



**UNIVERSIDAD DE TALCA**  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL EN BIOINFORMÁTICA

**Diseño de compuestos multiblanco basado en similitudes de sitios de unión entre las estructuras de SERT y EAAT3 como potencial alternativa farmacológica para el tratamiento del Trastorno Obsesivo Compulsivo**

**LUIS ALFREDO LETELIER SEPÚLVEDA**

Profesor Informante: DR. MAURICIO ANTONIO ARENAS SALINAS  
Profesor Tutor: DR. GABRIEL ARMANDO NÚÑEZ VIVANCO

Memoria de Título de Ingeniero Civil en Bioinformática

Talca - Chile  
Mayo, 2021

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## Tabla de contenidos

<b>Tabla de contenidos</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Marco Teórico</b>	<b>6</b>
<b>El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC)</b>	<b>6</b>
<b>Etiología del TOC</b>	<b>7</b>
<b>SERT y EAAT3 como blancos terapéuticos del TOC</b>	<b>10</b>
<b>Estrategia polifarmacológica para el TOC</b>	<b>11</b>
<b>Estructuras de SERT y EAAT3</b>	<b>12</b>
<b>Racionalidad del diseño polifarmacológico en TOC</b>	<b>15</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>16</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>17</b>
<b>Obtención estructuras equilibradas del SERT y EAAT3 humana a través de dinámicas de simulación molecular</b>	<b>17</b>
<b>Determinación del receptor mediante el descubrimiento y la búsqueda de patrones de aminoácidos 3D similares entre las estructuras</b>	<b>19</b>
<b>Construcción de una biblioteca de compuestos mediante un modelo heurístico</b>	<b>22</b>
<b>Selección de los mejores compuestos de interacción significativa en SERT y EAAT3 mediante simulaciones de acoplamiento molecular</b>	<b>24</b>
<b>Resultados y discusión</b>	<b>26</b>
<b>Referencias</b>	<b>45</b>
<b>Anexos</b>	<b>49</b>

## Resumen

A nivel mundial, se estima que el Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC) tiene una prevalencia en la población que varía del 2 a 3%, es un trastorno de carácter invalidante que se caracteriza por comportamientos repetitivos que invaden la conducta y la calidad de vida de las personas. Su etiología no está del todo clara, algunos modelos evidencian alteraciones en los circuitos frontoestriatales cerebrales, aún así, se indica que los componentes ambientales y genéticos serían su principal causa. En ese sentido, el TOC estaría influenciado por genes que modulan los sistemas serotoninérgico y glutamatérgico. En el sistema glutamatérgico, se ha demostrado que la transmisión excitatoria anormal en el SNC, vinculada a la función del transportador de glutamato EAAT3, sería un factor promotor de la enfermedad. En cuanto a, el sistema serotoninérgico bajos niveles de serotonina 5-HT han demostrado una sobreexcitación neuronal en zonas del cerebro ocurrientes de TOC. Hoy, los ISRS son el tratamiento de primera línea para la enfermedad, aún cuando su desarrollo farmacéutico es para la depresión mayor, estas drogas actúan bloqueando a SERT en el espacio sináptico, asimismo como compuestos que modulan el glutamato. El tratamiento farmacológico combinado con la psicoterapia han sido útiles para mantener a raya los síntomas, sin embargo estos reaparecen en casi la mitad de los pacientes, por lo cual se aprecia la necesidad urgente de un tratamiento farmacológico para TOC. La mayoría de los fármacos son desarrollados bajo el paradigma de “bala mágica”, que implica un diseño de compuestos altamente selectivos, pero en la práctica las drogas son naturalmente promiscuas y trastornos como el TOC son cuadros complejos que a menudo incluyen una amplia gama de objetivos, he ahí el perfil polifarmacológico. Las estructuras de SERT y EAAT3 humanas se utilizaron como blanco polifarmacológico, por ello, estas se equilibraron mediante simulaciones de DM, se determinaron 4 receptores mediante la búsqueda y descubrimiento de patrones comunes con la herramienta *Geomfinder*, se construyó una librería de compuestos a través de un modelo heurístico de algoritmo genético usando *LEA3D* para cada *receptor*. Travoprost, Ticagrelor, NRX-1074 y Rapastinel fueron los 4 compuestos seleccionados y sometidos a simulaciones de acoplamiento molecular en ambas estructuras en la suite *Schrodinger Maestro*. Travoprost, siendo una solución oftalmológica para el glaucoma presenta interacciones de tipo enlaces de hidrógeno en los residuos de Asp y Arg tanto en EAAT3 como SERT con puntajes de acoplamiento de -7.362 y -8.062 kcal/mol, respectivamente.

## Abstract

In the world, it is estimated that Obsessive Compulsive Disorder (OCD) has a prevalence in the population that varies from 2 to 3%, it is a disabling disorder characterized by repetitive behaviors that invade the conduct and quality of life of people. Its etiology is not entirely clear, some models show alterations in the cerebral frontostriatal circuits, even so, it is suggested that environmental and genetic components would be its main cause. In this sense, OCD would be influenced by genes that modulate the serotonergic and glutamatergic systems. In the glutamatergic system, it has been shown that abnormal excitatory transmission in the CNS, linked to the function of the glutamate transporter EAAT3, would be a promoter of the disease. As for the serotonergic system, low levels of serotonin 5-HT have shown a neuronal overexcitation in brain areas occurring in OCD. Today, SSRIs are the first line treatment for the disease, even though their pharmaceutical development is for major depression, these drugs act by blocking SERT in the synaptic space, as well as compounds that modulate glutamate. Pharmacological treatment combined with psychotherapy has been helpful in keeping symptoms at bay, but symptoms recur in almost half of the patients, so there is an urgent need for pharmacological treatment for OCD. Most drugs are developed under the "magic bullet" paradigm, which involves a highly selective compound design, but in practice drugs are naturally promiscuous and disorders such as OCD are complex conditions that often include a wide range of targets, hence the polypharmacological profile. The structures of human SERT and EAAT3 were used as polypharmacological targets, therefore, these were balanced by MD simulations, 4 receptophores were determined by searching and discovering common patterns with the Geomfinder tool, a library of compounds was built through a heuristic genetic algorithm model using LEA3D for each receptophore. Travoprost, Ticagrelor, NRX-1074 and Rapastinel were the 4 compounds selected and subjected to molecular docking simulations on both structures in the Schrodinger Maestro suite. Travoprost, being an ophthalmic solution for glaucoma exhibits hydrogen bonding type interactions at the Asp and Arg residues in both EAAT3 and SERT with docking scores of -7.362 and -8.062 kcal/mol, respectively.

# Marco Teórico

## *El Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC)*

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud<sup>1</sup> El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es listado y clasificado en el quinto lugar a nivel mundial entre las afecciones crónicas de salud mental de mayor carga invalidante. Adicionalmente, esta patología se posiciona como el cuarto trastorno mental más común después de la depresión, el abuso de alcohol y/o sustancias y la fobia social (Veale & Roberts, 2014). La cifra de prevalencia de TOC, en general, se señala que varía entre el 2% y 3% de la población (Rodenas & Carrascosa, 2018). Este trastorno es caracterizado clínicamente, tanto por obsesiones y compulsiones (Tabla 1), siendo las primeras pensamientos, imágenes o impulsos repetitivos e intrusivos que causan miedo, ansiedad o angustia, y las segundas corresponden a comportamientos repetitivos o rituales obsesivos, definidos como acciones inapropiadas, involuntarias e irresistibles que pueden tomar forma de una acción observable por otras personas, como por ejemplo, verificar que una puerta está cerrada o como un acto mental encubierto que no se puede observar, lo cual dificulta su diagnóstico, tal como repetir una frase mentalmente (Veale & Roberts, 2014). Está última como tal, es una respuesta a la obsesión y tiene como finalidad reducir la angustia provocada por los pensamientos obsesivos como una condición de alivio temporal. Las compulsiones recurrentes pueden convertirse en un bucle vicioso entre la aparición del pensamiento obsesivo, la ansiedad que este produce y el alivio que acontece tras compulsionar, y así iterativamente (Pena-Garijo et al., 2010). Aunque la etiología del TOC sigue siendo una incógnita, desde los años 50 diversos aportes científicos han surgido tanto en su origen fisiopatológico como en su sintomatología. Hasta la década del 50 aún se consideraban a los fenómenos obsesivos-compulsivos como una forma más de locura. Los relatos franceses del siglo XIX de casos que se asemejan al TOC señalaban y enfatizaban en la indecisión. Escritores posteriores, inclusive el neurólogo Pierre Janet, destacó la pérdida de voluntad y baja energía mental, que subyacen a la formación de síntomas obsesivos-compulsivos. Westphal en Alemania fue el primero en distinguir las obsesiones de los delirios en 1877. En tanto Freud, adoptando un punto de vista similar al de Westphal, introduce el término “Neurosis Obsesiva” en 1895. Luego, gran parte del siglo XX estuvo dominada por teorías psicoanalíticas las cuales relacionaban obsesiones y

---

<sup>1</sup> World Health Organization; *The global burden of disease: 2004 update*, 2008

compulsiones con el reflejo de respuestas desadaptativas a conflictos no resueltos desde etapas tempranas del desarrollo psicosexual, estas perdieron favor en el último cuarto del siglo XX a medida que se fueron introduciendo nuevos tratamientos farmacológicos y conductuales más efectivos (Goodman et al., 2014).

**Tabla 1**  
*Obsesiones y compulsiones comunes*

Obsesiones	Compulsiones
Miedo a la contaminación por suciedad, gérmenes, fluidos corporales, químicos o material peligroso.	Lavado, limpieza y evitar los desencadenantes
Miedo de causar daño a sí mismo o a otros	Chequeo y seguridad
Excesiva preocupación por la simetría o ser impecable	Ordenar y repetir
Pensamientos o imágenes mentales prohibidas	Comprobar los recuerdos y evitar los desencadenantes

**Figura 1.** Tabla adaptada de "Obsessive-compulsive disorder", de Veale, D. y Roberts, A., 2014, *Bmj*, 348, g2183.

### Etiología del TOC

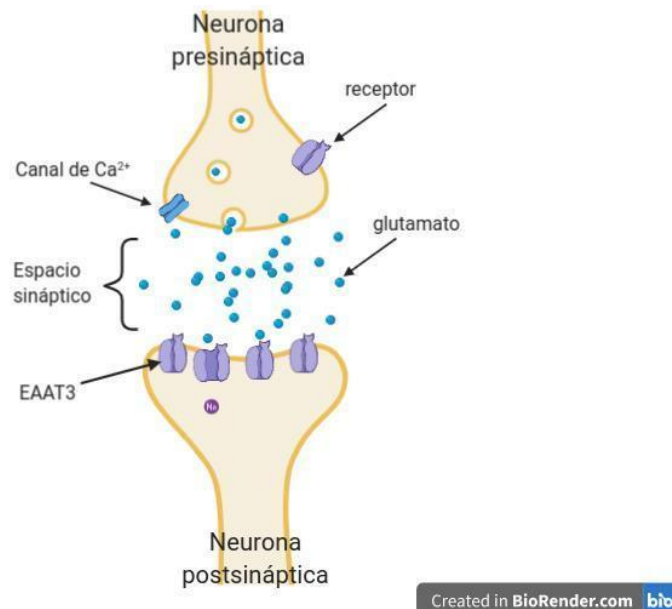
Desde el punto de vista neuropsicológico del TOC, los modelos sugieren que la enfermedad surge por alteraciones en los circuitos frontoestriatales. Se ha propuesto la hiperactivación de la corteza orbitofrontal para mediar con pensamientos persistentes relacionados con amenazas y daños, es decir obsesiones, que conducen a la neutralización de la amenaza mediante las compulsiones (Krebs & Heyman, 2015). Un hallazgo frecuente de neuroimagen en pacientes TOC han sido las alteraciones de la corteza orbitofrontal a nivel funcional como estructural, sin embargo, esta disfunción cerebral observada se encontró también en familiares que no presentaron el trastorno (Chamberlain et al., 2008).

Por otro lado, existe una creciente evidencia que involucra componentes ambientales y genéticos como la causa principal de este trastorno (Mataix-Cols et al., 2013). De hecho, los estudios de asociación de genes y genomas, sugieren que la influencia en TOC es poligénica, con muchos genes que individualmente ejercen un efecto relativamente pequeño sobre el fenotipo. Más aún en Pauls et al., 2014, se sugiere que el TOC probablemente se deba a una desregulación de genes que funcionan en una red cerebral, en lugar de genes individuales que simplemente

añaden riesgo de forma acumulativa. En particular, se señala que la ocurrencia del TOC estaría influenciado por los genes que modulan los sistemas serotoninérgico, glutamatérgico y dopaminérgico (Krebs & Heyman, 2015). Uno de los sistemas más estudiados es el serotoninérgico, cuyo neurotransmisor principal serotonina (5-HT), es una amina biogénica perteneciente al grupo de las indolaminas (Sanz, 2003). 5-HT está implicada en diversos procesos neurológicos y cognitivos, tales como la modulación del estado de ánimo, aprendizaje, memoria, entre otros. La desregulación de la concentración de 5-HT en el espacio sináptico parece ser crítica en diversas afecciones de salud mental, y en particular, bajos niveles de 5-HT han mostrado una sobreexcitación de la activación en el córtex orbitofrontal, zona cerebral vinculada a la aparición del TOC (Mavrogiorgou et al., 2018). El córtex orbitofrontal trabaja en conjunto con otros circuitos cerebrales, para inhibir las respuestas desadaptativas en el comportamiento, seleccionando y regulando aquellas otras secuencias conductuales útiles para el organismo (Evans et al., 2004). Esta desregulación serotoninérgica al parecer se vincula con la aparición y consolidación de obsesiones recurrentes de cualquier tipo.

