfCNnDgCYx&sig=2huhibl wqhPM_Dh8Qz6WanlQdkk&redir_esc=y#v=onepage&q=chemistry of essential oils heidelberg&f=false)
  42. Djilani A, Dicko A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. In: Nutrition, Well-Being and Health [Internet]. InTech; 2012 [cited 2020 Dec 28]. Available from: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
  43. Mercado mundial de aceites esenciales: estadísticas y hechos | Statista [Internet]. [cited 2020 Dec 28]. Available from: <https://www.statista.com/topics/5174/essential-oils/>
  44. Aumeeruddy-Elalfi Z, Gurib-Fakim A, Mahomoodally MF. Antimicrobial and Antibiotic Potentiating Activity of Essential Oils From Tropical Medicinal Herbs and Spices [Internet]. Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Elsevier Inc.; 2016. 271–289 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00013-7>
  45. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Vol. 46, Food and Chemical Toxicology. Pergamon; 2008. p. 446–75.

46. Naeem A, Abbas T, Mohsin T, Hasnain A. Brief Background and Uses. *Ann Short Reports*. 2018;1(1):1–3.
47. Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2014;62:250–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
48. Belanche A, Newbold CJ, Morgavi DP, Bach A, Zweifel B, Yáñez-Ruiz DR. A meta-analysis describing the effects of the essential oils blend agolin ruminant on performance, rumen fermentation and methane emissions in dairy cows. *Animals*. 2020;
49. Foskolos A, Ferret A, Siurana A, Castillejos L, Calsamiglia S. Effects of capsicum and propyl-propane thiosulfonate on rumen fermentation, digestion, and milk production and composition in dairy cows. *Animals*. 2020;
50. Silva RB da, Pereira MN, Araujo RC de, Silva W de R, Pereira RAN. A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Transl Anim Sci*. 2020;
51. Oliveira HBN, Leonel F de P, Villela SDJ, Lobo Júnior AR, Guimarães EC, Santiago BT, et al. Performance of lactating dairy cows fed diets containing mixtures of essential oils. *Rev Bras Saude e Prod Anim*. 2014;
52. Spanghero M, Robinson PH, Zanfi C, Fabbro E. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Anim Feed Sci Technol*. 2009;
53. Tager LR, Krause KM. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 2011;
54. Tekippe JA, Tacoma R, Hristov AN, Lee C, Oh J, Heyler KS, et al. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Jan 12];96(12):7892–903. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213006966>
55. Geiger S, Patra AK, Schrapers KT, Braun HS, Aschenbach JR. Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep. *J Dairy Sci*. 2020;
56. Holzer P. TRP Channels in the Digestive System. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2010 Dec 21 [cited 2021 Jan 1];12(1):24–34. Available from: </pmc/articles/PMC3160477/?report=abstract>
57. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels [Internet]. Vol. 12, *Genome Biology*. BioMed Central; 2011 [cited 2021 Jan 1]. p. 218. Available from: </pmc/articles/PMC3129667/?report=abstract>
58. Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications [Internet]. Vol. 165, *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell; 2012 [cited 2021 Jan 26]. p. 787–801. Available from: </pmc/articles/PMC3312478/?report=abstract>
59. Wang G, Wang KW. The Ca<sup>2+</sup>-Permeable cation transient receptor potential TRPV3 channel: An emerging pivotal target for itch and skin diseases [Internet]. Vol. 92, *Molecular Pharmacology*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapy; 2017 [cited 2021 Jan 26]. p. 193–200. Available from: <https://doi.org/10.1124/mol.116.107946>
60. Liebe F, Liebe H, Kaessmeyer S, Sponder G, Stumpff F. The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2020;472(6):693–710.

61. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang S. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2021 Jan 26];165(3):683–92. Available from: [/pmc/articles/PMC3315040/?report=abstract](#)
62. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW. Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Jun 18 [cited 2021 Jan 26];285(25):19362–71. Available from: [/pmc/articles/PMC2885216/?report=abstract](#)
63. Nilius B, Bíró T, Owsianik G. TRPV3: Time to decipher a poorly understood family member! *J Physiol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Jan 26];592(2):295–304. Available from: [/pmc/articles/PMC3922494/?report=abstract](#)
64. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. 2-Aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Jun 2 [cited 2021 Jan 26];24(22):5177–82. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/24/22/5177>
65. Liu B, Yao J, Zhu MX, Qin F. Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels. *J Gen Physiol* [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Jan 26];138(5):509–20. Available from: [/pmc/articles/PMC3206302/?report=abstract](#)
66. Sherkheli MA, Gisselmann G, Hatt H. Supercooling agent icilin blocks a warmth-sensing ion channel TRPV3. *Sci World J*. 2012;
67. Cao X, Yang F, Zheng J, Wang KW. Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of  $\alpha$ -hydroxyl acids on keratinocytes. *J Biol Chem*. 2012;
68. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KSR, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* (80- ). 2005;
69. Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci*. 2006;
70. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci*. 2006;
71. Stotz SC, Vriens J, Martyn D, Clardy J, Clapham DE. Citral sensing by TRANSient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. *PLoS One*. 2008;
72. Moussaieff A, Rimmerman N, Bregman T, Straiker A, Felder CC, Shoham S, et al. Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain. *FASEB J*. 2008;
73. de Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA, et al. Cannabinoid actions at TRPV channels: Effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiologica*. 2012.
74. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci*. 2005;
75. Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, Patapoutian A. Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;
76. Sherkheli MA, Vogt-Eisele AK, Weber K, Hatt H. Camphor modulates TRPV3 cation channels activity by interacting with critical pore-region cysteine residues. *Pak J*

- Pharm Sci. 2013;
77. Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, et al. Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nat Neurosci*. 2008;
  78. Broad LM, Mogg AJ, Eberle E, Tolley M, Li DL, Knopp KL. TRPV3 in Drug Development. *Pharm* 2016, Vol 9, Page 55 [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2022 Feb 3];9(3):55. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/9/3/55/htm>
  79. RCSB PDB: Search [Internet]. [cited 2021 Feb 16]. Available from: [https://www.rcsb.org/search?request=%20query%20%3A%20parameters%20%3A%20value%20%3A%20TRPV3%20%2D%20type%20%3A%20terminal%20%20service%20%3A%20text%20%20node\\_id%20%3A%20%20return\\_type%20%3A%20entry%20%20request\\_options%20%3A%20%20pager%20%3A%20start%20%3A%20%20rows%20%3A%20%20scoring\\_strategy%20%3A%20combined%20%20sort%20%3A%20%20sort\\_by%20%3A%20score%20%20direction%20%3A%20desc%20%20%20request\\_info%20%3A%20src%20%3A%20ui%20%20query\\_id%20%3A%20d440182c6a0f106ae112517a25a50fb%20%20%20](https://www.rcsb.org/search?request=%20query%20%3A%20parameters%20%3A%20value%20%3A%20TRPV3%20%2D%20type%20%3A%20terminal%20%20service%20%3A%20text%20%20node_id%20%3A%20%20return_type%20%3A%20entry%20%20request_options%20%3A%20%20pager%20%3A%20start%20%3A%20%20rows%20%3A%20%20scoring_strategy%20%3A%20combined%20%20sort%20%3A%20%20sort_by%20%3A%20score%20%20direction%20%3A%20desc%20%20%20request_info%20%3A%20src%20%3A%20ui%20%20query_id%20%3A%20d440182c6a0f106ae112517a25a50fb%20%20%20)
  80. Shimada H, Kusakizako T, Dung Nguyen TH, Nishizawa T, Hino T, Tominaga M, et al. The structure of lipid nanodisc-reconstituted TRPV3 reveals the gating mechanism. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2020;27(7):645–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-020-0439-z>
  81. Singh AK, McGoldrick LL, Demirkhanyan L, Leslie M, Zakharian E, Sobolevsky AI. Structural basis of temperature sensation by the TRP channel TRPV3. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Feb 16];26(11):994–8. Available from: </pmc/articles/PMC6858569/>
  82. Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI. Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Feb 16];25(9):805–13. Available from: </pmc/articles/PMC6128766/>
  83. Zubcevic L, Herzik MA, Wu M, Borschel WF, Hirschi M, Song AS, et al. Conformational ensemble of the human TRPV3 ion channel. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Feb 16];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC6235889/>
  84. Deng Z, Maksaev G, Rau M, Xie Z, Hu H, Fitzpatrick JAJ, et al. Gating of human TRPV3 in a lipid bilayer. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2020;27(7):635–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-020-0428-2>
  85. Zubcevic L, Borschel WF, Hsu AL, Borgnia MJ, Lee SY. Regulatory switch at the cytoplasmic interface controls trpv channel gating. *Elife* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Feb 16];8. Available from: </pmc/articles/PMC6538378/>
  86. Abriata LA. Computational tools for structural analysis of proteins. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. 2018.
  87. Jabeen A, Mohamedali A, Ranganathan S. Protocol for protein structure modelling. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. 2018.
  88. Kc DB. Recent advances in sequence-based protein structure prediction. *Brief Bioinform*. 2017;
  89. Prieto-Martínez FD, Arciniega M, Medina-Franco JL. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2021 May 8];21(1):65–87. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-)