Por otra parte, el rol del sistema glutamatérgico en la ocurrencia de TOC se ha ido consolidando a la luz de nuevas evidencias de neuroimágenes, estudios genómicos, estudios bioquímicos de fluido cerebroespinal y modelos de animales con comportamientos de aseo repetitivos (Goodman et al., 2014). El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro adulto, se presenta en el sistema nervioso central (SNC) y en el líquido cefalorraquídeo en altas concentraciones. Las proyecciones glutamatérgicas participan casi en todos los circuitos del SNC (Pittenger et al., 2011). El funcionamiento del glutamato es como el del neurotransmisor clásico (Figura 2), se empaqueta en vesículas en las terminaciones sinápticas de las neuronas glutamatérgicas, las cuales son frecuentemente neuronas de proyección cuyos axones se extienden a sitios distantes del SNC. Al iniciar un potencial de acción en la neurona, las vesículas que contienen glutamato se fusionan con la membrana presináptica y su contenido es liberado en el espacio sináptico, allí el glutamato es difundido donde puede unirse tanto a receptores postsinápticos como presinápticos (Pittenger et al., 2011).





**Figura 2.** Esquema de transporte de un neurotransmisor clásico. Adaptado de “Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and treatment.”, de Pittenger, C. y cols., 2011 *Pharmacology & therapeutics*, 132(3), 314-332.

En estas vías se ha mostrado que una transmisión excitadora anormal en el circuito cortico-estriato-tálamo-cortical sería un factor promotor de TOC. En este tipo de transmisión, los transportadores de glutamato juegan un papel crítico regulando además, mediante la concentración del neurotransmisor, la activación de los receptores de neurotransmisores extrasinápticos y la excitotoxicidad (Pittenger et al., 2011). Adicionalmente, varios polimorfismos en genes que codifican proteínas del sistema glutamatérgico se han asociado con el TOC (Sheshachala & Narayanaswamy, 2019). Entre ellos, la familia de los transportadores EAAT ha sido ampliamente estudiada. En modelos animales por ejemplo, la carencia del gen SLC1A1 que traduce para el Transportador Excitatorio de Aminoácidos 3 (EAAT3 por su sigla en inglés de *Excitatory amino acid transporter 3*), confirma que esta proteína es esencial para la función neuronal normal y la supervivencia. Se ha planteado la hipótesis de que EAAT3, además de contribuir en la homeostasis del glutamato, reduce el glutatión y el daño oxidativo que puede contribuir a pérdida neuronal (Pittenger et al., 2011). Más aún, se ha demostrado que los compuestos moduladores de glutamato pueden ser beneficiosos en algunos pacientes con TOC específicos. Estos compuestos incluyen, por ejemplo, un antagonista del receptor de glutamato de clase NMDA (de N-metil-D-aspartato), un agonista del sitio de unión a la glicina en el receptor de NMDA y medicamentos que interactúan con los canales de calcio dependientes de voltaje o mejoran la absorción de glutamato por los

transportadores ubicados en las células gliales, en EAAT2 y EAAT3 en particular (Marinova et al., 2017; Pittenger, 2015).

### *SERT y EAAT3 como blancos terapéuticos del TOC*

A partir de la eficacia que han demostrado los tratamientos farmacológicos con ISRS en TOC y la evidencia significativa fisiológica y genética, sugieren que el transportador de serotonina (SERT) podría etiquetarse como un objetivo farmacológico. Por ejemplo, el gen SLC6A4 que codifica para SERT, ha mostrado varios polimorfismos que afectan la expresión de su ARNm y su consiguiente aumento en la expresión, se ha asociado con la ocurrencia de los síntomas del TOC (Sinopoli y col., 2017). Por otro lado, el gen SLC1A1 que codifica para EAAT3, mostró a través de estudios de ligamiento de todo el genoma, que la alteración de su expresión/función conduce a aumentos de la actividad glutamatérgica, aumentando los factores de riesgo para el trastorno (Brandl et al., 2012).

Actualmente los tratamientos recomendados para el TOC son la terapia cognitiva conductual (TCC) junto con la administración crónica de medicamentos inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina ISRS (Krebs & Heyman, 2015). Los ISRS son reconocidos como el tratamiento farmacológico de primera línea en TOC, aún cuando su desarrollo farmacéutico es originalmente para el tratamiento de la depresión mayor. Entre ellos, la fluoxetina, la sertralina o la paroxetina, han mostrado beneficios al reducir los síntomas del TOC mediante el bloqueo de SERT en el espacio sináptico. El mecanismo molecular por el cual los ISRS reducen los síntomas de TOC aún no es comprendido del todo, sin embargo la literatura sugiere que podría estar asociado a la regulación de la actividad serotoninérgica, ya que, la variación en la actividad de 5-HT afecta la disponibilidad de serotonina en el espacio sináptico y, por lo tanto, regula la actividad del receptor de serotonina postsináptica. Esta desregulación del sistema serotoninérgico es un factor importante en la enfermedad (Brandl et al., 2012). Los estudios señalan que una mayor disponibilidad del transportador se correlacionan con una mayor ocupación del transportador y una mejor respuesta al tratamiento con la sertralina, lo que respalda la hipótesis de que SLC6A4 es un factor crucial en la respuesta al tratamiento (Brandl et al., 2012; Zitterl et al., 2009). A pesar de la eficacia similar que poseen los distintos ISRS sobre el TOC, existen diferencias significativas en la respuesta de los pacientes y en general, solamente entre el 40-60% de los sujetos sometidos a tratamiento muestran respuestas satisfactorias (Brandl et al., 2012). Es decir, que

aproximadamente la mitad de los pacientes afectados continúan presentando síntomas, lo cual hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos.

### *Estrategia polifarmacológica para el TOC*

La mayoría de los fármacos se han desarrollado bajo el paradigma de la “bala mágica”, que básicamente implica el diseño de compuestos altamente selectivos por un solo blanco molecular que está involucrado con una enfermedad. Sin embargo, la polifarmacología ha emergido como un nuevo paradigma en el desarrollo farmacológico. Los fenómenos que rigen a la polifarmacología incluyen por ejemplo varias drogas que simultáneamente actúan sobre varios blancos moleculares, o más eficiente aún, una droga que actúa sobre múltiples blancos de una enfermedad o que actúe sobre múltiples blancos relacionados con múltiples vías de la enfermedad (Reddy & Zhang, 2013). En la práctica, los fármacos son naturalmente promiscuos, lo cual se convierte en un atributo deseable, ya que tales compuestos que se unen simultáneamente a varias proteínas, exhiben un perfil que podría mejorar la eficacia y/o la seguridad de los tratamientos basados en drogas (Ravikumar & Aittokallio, 2018). Actualmente, los trastornos neurodegenerativos, neuropsiquiátricos (incluido el TOC), infecciones, cáncer y enfermedades metabólicas son foco de atención para el descubrimiento de drogas con múltiples blancos debido a su naturaleza multifactorial y a su resistencia terapéutica. Por lo tanto, el tratamiento de estas enfermedades requiere de la modulación de múltiples blancos biológicos para restablecer el equilibrio fisiológico (Proschak et al., 2018). Aun así, todavía es un gran desafío encontrar compuestos con acción simultánea en múltiples blancos, sobre todo porque esto implica, según el clásico concepto de unión droga-proteína, que todos los blancos deberían compartir sitios de unión similares. Teniendo en consideración la compleja heterogeneidad del TOC, parece ser razonable pensar que el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos basados en un diseño de fármacos de múltiples blancos pueda ser una alternativa promisoriosa y ventajosa.

Dentro de los ISRS utilizados en el tratamiento de TOC, la sertralina figura como uno de los más recetados. Inicialmente este medicamento se clasificó como un bloqueador selectivo de SERT, sin embargo también presenta interacciones *in vitro* con al menos diez proteínas humanas, tales como, la 15-lipoxigenasa o el receptor adrenérgico alfa-2b, entre otras. Por otra parte, memantina, la cual es un modulador de glutamato, ha sido estudiado ampliamente como una alternativa farmacológica en TOC. Su mecanismo de acción propuesto es el bloqueo de los receptores de

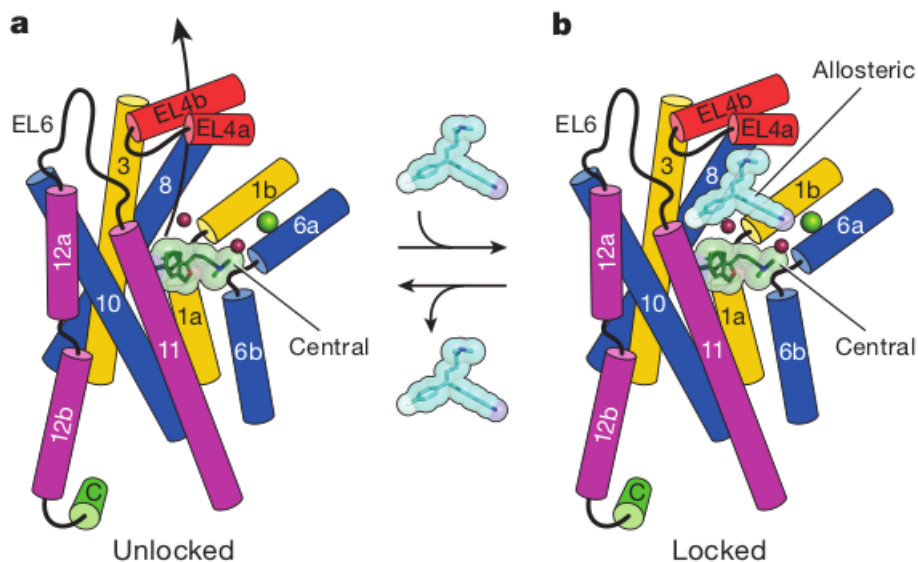
NMDA. Similar a la sertralina, la memantina interactúa con muchas otras proteínas. Tanto sertralina, como memantina han mostrado interactuar con proteínas comunes como por ejemplo, la bomba de exportación de sales biliares, la geminina, o la monoamino oxidasa A (MAO-A), entre otras. Sin perjuicio de lo anterior, es importante destacar que a pesar de no existir certeza con respecto a qué o cuáles interacciones son responsables de la eficacia y/o los efectos secundarios de estos medicamentos supuestamente “selectivos” tanto como para SERT como para NMDA, estas drogas que presentan promiscuidad fortuita, han mostrado la mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades complejas como el TOC.

### *Estructuras de SERT y EAAT3*

Desde el punto de vista estructural SERT es una proteína transportadora transmembrana cuya función principal es regular la concentración de 5-HT en espacio sináptico (Murphy et al., 2004). SERT se compone por 630 aminoácidos, pertenece a la familia de transportadores dependientes de solutos, sodio y cloro (SLC6) y es responsable de recaptar y terminar la acción de 5-HT en el espacio sináptico. El transporte de 5-HT se realiza en contra de un gradiente de concentración y se lleva a cabo mediante el acoplamiento del transporte de sodio y cloruro, y el contratransporte de potasio. Las primeras estructuras cristalográficas de SERT humano co-cristalizado con los ISRS paroxetina y (S)-citalopram, se publicaron en 2016 PDB ids: 5I6X, 5I6Z, 5I71, 5I73, 5I74 y 5I75 (Coleman et al., 2016). SERT humano contiene 12 hélices transmembrana (TM) etiquetadas como TM1 – TM5 y TM6 – TM10 unidas por un pseudo eje doble plegado. Los inhibidores y sustratos (molécula verde; Figura 3) se unen al sitio central, que está rodeado por las hélices 3, 8 y 10 y formado principalmente por residuos de las hélices 1 y 6. Estas hélices también parecen coordinar los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) (esferas color salmón y verde; Figura 3). Un segundo sitio de unión alostérico se encuentra en el vestíbulo extracelular, aproximadamente a 13 Å del sitio central (molécula cian; Figura 3). Este sitio está formado por residuos de los TM 1b, 6a, 10, 11 y los bucles extracelulares EL4 y EL6, (EL: *del inglés Extracellular Loops*). SERT tiene una amplia área de superficie accesible al solvente, que actúa como una compuerta extracelular compuesta por EL2, EL4, y EL6. En el sitio central, la unión del ligando se estabiliza por residuos, tales como Asp98 que forma interacciones electrostáticas con el grupo amino de sustratos e inhibidores, Tyr95, el cual

establece enlaces de hidrógeno o interacciones catión- $\pi$  y también con grupos aminos. En cambio, Tyr176 lo hace a través de interacciones hidrofóbicas y el conjunto de Ser439, Leu443, Ala169 y 173 forman una cavidad hidrofóbica, también participan en la unión del ligando en este sitio. Por otro lado, el sitio de unión alostérico, está rodeado por residuos como Glu494, Arg104, Asp328, Gln332, Ala331 y Phe556, que han demostrado formar interacciones catión- $\pi$ , aromáticas y enlace de hidrógeno con los ISRS paroxetina y (S)-citalopram (Coleman & Gouaux, 2018).

*Esquema de la modulación alostérica de la unión del inhibidor a SERT*



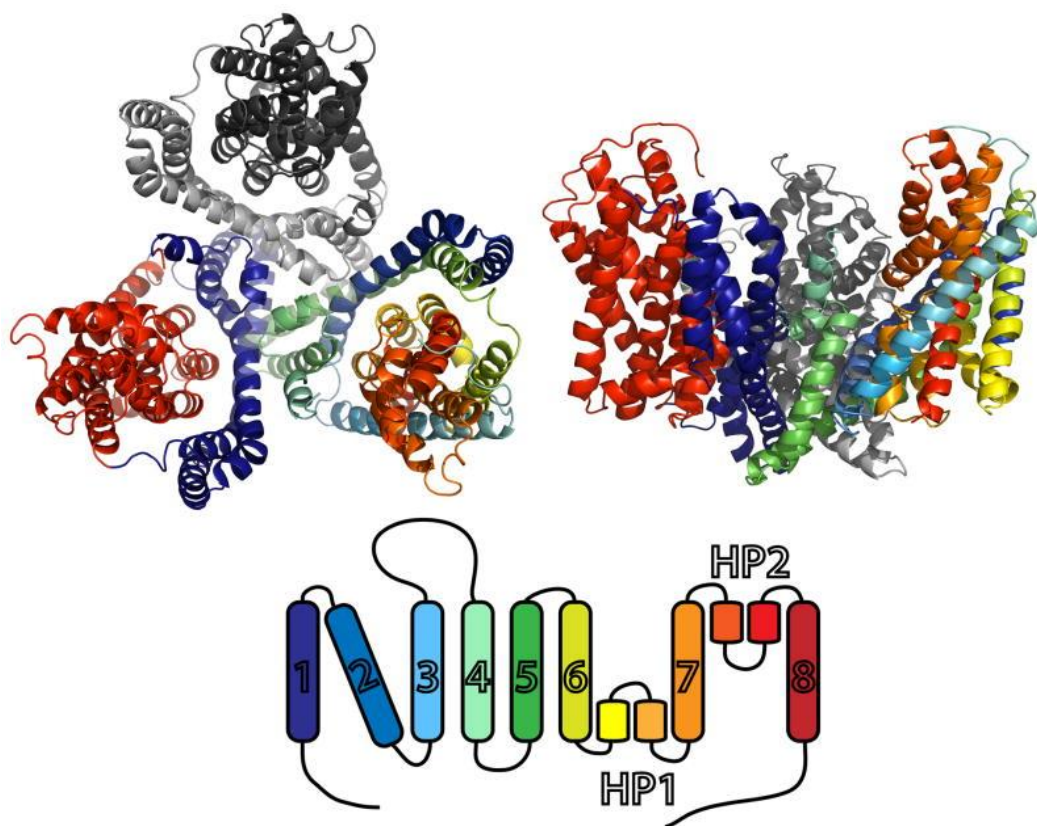
**Figura 3.** En a, el ISRS (S)-citalopram (verde oscuro) se une al sitio central entre las hélices 3, 8 y 10. En b, (S)-citalopram(cian) se une al sitio alostérico formado por TM1b,6a,10,11 y EL4 y 6. Los iones de sodio y cloro (salmón y verde, respectivamente) Adaptado de "X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter", de Coleman, J. y cols., 2016 Nature structural & molecular biology, 25(2), 170-175.

Por otro lado, el transportador EAAT3, cuya estructura ha sido recientemente resuelta como estructura cristalina (PDBid 6S3Q, Baronina et al., s.f) corresponde a una proteína de membrana de 524 aminoácidos cuya función es captar el glutamato liberado en el espacio sináptico. Por cada glutamato, tres iones de sodio y un protón entra a la célula, y como contratraste un ion de potasio es liberado. Funcionalmente, EAAT3 es activo como un homotrímero (Figura 4), con cada monómero que consta de 8 dominios transmembrana (TM). La estructura tiene dos subdominios distintos, con TM1, 2, 4 y 5 como soporte de macro topología, mientras que TM3, 6, 8 y la horquilla 1 (HP1) y la horquilla 2 (HP2) son parte del dominio de transporte que proporciona conformaciones alternadas (hacia afuera y hacia adentro). Este proceso de cambio conformacional, donde el sitio de unión del glutamato se mueve casi 18 Å, es crucial para el transporte de sustrato e iones

(Heinzelmann & Kuyucak, 2014). Este sitio de unión de EAAT3 ha sido propuesto mediante el uso de técnicas como mutagénesis sitio dirigidas, electrofisiología y estudios de simulación molecular. Su estructura se conforma por los residuos Asp83, His296, Ser331, Glu374, Asp444, Arg445 y 447, los cuales parecen estar involucrados en la coordinación de glutamato y iones en sus sitios de unión.

Las EAAT3 también pueden transportar aspartato y cisteína, de hecho se señala que es el único que puede transportar cisteína entre las EAAT, siendo este residuo un intermediario limitante de la velocidad en la biosíntesis del glutatión antioxidante (Qiu et al., 2021). En el proceso de transporte una arginina desprotonada es crucial, la cual parece estar involucrada en el reconocimiento inicial de sustratos cargados tales como glutamato o aspartato. Es más, se ha visto que la mutación puntual de la Arg447 por una cisteína, modifica al transportador EAAT3 de aminoácidos ácidos, a uno que transporta aminoácidos neutros (Watts et al., 2014). El análisis de los sitios de unión putativos actuales y la exploración de posibles sitios de unión alostéricos desconocidos se consideran en el presente trabajo de investigación.

*Esquema de la topología de las EAAT*



**Figura 4.** El transportador se puede dividir aproximadamente en subdominios funcionales, con TM1, -2, -4 y -5 como un dominio de andamiaje relativamente estático, mientras que TM3, -6, -8 y horquilla 1 (HP1) y horquilla 2 (HP2) son parte del dominio de transporte (Bjørn-Yoshimoto y cols., 2016).

El reconocimiento de patrones de aminoácidos tridimensionales similares entre proteínas que son blanco en una misma enfermedad, podría ser inicialmente un paso útil para el descubrimiento de nuevos fármacos multiblanco. La mayoría de las herramientas disponibles para comparar patrones de aminoácidos 3D utilizan solo el sitio de unión ortostérico, dejando de lado todos los posibles sitios de unión alostéricos, los que han demostrado ser fundamentales para la función proteica y el diseño de fármacos (Núñez-Vivanco et al., 2016; Simonovsky & Meyers, 2020). En este contexto, herramientas como *Geomfinder* (Núñez-Vivanco et al., 2016), *3D-PP* (Valdés-Jiménez et al., 2019), entre otras, que funcionan independientemente de la información sobre ligandos conocidos, sitios de unión, similitud de secuencia o plegamiento global de las proteínas investigadas, permiten mejorar las posibilidades de encontrar patrones 3D compartidos entre blancos diferentes o no relacionados. Ciertamente, algunos de estos patrones 3D compartidos pueden aparecer por casualidad, sin embargo otros, podrían representar un evento clave en la evolución convergente estructural de las proteínas consultadas y corresponder, por ejemplo, a sitios de unión secundarios (Núñez-Vivanco et al., 2016). Estos sitios han sobresalido en términos del diseño racional de moduladores alostéricos ya que muestran menores efectos secundarios y toxicidad que los medicamentos convencionales que actúan en los sitios de unión ortostéricos (Szilágyi et al., 2013). Consecuentemente, identificar un patrón 3D, con potenciales sitios de unión droga-proteína en varias estructuras, podría ser usado como un primer paso para el diseño y búsqueda de compuestos de múltiples blancos utilizando enfoques como el de diseño de fármacos basado en la cavidad o *Pocket-Based Drug Design* (Zheng et al., 2013).

Tal como se mencionó previamente, el TOC es uno de los trastornos neuropsiquiátricos más frecuentes en todo el mundo y cerca del 50% de los pacientes no responde a las terapias actuales disponibles (Brandl et al., 2012). Además, a pesar de los esfuerzos, aún no existe un tratamiento farmacológico selectivo para la enfermedad y los mejores resultados se han mostrado por aquellos fármacos desarrollados principalmente para el tratamiento de la depresión mayor como los ISRS. Por lo mismo, la necesidad crítica de búsqueda o desarrollo de nuevos agentes farmacológicos que permitan aliviar este desorden devastador e incapacitante sigue siendo una necesidad latente en la comunidad clínica. Por otra parte, aun cuando la etiología del TOC no está del todo clara existe evidencia de

algunas vías críticas involucradas, como por ejemplo la serotoninérgica y la glutamatérgica. Específicamente, este trabajo se centra en dos focos: el primero es en el transportador SERT, dado que la evidencia señala que las mutaciones polimórficas aumentan la prevalencia de síntomas del TOC y además es el blanco principal de los ISRS que han sido relativamente efectivos en el tratamiento de la enfermedad. El segundo foco es EAAT3, transportador clave en la regulación del glutamato y en la aparición del TOC cuando este se presenta sobreexpresado. Ambos blancos involucrados en la fisiopatología del TOC con evidencia en hallazgos genéticos, neurofisiológicos y clínicos. Además, la posibilidad de contar con más de un blanco molecular propicia la idea de que el desarrollo de compuestos con potencial acción polifarmacológica pueda ser una alternativa más eficiente y eficaz, tanto desde el punto de vista de los resultados en el tratamiento de la enfermedad como en la seguridad de los pacientes. Por ello se propone la búsqueda de patrones de aminoácidos tridimensionales similares y la determinación de uno o más sitios de unión común entre las proteínas transportadoras SERT y EAAT3. Este (o estos) sitio de unión común permitirán diseñar nuevos compuestos, con un enfoque basado en el receptor, como potencial alternativa farmacológica de acción sobre múltiples objetivos para el tratamiento del TOC.

## Hipótesis

Las estructuras proteicas de SERT y EAAT3 contienen patrones tridimensionales de aminoácidos similares, que permiten determinar un *receptoforo* para el diseño de compuestos químicos promiscuos, selectivos y de unión simultánea a ambas proteínas

## Objetivo General

Determinar un sitio común de unión a ligando entre las estructuras de proteínas SERT y EAAT3 mediante la identificación de patrones tridimensionales de aminoácidos similares y *drogables* para descubrir compuestos químicos multiblanco de unión simultánea a ambas proteínas

## Objetivos específicos

1. Obtener estructuras equilibradas de SERT y EAAT3 humana a través de dinámicas de simulación molecular



2. Determinar un *receptor* mediante la búsqueda de patrones tridimensionales de aminoácidos similares entre las estructuras proteicas de SERT y EAAT3 humano.
3. Construir una biblioteca de compuestos a través de la heurística de un algoritmo genético que busca fragmentos o una combinación de fragmentos que encajan con el receptor anterior determinado.
4. Seleccionar los mejores compuestos con las interacciones más significativas en SERT y EAAT3 a través de simulaciones de acoplamiento molecular

## **Materiales y Métodos**

Para conseguir los objetivos específicos planteados que son componentes del objetivo general que evalúa la hipótesis propuesta. Se realizaron, a modo general, protocolos computacionales de simulación de dinámica molecular, descubrimiento de nuevos sitios de unión común entre las estructuras en cuestión, respectivos análisis y diseño o identificación de compuestos basados en aquel sitio determinado con su posterior evaluación energética. Tales métodos son ilustrados en la figura 30 (ver anexo).

### **Obtención estructuras equilibradas del SERT y EAAT3 humana a través de dinámicas de simulación molecular**

#### Orientación espacial de proteínas de membrana

Luego de descargar los archivos de las estructuras cristalográficas del transportador excitatorio de aminoácidos 3, EAAT3 (PDBid: 6S3Q) (Baronina et al., s.f) y del transportador de serotonina dependiente de sodio, SERT (PDBid: 6AWO) (Coleman & Goaux., 2018) desde la base de datos *Protein Data Bank* (Berman et al., 2000). se procedió a obtener información referencial respecto a su orientación espacial en relación a la membrana lipídica, esto es dado que SERT y EAAT3 corresponden a proteínas de membrana, por ello que desde la base de datos de *Orientation of Protein Membranes OPM* (Lomize et al., 2012), se descargaron los archivos de referencia respectivos y mediante la interfaz del programa *Visual Molecular Dynamics VMD* (Humphrey et al., 1996) a través del complemento de análisis bioinformático *MultiSeq* (Roberts et al., 2006), el cual permite organizar, mostrar y analizar datos de secuencia y estructura para proteínas y ácidos nucleicos. Para

realizar un alineamiento estructural entre la proteína de estudio y su correspondiente referencia orientada, *MultiSeq* usa el programa *Structural Alignment of Multiple Proteins* (Russell & Barton, 1992) para alinear secuencias de proteínas basada en una estructura tridimensional similar. *STAMP* utiliza un algoritmo que minimiza la distancia de los carbonos alfas entre los residuos alineados aplicando rotaciones y traslaciones a nivel global. Una vez alineada la estructura proteica de cada transportador con su respectiva referencia *OPM* mediante *tk console* se guardan como nuevos archivos formato PDB, respectivamente.