- 888X2018000321108&lng=es&nrm=iso&tlng=en
90. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2009 [cited 2021 May 8];31(2):NA-NA. Available from: [/pmc/articles/PMC3041641/](#)
  91. Limongelli V. Ligand binding free energy and kinetics calculation in 2020. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2020;10(4):1–32.
  92. Mura C, McAnany CE. An introduction to biomolecular simulations and docking. *Mol Simul*. 2014;40(10–11):732–64.
  93. Pérez S, Tvaroška I. Carbohydrate-protein interactions: Molecular modeling insights. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* [Internet]. Academic Press Inc.; 2014 [cited 2021 Apr 8]. p. 9–136. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001288000017>
  94. Bortolato A, Fanton M, Mason JS, Moro S. Molecular Docking Methodologies. In 2013 [cited 2021 Apr 9]. p. 339–60. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-017-5\\_13](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-017-5_13)
  95. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput Aided-Drug Des* [Internet]. 2012 Nov 11 [cited 2021 Apr 8];7(2):146–57. Available from: [/pmc/articles/PMC3151162/](#)
  96. Lozano-Aponte J, Scior T. ¿Qué sabe ud. acerca de... dinámica molecular? *Rev Mex Ciencias Farm*. 2014;45(1):86–8.
  97. Godwin RC, Melvin R, Salsbury FR. *Molecular Dynamics Simulations and Computer-Aided Drug Discovery*. 2015;(Md):1–30.
  98. González MA. Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique la Société Française la Neutron*. 2011;12:169–200.
  99. Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, et al. Scalable molecular dynamics with NAMD [Internet]. Vol. 26, *Journal of Computational Chemistry*. John Wiley and Sons Inc.; 2005 [cited 2021 Apr 29]. p. 1781–802. Available from: [/pmc/articles/PMC2486339/](#)
  100. Wallner B, Elofsson A. All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci* [Internet]. 2005 May [cited 2021 May 7];14(5):1315–27. Available from: [/pmc/articles/PMC2253266/](#)
  101. Šali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* [Internet]. 1993 Dec 5 [cited 2021 May 7];234(3):779–815. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8254673/>
  102. UniProt [Internet]. [cited 2021 Apr 7]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
  103. Protein BLAST: Align two or more sequences using BLAST [Internet]. [cited 2022 Feb 2]. Available from: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=blasttab](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=blasttab)
  104. Welcome to ZINC Is Not Commercial - A database of commercially-available compounds [Internet]. [cited 2022 Jan 19]. Available from: <https://zinc12.docking.org/>
  105. PubChem [Internet]. [cited 2022 Jan 19]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

# Apéndice

## Código de tres letras y de una letra para los aminoácidos estándar

|              |     |   |
|--------------|-----|---|
| Alanina      | Ala | A |
| Cisteína     | Cys | C |
| Aspartato    | Asp | D |
| Glutamato    | Glu | E |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Glicina      | Gly | G |
| Histidina    | His | H |
| Isoleucina   | Ile | I |
| Lisina       | Lys | K |
| Leucina      | Leu | L |
| Metionina    | Met | M |
| Asparagina   | Asp | N |
| Prolina      | Pro | P |
| Glutamina    | Gln | Q |
| Arginina     | Arg | R |
| Serina       | Ser | S |
| Treonina     | Thr | T |
| Valina       | Val | V |
| Triptófano   | Trp | W |
| Tirosina     | Tyr | Y |