### Pre-procesamiento de las estructuras

Mediante *VMD* los modelos de las estructuras proteicas de los transportadores alineadas, se procesaron mediante el *plugin Automatic PSF Builder* para generar automáticamente los archivos *PSF* y *PDB* listo para la dinámica a partir de un *PDB* sin procesar. Un archivo *PSF* o de conectividad contiene toda la información, de una molécula o proteína, necesaria para aplicar un campo de fuerza específico.

### Construcción de los sistemas moleculares

Las proteínas en estudio se embebieron en una membrana del tipo *POPC* (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), respectivamente, cuya topología y parámetros están incluidos en el campo de fuerza (*CHARMM*) *Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics* (Brooks et al., 2009). Por ello en *VMD* se generó mediante el *plugin Membrane Builder* una membrana *POPC*, para cada transportador. Luego de esto se procedió a insertar la proteína en la bicapa lipídica, tanto como el ensamble de la proteína y la membrana, adicionar la caja de solvente (*TIP3*), eliminar el exceso de solvente, neutralizar el sistema y conocer las dimensiones del sistema se utilizaron *scripts* escritos en *tcl*.

Se concibió un sistema final para la proteína SERT con un total de 140.942 átomos, dentro de los cuales 29.124 corresponden a moléculas de agua, con 82 iones de sodio y 85 de cloro y el tamaño del sistema ortorrómbico 123x122x103 Å. El sistema final para la proteína EAAT3 consto de 313.674 átomos de los cuales 65.362 corresponden a moléculas de agua, con 185 iones de sodio y 190 de cloro y el tamaño ortorrómbico 182x182x104 Å.

## Protocolo de simulación

Con el propósito de solucionar errores conformacionales iniciales, (superposiciones aminoacídicas, mala orientación de cadenas laterales, ángulos indefinidos, etc) es decir, ajustar y así evitar impedimentos estéricos de las estructuras cristalográficas de los transportadores SERT y EAAT3 obtenidas desde el *Protein Data Bank*. Mediante el programa *NAMD* (Phillips et al., 2005), el cual es un código paralelo diseñado para simulaciones de altas prestaciones de grandes sistemas biomoleculares y utilizando campos de fuerza empíricos, como el campo de fuerza *CHARMM*. Las simulaciones de dinámica molecular computan las trayectorias atómicas resolviendo las ecuaciones del movimiento numéricamente. En este caso, las estructuras en estudio se sometieron, en un primer lugar, a una minimización de 30.000 pasos con restricción de fuerza de 20 kcal/mol sobre su cadena principal (*backbone*), luego para conseguir una conformación equilibrada se llevaron a cabo seis restricciones de fuerza graduales de 1 nanosegundo sobre el esqueleto carbonatado de la proteína para asegurar la estabilidad del sistema. Finalmente, para ambos sistemas, se realizó una simulación de dinámica molecular de 100 nanosegundos sin restricción, todo esto dentro de un conjunto isobárico isotérmico (temperatura de 310 K y 1 atm) utilizado para realizar los cálculos. y en condiciones de contorno periódicas al sistema en las tres direcciones de coordenadas. Se utilizó la desviación de la raíz cuadrática media (*RMSD*) de las posiciones atómicas como una forma de medir la estabilidad del sistema en el tiempo simulado, para esto se hizo uso de la herramienta complementaria de *VMD RMSD Trajectory Tool*.

## **Determinación del receptofofo mediante el descubrimiento y la búsqueda de patrones de aminoácidos 3D similares entre las estructuras**

### Análisis estructural de posibles sitios de unión

Una vez obtenidas las estructuras de las proteínas transportadoras con una conformación estable y equilibrada, se procedió a realizar un análisis estructural con el objeto de identificar posibles sitios de unión a ligando, comunes y similares entre SERT y EAAT3, la identificación de patrones tridimensionales (3D) conservados permite la predicción de la función de las proteínas, sus agrupaciones,

descubrimiento de fármacos y el establecimiento de relaciones evolutivas. Para esto se utilizó el software *Geomfinder* (Núñez-Vivanco et al., 2016), el cual realiza una estimación detallada de similitudes entre todos los pares de patrones 3D con un enfoque independiente del ligando. Dicha estimación, *Geomfinder*, la realiza en 4 etapas, en la primera etapa se genera en cada proteína una grilla virtual de coordenadas las cuales representan una ubicación inicial para encontrar patrones 3D, luego todos los posibles patrones 3D que se dan en cada proteína de interés son detectados usando como referencia la grilla virtual anteriormente descrita, en una tercera etapa se genera una lista de 4 descriptores para cada patrón identificado, siendo cada uno de ellos como a) La lista de distancias entre los centros geométricos de las cadenas laterales de todos los residuos que forman el patrón 3D, b) la suma de las energías no enlazantes de cada residuo que forma el patrón 3D, c) la lista de los residuos que forman un patrón 3D, y d) la lista de las distancias o rutas que constituyen el camino más corto necesario para recorrer todos los residuos que recubren el patrón 3D. Finalmente, todos los pares de patrones 3D identificados en las dos proteínas evaluadas se comparan usando un enfoque de todo versus todo y al final del análisis, cada par del patrón 3D tiene un puntaje de similitud final llamado *GScore*. El *GScore* se define como una combinación de las similitudes de los cuatro descriptores, que se calculan como los cambios relativos en cada par de patrones 3D. En este caso, *Geomfinder* requiere como entrada los archivos *PDB* de las estructuras de las proteínas transportadoras SERT y EAAT3 equilibradas y estabilizadas provenientes de la simulación de dinámica molecular. Para realizar la búsqueda de patrones similares se acotó la búsqueda a sólo en aquellas zonas de las proteínas, en donde las cavidades detectadas posean un puntaje de drogabilidad (*Minimum druggability percentage*) de al menos el 60%, dicho parámetro interpretado como la probabilidad de unión a droga y que altere su normal funcionamiento de la proteína, este parámetro es calculado considerando tamaño, hidrofobicidad y la polaridad de los residuos que revisten la cavidad o bolsillo evaluado. Adicionalmente, se consideraron como criterios de búsqueda valores constantes para del 55% para el umbral de similitud mínimo (*Filter similar %*) y se consideró 1Å de radio para la grilla virtual (*Grid Radius*) de coordenadas referenciales. Se realizó una exploración 3D en las estructuras para la búsqueda de patrones de interés, para ello se variaron los valores de umbral cercano (*Near Threshold*) y de umbral lejano (*Far Threshold*), estos valores pueden percibirse como los límites dimensionales del patrón 3D a develar. Para cada caso se realizó un análisis de los resultados obtenidos

evaluando la importancia biológica de los residuos (residuos claves) correspondientes a cada sitio del patrón similar hallado basado en la información topológica obtenida (ver anexo: figura 29) desde la literatura y respaldada con la información disponible en la bases de datos *Conserved Domain Database* (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2011) y *UniProt* (Morgat et al., 2019). También se consideraron los valores porcentuales de los 4 descriptores (Energía no enlazante, distancia, perímetro y componente de secuencia) para cada patrón identificado por *Geomfinder* y su respectiva contribución a la puntuación de similitud final expresada como *Gscore*, cabe destacar que valores de *GScore* de 100% representan la existencia de patrones idénticos. Una vez seleccionado cada par patrón similar haciendo énfasis en valores altos de componente de secuencia (*Ssc*) y de energía no enlazante (*SNbE*) se procedió a descargar dichos patrones o bolsillos identificados para cada caso en formato *PDB*.

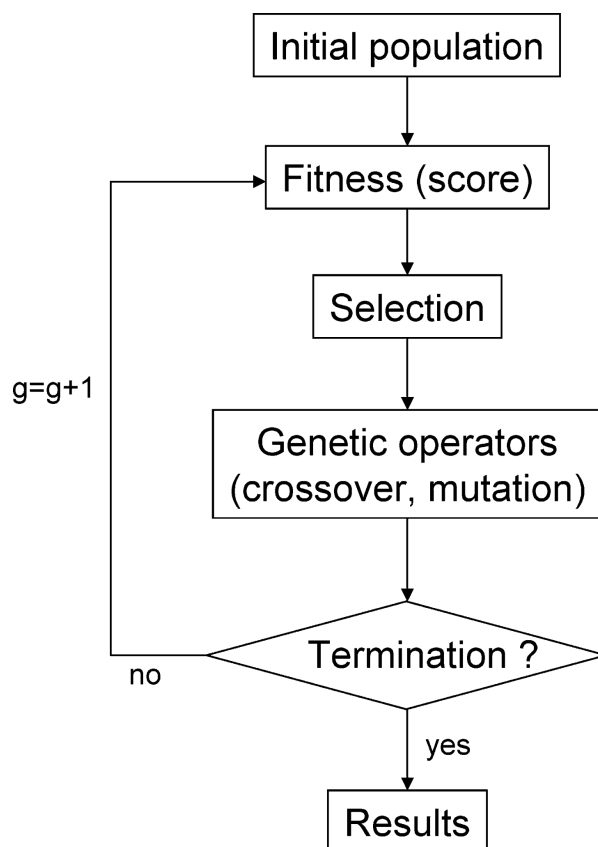
#### Alineamiento y generación de sitio de unión común

Utilizando los archivos *PDB* de los patrones 3D similares obtenidos desde *Geomfinder* mediante el plugin de la *Tk console* del software *VMD*, se extrajeron las coordenadas espaciales de los centros de masa de dichos patrones 3D con la finalidad de construir pseudocentros que simulan un ligando en el sitio central del bolsillo identificado (registro *HETATM* en el archivo *PDB*) y a partir de ello se construyó un sitio de unión común entre *SERT* y *EAAT3* mediante las herramientas *MultiBind* (Shatsky et al., 2006) y *PocketAlign* (Yeturu et al., 2011), las cuales realizan varios alineamientos estructurales y reorganizaciones 3D en búsqueda de la mejor coincidencia de la propiedad fisicoquímica del sitio de unión seleccionado. Primero, el método computacional de *MultiBind* realiza un reconocimiento de arreglos espaciales comunes de las propiedades fisicoquímicas en patrones de unión común entre un set de proteínas dado, este enfoque revela patrones que pueden ser responsables de la unión de un mismo ligando a diferentes dianas proteicas (Núñez-Vivanco et al., 2018). Como archivo de entrada se comprimió el par de archivos *PDB* de los patrones identificados en único archivo *ZIP* y como salida se obtiene el conjunto de las propiedades fisicoquímicas compartidas entre los sitios de unión de entrada y los datos obtenidos son mostrados a través de una tabla para cada solución obtenida ordenada en forma decreciente por un criterio de puntaje de patrón que corresponde a la suma del puntaje de similitud de los pseudocentros comparados que considera criterios tales como proximidad, carga, curvatura de superficie, así como la orientación en el plano de anillos aromáticos

(Shatsky et al., 2006). Paralelo y complementario a lo anterior, se utilizó el algoritmo de *PocketAlign*, para obtener las superposiciones estructurales de los sitios de unión, en general los pasos involucrados en el algoritmo incluyen la construcción de una matriz de puntuación entre los residuos, generación del mapeo de semillas, determinación de pares de residuos consecuentes y un reporte final de alineamientos con un *script* de visualización para *PyMol* [53]. Se ajustaron ambos resultados, es decir, por un lado las propiedades fisicoquímicas obtenidas desde *MultiBind* con el alineamiento estructural concebido desde *PocketAlign* (*best superposition*). Se almacenaron en formato PDB las conformaciones consenso y se generó un sitio de unión común único, se fusionaron todos los aminoácidos equivalentes (mismo grupo fisicoquímico: polar, no polar, con carga positiva o negativa) que aparecían superpuestos en los sitios de unión encontrados en cada proteína. A diferencia de, todos los aminoácidos no equivalentes se conservaron en el sitio de unión de consenso final.

## **Construcción de una biblioteca de compuestos mediante un modelo heurístico**

A partir de lo anterior, se procedió a realizar un diseño de drogas basado en la estructura con la herramienta *LEA3D* (Douguet et al., 2005), este es un servidor web que requiere como entrada el archivo PDB de la estructura del sitio de unión común generado, la cual es utilizada para el diseño racional de moléculas afines con el sitio de unión, como primer paso es requerido definir las coordenadas del sitio central y un valor de radio para el sitio de unión, ya en un segundo paso se debe verificar los datos de entrada y elegir la opción del diseño de novo dejando los parámetros por defecto del tamaño de población y el número de generaciones, esto por recomendación del autor dado que podría incrementar drásticamente tiempo-costo del diseño, sin embargo, cabe destacar que existe la novedosa opción de iniciar el algoritmo con una población de drogas aprobadas por la *FDA* (*U.S. Food and Drug Administration*). Como salida el algoritmo (Figura 6) reporta una tabla con la lista de compuestos creados por generación, su respectiva puntuación en porcentaje. Esta puntuación numérica es obtenida mediante una función que evalúa la idoneidad de la molécula a partir de su estructura molecular (Douguet, 2010). También se reporta por cada generación archivos en formato *SDF*, *PDB* y *MOL2* del compuesto, complejo sitio-ligando y conformación acoplada, respectivamente. Las cuales pueden ser visualizadas en un *applet Jmol* [15].