## Alineamiento de las secuencias plantillas y la secuencia objetivo

```
>P1; 6mhvCcA
structureX:6mhvCcA: : : : : : :
---RLKKRIFAAVSEGCVEELVELLVELQELCRRRHDEDVPDFLMHKLTASDTGKTCLMK
ALLNINPNTKEIVRILLAF AEENDILGRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERRQGDIAALL
IAAGADVNAHAKGAFFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMEHEQTDITSRDS
RGNNILHALVTVAEDFKTQNDVFVKRMYDMILLRSGNWELETTRNNDGLTPLQLAAKMGKA
EILKYILSREIKEKRLRSLSRKFTDWAYGPVSSSLYDLTNVDTTDNSVLEITVYNTNID
NRHEMLTLEPLHTLLHMKWKKFAKHMFFLSFCFYFFYNITLTLVSYR-----
-----GWLQLLGRMFVLIWAMCISVKEGIAIFL-----LSDAWFHVFVFIQAVLVI
LSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGMYSVMIQKVILHDVLKFLFVY
IVFLLGFGVALASLIEKCPKDNKDCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNLNIQQNSKYPILF
LFLITYVILTFVLLNMLIALMGETVENVSKESERIWRLQRARTILEFEKMLPEWLRSR
FRMGELCKVAEDDFRLCLRINEVKWTEWKTHVSFLNEDPGPV*
```

```
>P1; 6dvyCcA
structureX:6dvyCcA: : : : : : :
KKKRLKKRIFAAVSEGCVEELRELLQDLQDLRRRRGLDVPDFLMHKLTASDTGKTCLMK
ALLNINPNTKEIVRILLAF AEENDILDRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERRQGDITAVL|
IAAGADVNAHAKGVFFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMENEQTDITSQDS
RGNNILHALVTVAEDFKTQNDVFVKRMYDMILLRSGNWELETMRNNDGLTPLQLAAKMGKA
EILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGPVSSSLYDLTNVDTTDNSVLEIIVYNTNID
NRHEMLTLEPLHTLLHTKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNITLTLVSYRPREDEDLPHPLA
LTHKMSWLQLLGRMFVLIWATCISVKEGIAIFLLRPSDLQSILSDAWFHVFVFAQAVLVI
LSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGMYSVMIQKVILHDVLKFLFVY
ILFLLGFGVALASLIEKCSKDKKDCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNLNIQQNSTYPILF
LFLITYVILTFVLLNMLIALMGETVENVSKESERIWRLQRARTILEFEKMLPEWLRSR
FRMGELCKVAEDDFRLCLRINEVKWTEWKTHVSFLNEDPGP-*
```

```
>P1; trpB
sequence:trpB: : : : : : :
---RLKKRIFTAVSEGCVEELLELLGELQELCKRRHSLDVPDFLMHKLTALDTGKTCLMK
ALLNINPNTKEIVRILLAF AEENDILDRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERRQGDITAAL
IAAGADVNAHAKGVFFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQMLMENEQTDITSQDS
RGNNILHALVTVAEDFKTQNDVFVKRMYDMILLRSRTWELETTRNNDGLTPLQLAAKMGKA
EILKYILSREIKDKRLRSLSRKFTDWAYGPVSSSLYDLTNVDTTDNSVLEIIVYNTNID
NRHEMLTLEPLHTLLHMKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNITLTLVSYRPREEEALPHPLA
LTHKMGWLQLLGRMFVLIWAMFISVKEGIAIFLLRPSDLQSILSDAWFHVFVFAQAVLVI
LSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGMYSVMIQKVILHDVLKFLFVY
IVFLLGFGVALASLIEKCPKSHENCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNLNIQQNSKYPILF
LFLITYVILTFVLLNMLIALMGETVENVSKESERIWRLQRARTILEFEKILPEWLRSR
FRMGELCKVAEDDFRLCLRINEVKWTEWKTHVSFLNEDPGPG*
```

## Script para la construcción de los homólogos de bTRPV3

```
# October 26, 2015
# Calculation using 2 o more templates.
# Structure of the protomer TRPV3 Boss taurus
# The templates are the structure of the human and mouse TRPV3

from modeller import *
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose() # request verbose output
env = environ() # create a new MODELLER environment to build this model in

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.']

a = automodel(env,
              alnfile = '6mhv_6dvy_to_trpB.ali', # alignment filename
              knowns = ('6mhvCcA', '6dvyCcA'), # codes of the templates. Note the ()
              sequence = 'trpB') # code of the target
a.starting_model= 1 # index of the first model
a.ending_model = 100 # index of the last model, determines how many models
to calculate
a.md_level = refine.slow # quality of the models, options, refine.very_fast
a.make() # do the actual homology modelling
```