**Figura 6.** Diagrama de flujo general del algoritmo genético utilizado por la herramienta *LEA3D* de diseño de drogas *de novo*. La población de moléculas se mejoran gradualmente al competir por la “supervivencia del más apto” (Douguet et al., 2005).

Este método de diseño de drogas asistido por computador contribuye, siendo una etapa temprana del proceso descubrimiento de drogas mediante la identificación de nuevas moléculas bioactivas. A diferencia del cribado virtual en bases de datos químicas, en donde se sigue consumiendo mucho tiempo inclusive con métodos de alto rendimiento el diseño de fármacos de novo puede crear moléculas que no existen en las bases de datos de compuestos conocidos, a través de la exploración de manera eficiente del espacio químico sin una enumeración completa. La optimización de los algoritmos evolutivos, análogos a los algoritmos genéticos, son ejemplos de heurísticas empleadas para este propósito. La principal desventaja de esta estrategia es que puede generar compuestos prometedores pero difíciles de sintetizar. Para superar este defecto, los compuestos diseñados se pueden utilizar alternativamente como una consulta en una búsqueda de similitud estructural en bases de datos de compuestos comerciales (Douguet, 2010). Tales como *ZINC* (Sterling & Irwin, 2015) y/o *DrugBank* (Wishart et al., 2017), lo cual permite descargar y almacenar de forma local, archivos en formato *SDF* a partir del compuesto seleccionado.

# Selección de los mejores compuestos de interacción significativa en SERT y EAAT3 mediante simulaciones de acoplamiento molecular

Se realizó una simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando con el propósito de estudiar cómo los ligandos se unen a las proteínas estudiadas. Esto se realiza mediante cálculos de acoplamiento, los cuales proponen orientaciones de dichos ligandos en los sitios de unión de las proteínas, visualizando interacciones intermoleculares químicas y estimando energías o afinidades de unión (Caballero, 2020). Los algoritmos de acoplamiento ordenan los ligandos y predicen dichas afinidades de unión mediante funciones de puntuación que intentan distinguir entre las moléculas que se unen fuertemente en una ubicación óptima de las que se unen débilmente, este enfoque es recurrente en el diseño de drogas basado en estructuras. A grandes rasgos, el acoplamiento se puede resumir en dos pasos interrelacionados: primero, muestreando las conformaciones del ligando en el sitio activo de la proteína; luego clasificando estas conformaciones a través de una función de puntuación (Meng et al., 2011). Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó el programa *Maestro* [46], el cual es una interfaz gráfica de usuario unificada y multiplataforma que se puede utilizar para construir estructuras, para configurar y realizar cálculos mediante programas de la suite *Schrödinger*.

## Preparación de las estructuras ligando

Una vez descargadas e identificadas las estructuras de los compuestos químicos diseñados para cada sitio de unión común determinado anteriormente, se procedió a preparar las estructuras mediante el panel de *LigPrep* de *Maestro*, produciendo las correspondientes estructuras 3D minimizadas energéticamente, como salida *LigPrep* reporta múltiples conformaciones 3D de ligando por ello se realiza una comparativa de la estructura del ligando visualizada 3D en *MolView*<sup>2</sup>.

## Preparación de la estructura proteica

En *Maestro*, se utilizaron como archivos de entrada las estructuras de las proteínas SERT y EAAT3 de conformación estable y equilibrada permitidas por las dinámicas de simulación molecular y mediante la opción *Protein Preparation Wizard* de la suite *Schrödinger* se removieron los hidrógenos originales de cada estructura, esta opción

---

<sup>2</sup> <https://molview.org>



permite solucionar cualquier problema con los átomos de hidrógeno en la estructura. Además se optimizó la asignación de los enlaces de hidrógeno a través de la reorientación de los grupos hidroxilo y tiol, moléculas de agua, las amidas de los residuos de asparagina y glutamina, y los anillos imidazol en las histidinas. Estas optimizaciones son necesarias porque la orientación de los grupos hidroxilo (o tiol), los grupos amida terminales en asparagina y glutamina, y el anillo de histidina, no se pueden determinar a partir de la estructura de rayos X.

### Creación de la grilla virtual para el acoplamiento

En este caso para la creación de la grilla virtual se hacen uso de los números de los residuos identificados para cada pocket perteneciente a SERT y EAAT3, la opción *Receptor Grid Generation* de *Maestro* permite especificar la posición y la extensión o tamaño de la región para la grilla en donde se posa el ligando. Esto permite almacenar un archivo en formato *ZIP* el cual es solicitado para realizar el *docking*.

### Acoplamiento de ligando

Para comenzar se debe importar el archivo *ZIP* correspondiente a la información de la grilla anteriormente creada, adicionalmente se debe indicar la estructura de la proteína y del ligando que serán sometidos a la simulación de acoplamiento, también se parametriza la precisión del proceso, nombre del archivo de salida y el número de poses, cabe destacar que el manual de *Schrödinger* sugiere evitar parametrizar una gran cantidad de poses para el caso de pequeños bolsillos de unión o ligandos con pocos enlaces rotativos.

### Visualización del complejo proteína-ligando en PLIP

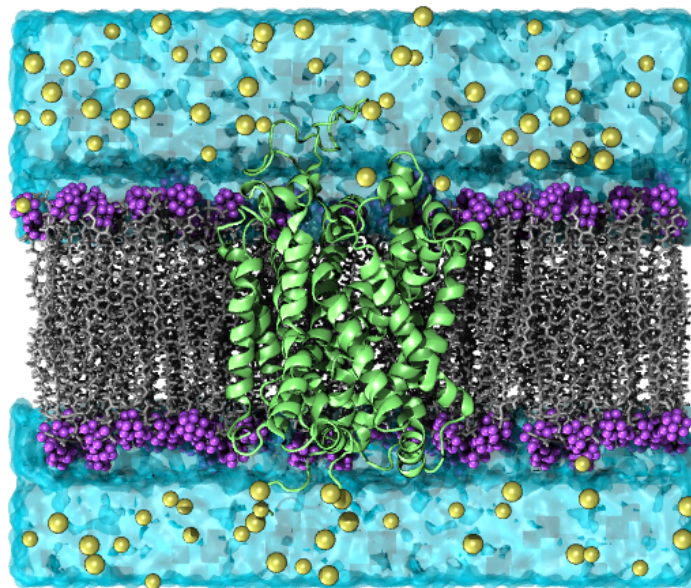
Como una forma de caracterizar las interacciones no covalentes de los compuestos simulados en cada sitio de unión de ambas proteínas, se utilizó el generador de perfiles de interacción proteína-ligando (*PLIP*) (Salentin et al., 2015), el cual es una herramienta complementaria para la detección y visualización de los patrones de interacción proteína-ligando. El *software* enumera todas las interacciones a nivel de átomo, lo cual permite un análisis de características de unión específicas, la herramienta es posible utilizarla en su sitio web, también puede ser utilizada de manera local al descargar su código fuente escrito en *Python*. En su versión *web* la herramienta requiere como archivo de entrada en formato *PDB* el complejo de

proteína-ligando, en este caso se utilizó los archivos resultantes de la simulación de acoplamiento molecular realizada en *Maestro*. Para detectar e informar las interacciones relevantes el algoritmo de *PLIP* realiza cuatro pasos: 1) preparar la estructura, aquí la estructura de entrada es hidrogenada y los ligandos se extraen junto con sus sitios de unión; 2) caracterización funcional, se detectan átomos hidrofóbicos, así como aceptores y donadores, para enlaces de hidrógeno y halógeno, también se buscan anillos aromáticos y centros de carga en proteína y ligando ; 3) comparación basada en reglas, y 4) filtrado de interacciones, que es básicamente para eliminar redundancias y superposiciones en las interacciones, *PLIP* busca y reporta los contactos más relevantes con la distancia más corta dentro de una vecindad (Salentin et al., 2015). En la versión *web*, como salida *PLIP* muestra diagramas de interacción en 2D y 3D, una tabla con detalles de la interacción atómica, así también como resultados descargables en distintos formatos.

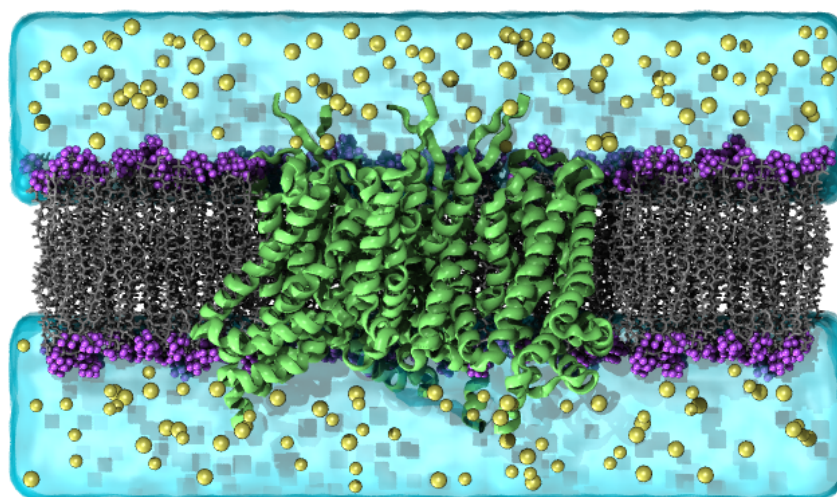
## Resultados y discusión

### Construcción de los sistemas moleculares

#### *Representación del sistema para SERT*

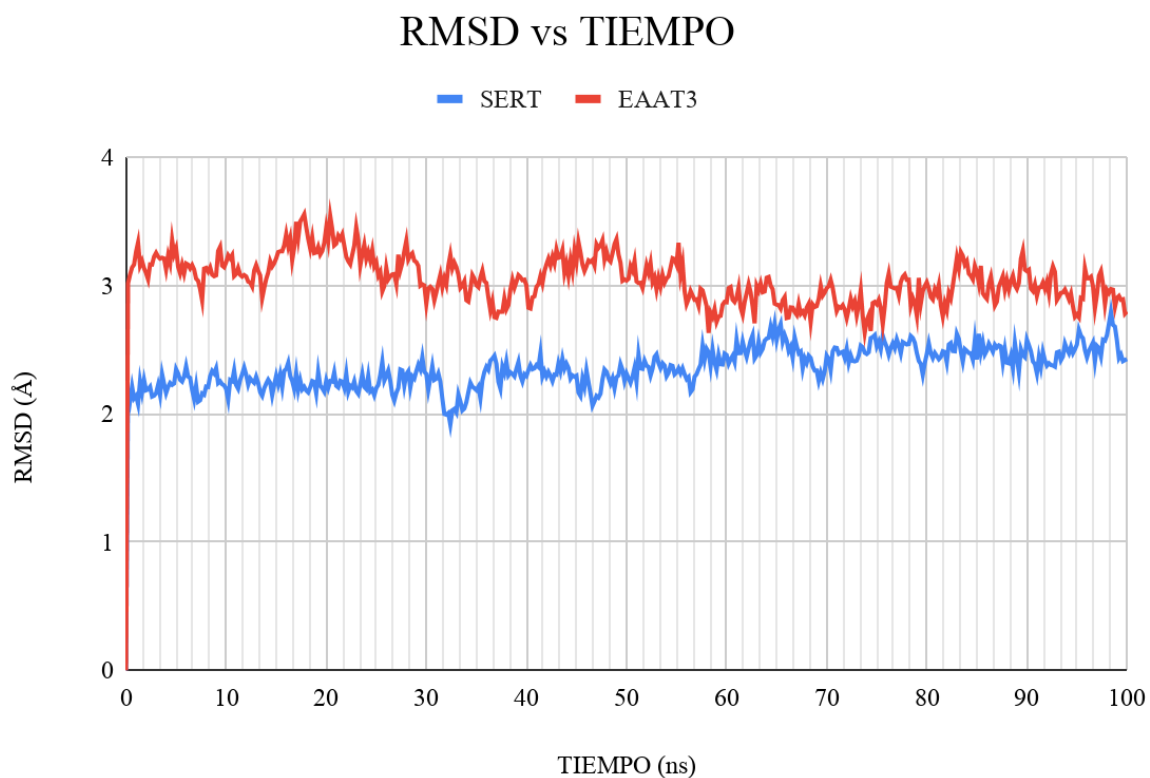


**Figura 8.** Sistema embebido en membrana de *POPC* para la proteína 6AWO (SERT) con sus respectivas aguas e iones.



**Figura 9.** Sistema embebido en membrana de *POPC* para la proteína 6S3Q (EAAT3) con sus respectivas aguas e iones.

RMSD del backbone de las proteínas SERT y EAAT3 en las dinámicas de simulaciones molecular



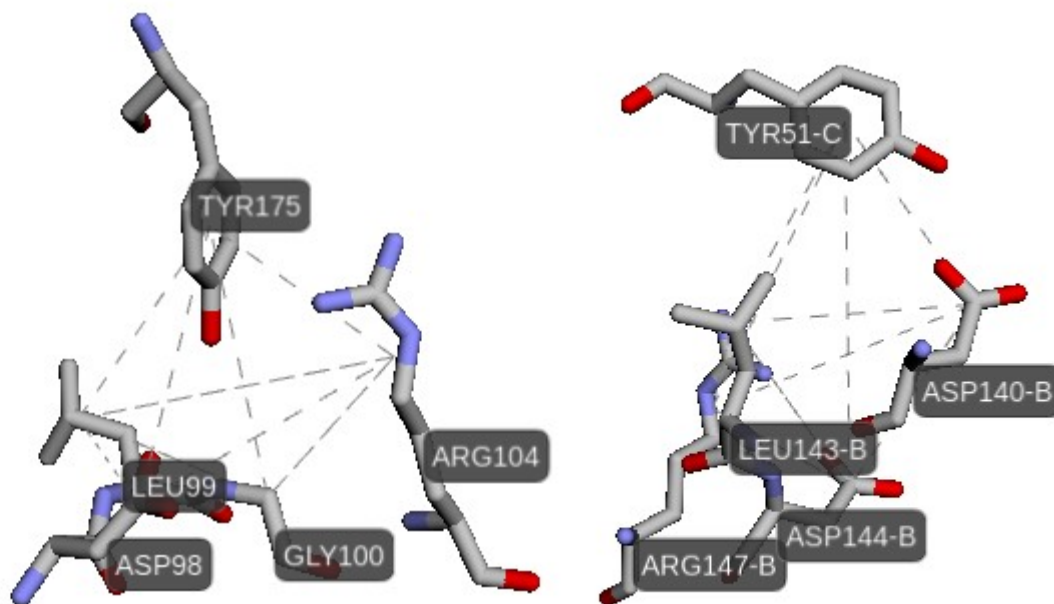
**Figura 10.** Gráfica la desviación cuadrática media versus el tiempo de la trayectoria para las estructuras de los transportadores SERT y EAAT3

Como se aprecia en la gráfica, (Figura 10), el *RMSD* para la trayectoria de ambas proteínas fluctúa en el rango de  $\pm 0,5$  Å durante los 100 nanosegundos de simulación. Esto es considerado como un indicador que permite realizar análisis estructurales de los transportadores que han sido sometidos al proceso de simulación.

### Identificación de patrones 3D similares entre SERT y EAAT3

A partir de las conformaciones estabilizadas y equilibradas obtenidas de la simulación de dinámica molecular se extrajeron y almacenaron las coordenadas atómicas como archivos de formato *PDB* para cada estructura en estudio y fueron utilizadas como entrada (ambas dos) en el software *Geomfinder*. En *Geomfinder* se acotó la exploración a zonas de las proteínas en donde los bolsillos o cavidades detectados posean un porcentaje de *drogabilidad* de al menos el 60% y una similitud del 55%. Se seleccionaron cuatro pares de patrones similares, en donde se variaron los parámetros de umbral cercano (*Near Threshold*) y lejano (*Far Threshold*) considerados como los límites dimensionales del patrón 3D a develar.

#### *Patrón 1*

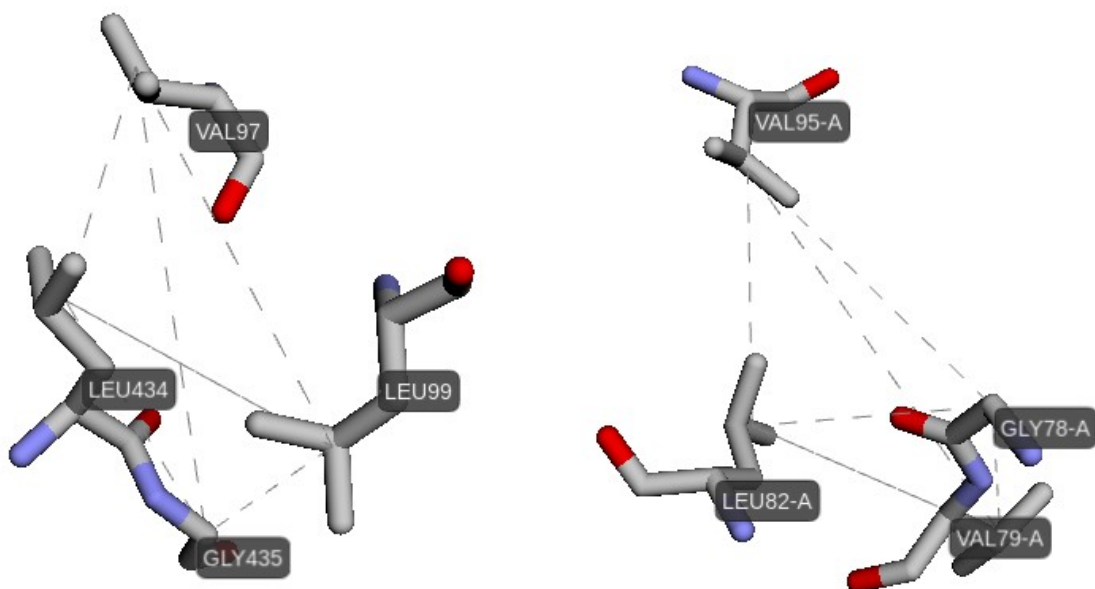


Gscore	SNbE	SDist	Stsp	Ssc
59,5	93	40	25	80

**Figura 11.** Patrón 1 similar encontrado en SERT (izquierda) y EAAT3 (derecha). En este caso se parametrizo un valor de *Near Threshold*=2 Å y de *Far Threshold*= 5Å

El bolsillo identificado en SERT tiene un valor de *drogabilidad* del 99,8% reportado por *Geomfinder* además todos los residuos son claves. Asp98, Leu99 y Gly100 forman parte del sitio 1 putativo de unión a sustrato. Asp98 forma interacciones electrostáticas con el grupo amino de sustratos e inhibidores, también con los grupos amino de (S)-citalopram y paroxetina interactúan con su grupo carboxilo a una distancia de 4,1Å y 3,1Å, este residuo es crucial para unión a drogas, Arg104 forma interacciones catión- $\pi$ , aromáticas y enlace de hidrógeno con ISRS, este residuo junto a Tyr175 forman parte del sitio 2 putativo de unión a sustrato (sitio alostérico). (Coleman & Gouaux, 2018). Por otra parte, el bolsillo EAAT3 similar correspondiente reportó un 63,5% de *drogabilidad*, también cabe destacar que los residuos de tirosina en ambas estructuras muestran una orientación similar.

*Patrón 2*



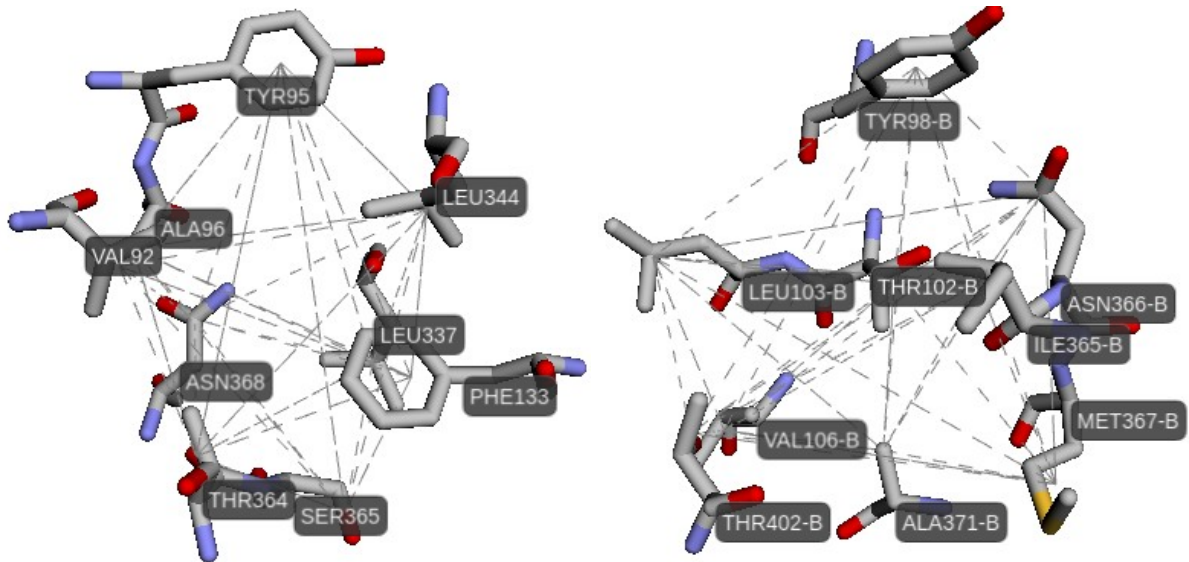
Gscore	SNbE	SDist	Stsp	Ssc
72,9	91,7	66,7	33,3	100

**Figura 12.** Patrón 2 similar encontrado en SERT (izquierda) y EAAT3 (derecha). En este caso se parametrizo un valor de *Near Threshold*=3 Å y de *Far Threshold*=7 Å

El patrón de SERT contiene 3 residuos claves, Val97 y Leu434, que son parte del sitio 2 de unión a sodio, también Leu99 que forma parte del sitio de unión central. Los primeros dos residuos son localizados en la hélice transmembrana 1 y 8, respectivamente. Sin embargo, para el caso de EAAT3, de acuerdo con lo investigado los residuos encontrados no forman parte de sitios de unión a ligando,

pero, de acuerdo con lo reportado por *Geomfinder*, los patrones están ubicados en zonas con alta *drogabilidad* siendo un 99,8% para SERT y 68,5% para EAAT3.

### Patrón 3

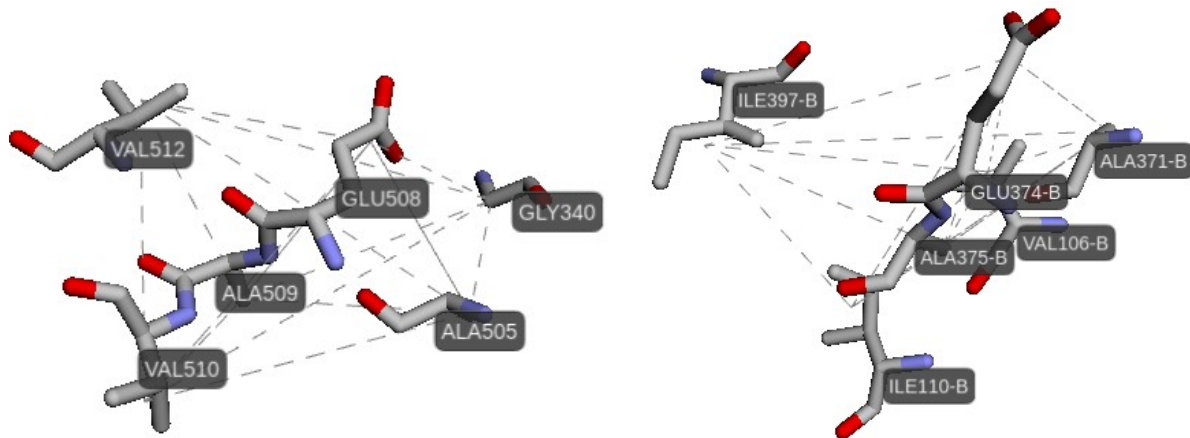


Gscore	SNbE	SDist	Stsp	Ssc
59,9	98,1	27,8	25	88,9

**Figura 13.** Patrón 3 similar encontrado en SERT (izquierda) y EAAT3 (derecha). En este caso se parametrizo un valor de *Near Threshold*=4 Å y de *Far Threshold*=9 Å

Los residuos Tyr95 y Ala96 del bolsillo identificado en SERT forman parte del sitio central, además, Tyr95 forma interacción del tipo catión- $\pi$  y enlace de hidrógeno con s-citalopram y es residuo crucial para unión a drogas (Coleman & Gouaux, 2018). Ala96 junto a Asn368 forman parte del sitio 1 de unión a sodio. En el bolsillo de EAAT3 identificado, los residuos Tyr98 y Thr102 son parte del sitio de unión a sodio 3, Ile365 participa del sitio de unión a potasio, Asn366 es parte del sitio de unión a sodio 1 y 3. Met367 es parte del sitio de unión a sodio 2. Ambos residuos de tirosina en cada bolsillo muestran una orientación similar.

#### Patrón 4

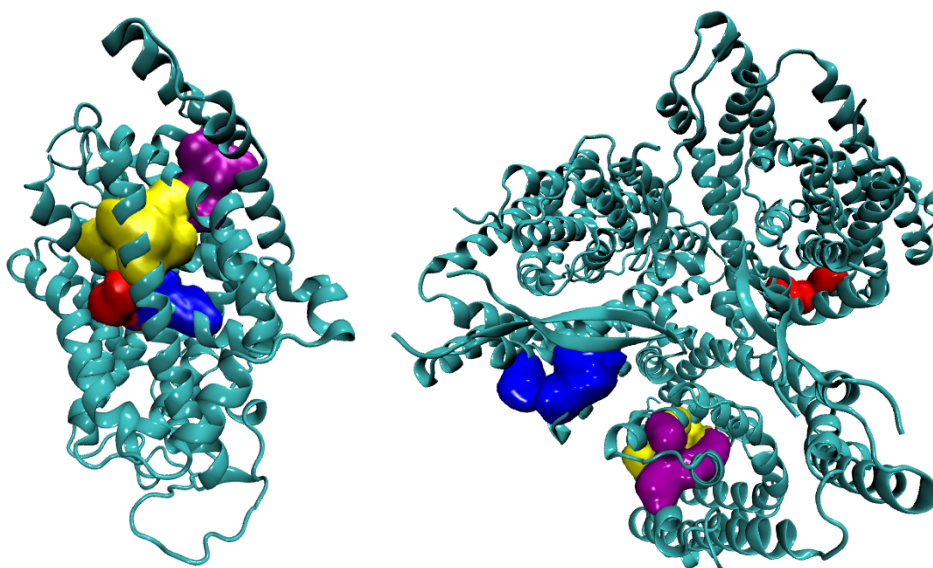


Gscore	SNbE	SDist	Stsp	Ssc
69,9	95,9	40	25	100

**Figura 14.** Patrón 4 similar encontrado en SERT (izquierda) y EAAT3 (derecha). En este caso se parametrizo un valor de *Near Threshold*=4 Å y de *Far Threshold*=9 Å

El bolsillo hallado en SERT presenta residuos que no se identifican como parte de un sitio de unión conocido pero se sabe que Ala505, Glu508, Ala509, Val510 y 512 forman parte de la región transmembranal 10, en cambio Gly340 es miembro de la transmembrana 6. Por otra parte, en el bolsillo de EAAT3 el Glu374 es residuo clave para la coordinación de glutamato e iones tal como el potasio.

*Patrones similares identificados en 6AWO y SERT*



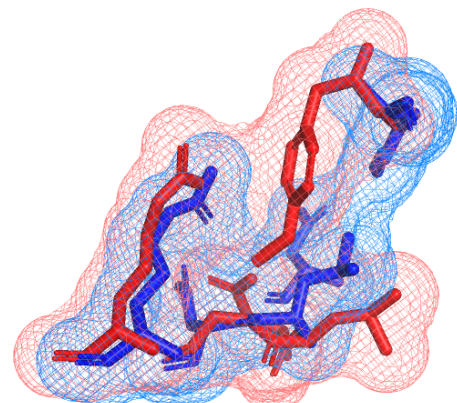
**Figura 15.** Patrones similares identificados en las estructuras de los transportadores SERT (izquierda) y EAAT3 (derecha). Representados en *Quick Surf* (VMD). Colores: azul patrón 1; rojo patrón 2; amarillo patrón 3; y púrpura el patrón 4.

La importancia del valor de *GScore* reportado por *Geomfinder* depende de la pregunta de investigación abordada, por ejemplo, en el caso de dos proteínas que pertenecen a la misma familia y que muestran pliegues globales muy similares, un *GScore* del 70% para un par de patrones dado podría implicar que tales patrones podrían explotarse para la búsqueda de ligandos capaces de discriminar entre ambas proteínas (Núñez-Vivanco et al., 2016). En este caso dado que las proteínas estudiadas son diferentes tanto a nivel de secuencia, estructura y topología el mismo valor de *GScore* podría denotar un par de patrones 3D que podrían ser útiles para el descubrimiento de ligandos comunes. Las características similares expresadas en forma de *GScore* para el patrón 2 (72,9%), seguido por el patrón 4 (69%), patrón 3 (59,9%) y finalmente el patrón 1 (59,5%), para cada par de patrón identificado y seleccionado también se reportan los descriptores que son componentes del *GScore*, valores altos para la característica de energía no enlazante (*SNbE*) y del componente de secuencia (*SSc*) se han considerado como la energía libre para interactuar y la similitud del punto de vista físico químico respectivamente.

#### Alineamiento y generación de sitio de unión común

Para la construcción del sitio de unión para cada patrón similar 3D se hizo uso de las herramientas *MultiBind* y *PocketAlign*. Desde *MultiBind* se obtuvo la mejor relación fisicoquímica y desde *PocketAlign* se obtuvo la mejor superposición para cada sitio de unión evaluado, tal como se muestra en las siguientes figuras.

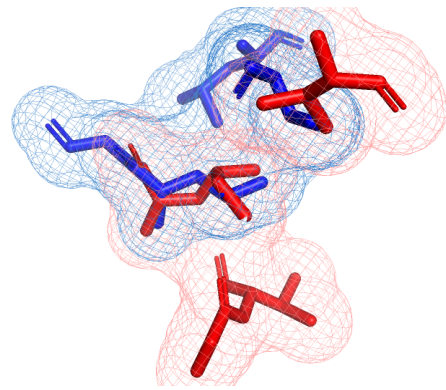
Solution Num: 1		Solution Size: 8		<a href="#">aligned.pdb</a>		<a href="#">View solution 1 with Jmol</a>	
Ligand 1 : UNL:176(Chain:A)			Ligand 2 : UNL:52(Chains:B,C)			Score: 15.9486	
Rigid transformation of binding site 1 : 2.96622 0.346634 -0.00576237 11.3501 26.1699 12.3773							
Site 1: P1.pdb			Site 2: P2.pdb			Property	
Chain.ID	A. A.	Type	Chain.ID	A. A.	Type	Source	Same AA
A.98	Asp	ACC	B.144	Asp	ACC	s	*
A.98	Asp	ACC	B.144	Asp	ACC	s	*
A.99	Leu	ACC	B.143	Leu	ACC	b	*
A.99	Leu	ALI	B.143	Leu	ALI	s	*
A.100	Gly	PII	B.144	Asp	PII		
A.104	Arg	DON	B.147	Arg	DON	s	*
A.104	Arg	DON	B.147	Arg	DON	s	*
A.104	Arg	DON	B.147	Arg	DON	s	*



**Figura 16.** Sitio de unión común sobre SERT y EAAT3 (patrón 1). La tabla reportada de *MultiBind* indica la equivalencia de las propiedades fisicoquímicas entre ambos bolsillos. Se muestra el alineamiento de ambos bolsillos permitidos por una representación en licorice de *Pymol* (Rojo: SERT; Azul: EAAT3).

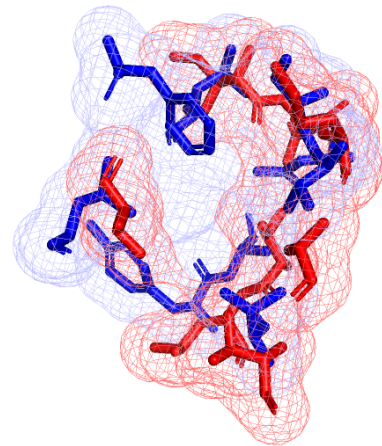


MultiBind results for comparison of 2 binding sites.			Save all results: <a href="#">all_results.zip</a>				
Solution Num: 1	Solution Size: 6	<a href="#">aligned.pdb</a>	<a href="#">View solution 1 with Jmol</a>				
Ligand 1 : UNL:96(Chain:A)		Ligand 2 : UNL:436(Chain:A)		Score: 15.1401			
Rigid transformation of binding site 1 : 0.682567 0.0543016 1.16354 2.02687 -7.16477 -20.7949							
Site 1: p1.pdb			Site 2: p2.pdb			Property	
Chain.ID	A. A.	Type	Chain.ID	A. A.	Type	Source	Same AA
A.78	Gly	PII	A.99	Leu	PII		
A.79	Val	PII	A.97	Val	PII	b	*
A.79	Val	ACC	A.97	Val	ACC	b	*
A.82	Leu	PII	A.434	Leu	PII	b	*
A.82	Leu	ACC	A.434	Leu	ACC	b	*
A.82	Leu	ALI	A.434	Leu	ALI	s	*



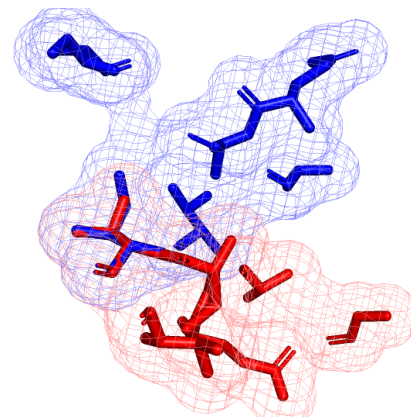
**Figura 17.** Sitio de unión común sobre SERT y EAAT3 (patrón 2). La tabla reportada de *MultiBind* indica la equivalencia de las propiedades fisicoquímicas entre ambos bolsillos. Se muestra el alineamiento de ambos bolsillos permitidos por una representación en licorice de *Pymol* (Rojo: EAAT3; Azul: SERT).

Solution Num: 1			Solution Size: 6			<a href="#">aligned.pdb</a>		<a href="#">View solution 1 with Jmol</a>	
Ligand 1 : UNL:403(Chain:B)			Ligand 2 : UNL:369(Chain:A)			Score: 13.2149			
Rigid transformation of binding site 1 : 3.0414 1.01551 2.48805 -56.4758 7.52457 -9.15779									
Site 1: P1.pdb			Site 2: P2.pdb			Property			
Chain.ID	A. A.	Type	Chain.ID	A. A.	Type	Source	Same AA		
B.102	Thr	DON	A.337	Leu	DON				
B.102	Thr	DAC	A.337	Leu	ACC				
B.366	Asn	DON	A.368	Asn	DON	s	*		
B.367	Met	PII	A.95	Tyr	PII				
B.367	Met	ALI	A.92	Val	ALI				
B.371	Ala	ALI	A.344	Leu	ALI				



**Figura 18.** Sitio de unión común sobre SERT y EAAT3 (patrón 3). La tabla reportada de *MultiBind* indica la equivalencia de las propiedades fisicoquímicas entre ambos bolsillos. Se muestra el alineamiento de ambos bolsillos permitidos por una representación en licorice de *Pymol* (Rojo: EAAT3; Azul: SERT).

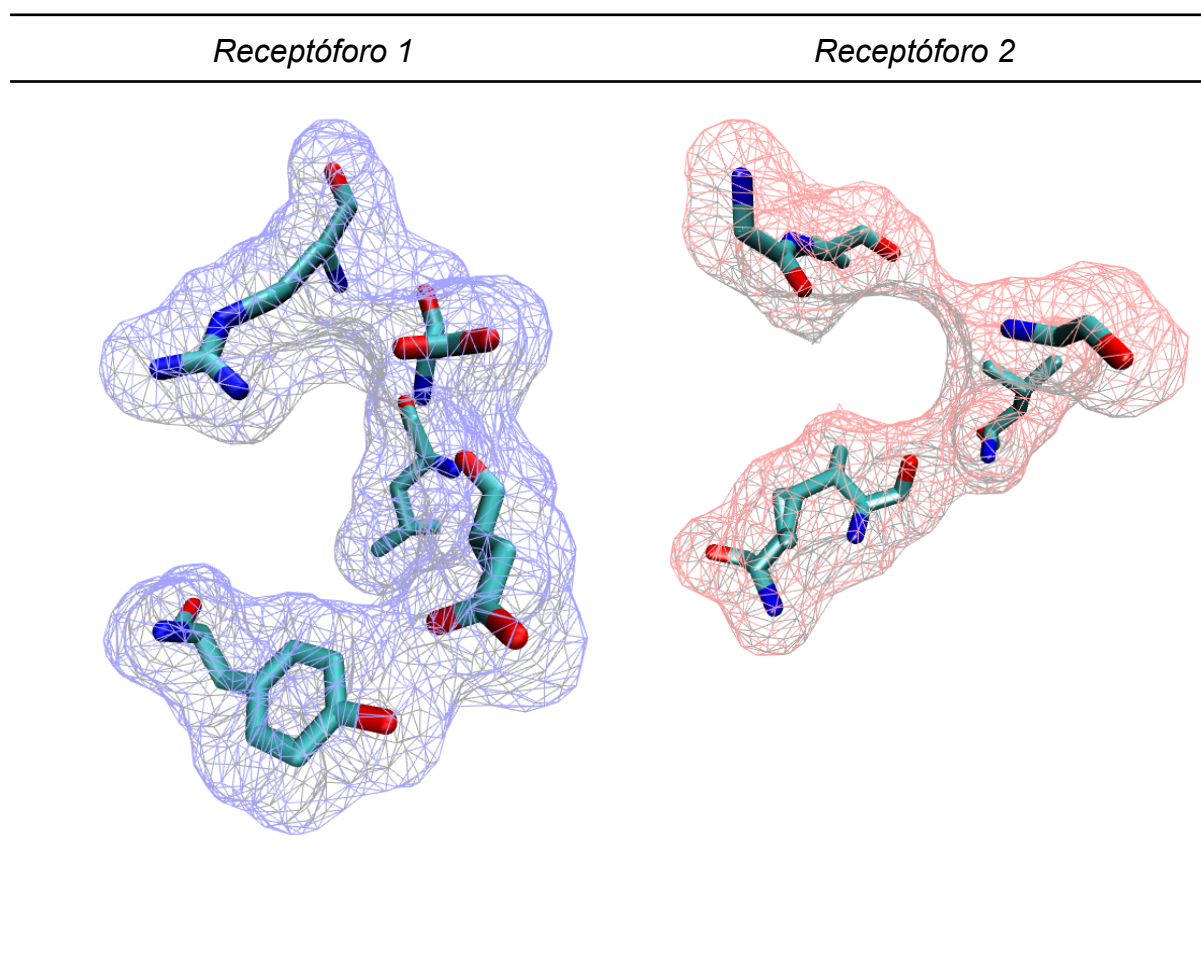
Solution Num: 1			Solution Size: 7			<a href="#">aligned.pdb</a>		<a href="#">View solution 1 with Jmol</a>		
Ligand 1 : UNL:513(Chain:A)			Ligand 2 : UNL:398(Chain:B)			Score: 16.5722				
Rigid transformation of binding site 1 : -2.84302 -0.608636 2.07729 -14.1654 35.0801 -34.994										
Site 1: P1.pdb			Site 2: p2.pdb			Property				
Chain.ID	A. A.	Type	Chain.ID	A. A.	Type	Source	Same AA			
A.505	Ala	PII	B.371	Ala	PII	b	*			
A.505	Ala	ACC	B.371	Ala	ACC	b	*			
A.508	Glu	DON	B.110	Ile	DON					
A.508	Glu	ACC	B.374	Glu	ACC		*			
A.508	Glu	ACC	B.375	Ala	ACC					
A.509	Ala	ALI	B.106	Val	ALI					
A.512	Val	ALI	B.397	Ile	ALI					



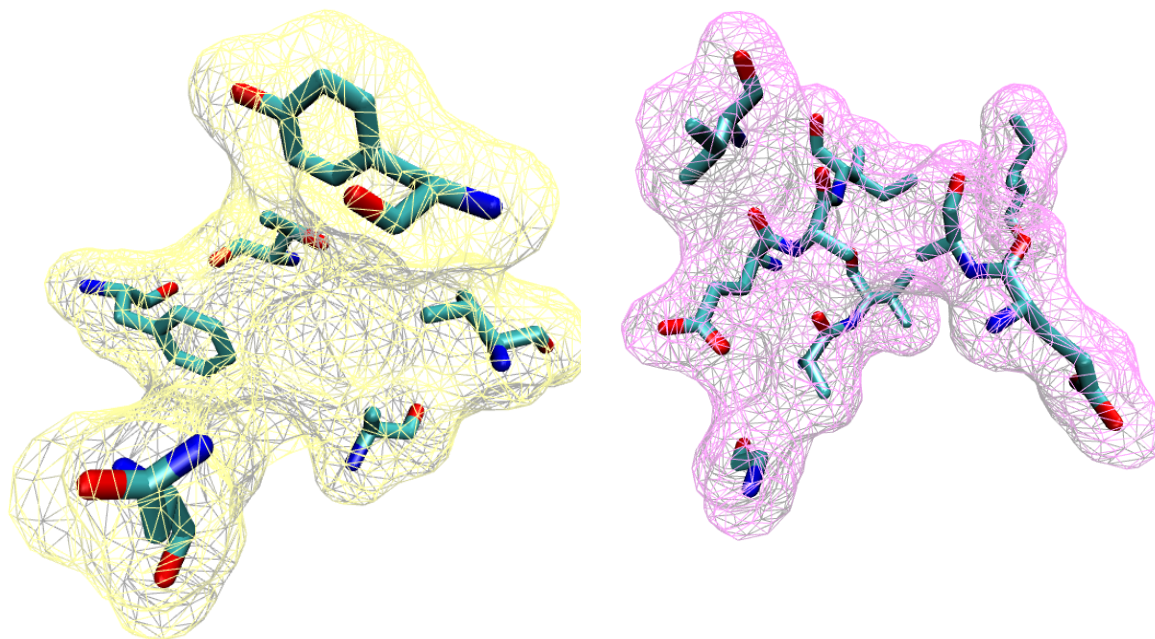
**Figura 19.** Sitio de unión común sobre SERT y EAAT3 (patrón 4). La tabla reportada de *MultiBind* indica la equivalencia de las propiedades fisicoquímicas entre ambos bolsillos. Se muestra el alineamiento de ambos bolsillos permitidos por una representación en licorice de *Pymol* (Rojo: SERT; Azul: EAAT3).

A partir de la información resultante de las herramientas utilizadas se realizó una depuración manual y así una fusión de ambos patrones 3D similares identificados, es decir, los aminoácidos equivalentes con mismo grupo fisicoquímico (polar, no

polar, con carga positiva o negativa) que aparecen superpuestos en los sitios de unión encontrados, se fusionaron. A diferencia de, todos los aminoácidos no equivalentes se conservaron en el sitio de unión de consenso final. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que este sitio de unión de consenso debe considerarse con cautela en términos del diseño del fármaco, ya que podría no reflejar algunas características fisicoquímicas específicas de cada sitio de unión aislado (Núñez-Vivanco et al., 2016).



**Figura 20.** Respectivos *receptóforos* contruidos a partir de patrones 1 y 2 similares identificados en SERT y EAAT3



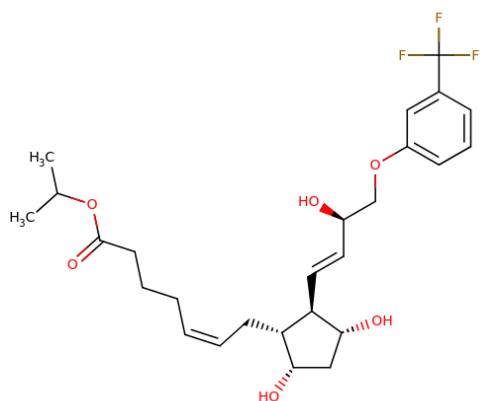
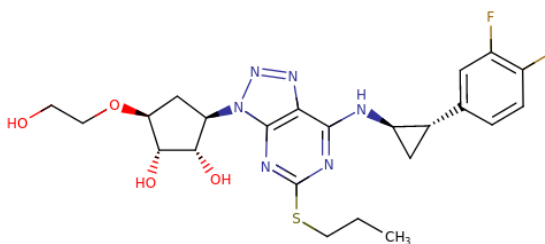
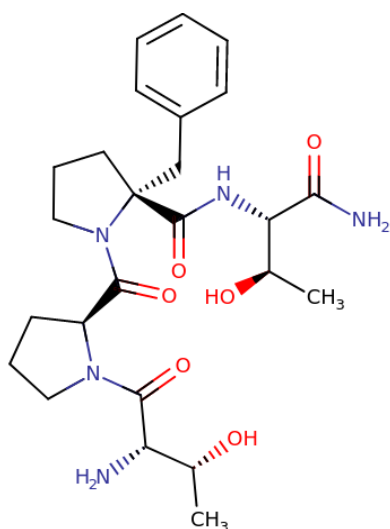
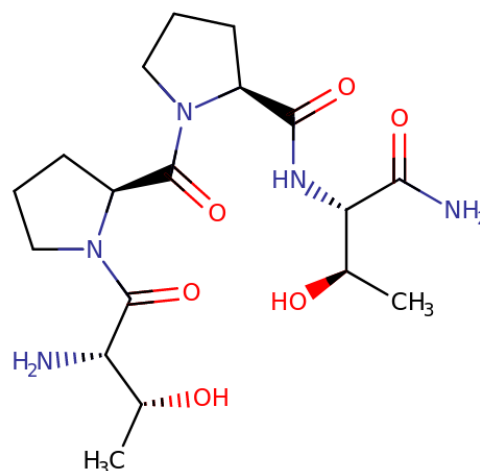
**Figura 21.** Respectivos *receptóforos* construidos a partir de patrones 3 y 4 similares identificados en SERT y EAAT3

El *receptóforo* correspondiente al patrón 1 está formado por los residuos leucina, arginina, tirosina y ácido aspártico con una cavidad definida en su forma. El sitio 1 se caracteriza por poseer una zona cargada positivamente (Arg) y otra negativamente por dos residuos (Asp). Una zona no polar (hidrófoba) con un anillo aromático (Tyr) y alifática (Leu). El *receptóforo* 2, también forma una cavidad en su geometría, el bolsillo se constituye principalmente por una zona apolar alifática (Val, Leu y Gly). En el *receptóforo* 3 se conforma por los siguientes residuos Tyr, Phe, Val, Asn, Ala, Thr. Tiene una forma de cavidad bien definida y algunas de sus características químicas son cuatro componentes apolares, de los cuales dos son aromáticos (Tyr y Phe) y alifáticos (Val y Leu), también se constituye por otra zona con componentes polares sin carga (Asn y Thr). El *receptóforo* 4, se conforma por diez residuos, una zona apolar alifática constituida por (Ala, Val, Ile y Gly) y otra zona polar con carga negativa (Glu).

## Diseño de compuestos selectivos basado en el sitio de unión común generado.

A partir de los 4 *receptóforos* construidos en el paso anterior se procedió a realizar un diseño de drogas basado en el receptor con la herramienta *LEA3D*. Este servidor a diferencia de un enfoque de cribado virtual de millones de compuestos es un enfoque alternativo de diseño de drogas *de novo* utiliza una estrategia que explora de manera eficiente el espacio químico. De acuerdo con Douguet, las tareas de diseño de drogas *de novo* basada en la estructuras tardan alrededor de 6 horas, sin embargo esto en la práctica fue mayor (en el orden de días). Para cada *receptóforo* se obtuvo un listado de 20 moléculas, categorizadas por un puntaje calculado por el programa *PLANTS* (Korb et al., 2009), cada molécula o compuesto fue descargada en un archivo de formato *sdf*.

Como una estrategia de reutilización de fármacos, mediante la base de datos *DrugBank*, se realizó una búsqueda por estructuras similares y los compuestos encontrados se resumen en la figura 22.

Travoprost (*receptor 1*)Ticagrelor (*receptor 2*)NRX-1074 (*receptor 3*)Rapastinel (*receptor 4*)

**Figura 22.** Compuestos identificados y determinados para cada sitio de unión consenso construido proveídos a partir del diseño de drogas de novo basado en la estructura permitidos por la herramienta LEA3D.

Para el *receptor 1*, el diseño de novo genero Travoprost (DB00287), el cual es una solución oftalmológica tópica utilizada para controlar la progresión del glaucoma o la hipertensión ocular. El compuesto para el *receptor 2* obtuvo una coincidencia en la base de datos de *DrugBank* con Ticagrelor (DB08816), que es indicado para reducir el riesgo de muerte cardiovascular, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. Cabe señalar que ambos compuestos se encuentran aprobados por la *FDA*. En el caso del *receptor 3* se determinó un candidato compuesto denominado NRX-1074 (DB11784) el cual está en etapa de investigación como tratamiento para la esquizofrenia. Finalmente, el compuesto propuesto para el *receptor 4*, correspondio a Raspastinel (DB11801), el cual es un compuesto en

etapa de investigación que se ha utilizado en ensayos de estudio para el tratamiento de la depresión mayor y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC).

Estimar la energía libre de unión y modos de enlace entre ligando-proteínas mediante simulaciones de acoplamiento molecular

Proteína		EAAT3	SERT
Sitio de unión	Molécula	<i>Docking Score</i> (Kcal/mol)	
1	Travoprost	-7.362	-8.062
2	Ticagrelor	-6.301	-8.103
3	NRX-1074	-4.613	-7.882
4	Rapastinel	-5.863	-6.519

**Figura 23.** Tabla resumen de los mejores resultados de la simulación de acoplamiento molecular para los sitios de unión identificados con su respectivas moléculas.

En la simulación de acoplamiento molecular, en *Maestro*, Travoprost en el sitio de unión 1 de EAAT3 (figura 24) mostró interacciones del tipo de enlaces de hidrógeno con el oxígeno de la cadena lateral de Asp140 y un átomo de oxígeno con un hidrógeno de la cadena lateral de Arg147, ambos residuos de la cadena B del homotrímero. Curiosamente, al realizar la caracterización y visualización en PLIP, se muestran otros tipos de interacción que no son expuestos explícitamente por *Maestro*, tales como interacciones hidrofóbicas o enlaces halógenos, los cuales son reportadas por *PLIP* basándose en la literatura científica. Sin embargo para el caso de la interacción de Arg147, *PLIP* la reporta como un puente salino, esto es, porque este tipo de enlace es similar en sus características con el enlace de hidrógeno y dado que fue el caso, en que se detectó a ambos tipos de interacción para el mismo emparejamiento de átomos, sólo se informó uno de ellos (Salentin et al., 2015). Por otro lado, para el mismo sitio de unión 1 en SERT, el compuesto también estableció enlaces de hidrógeno con los mismos aminoácidos, Asp98 y Arg104.

---

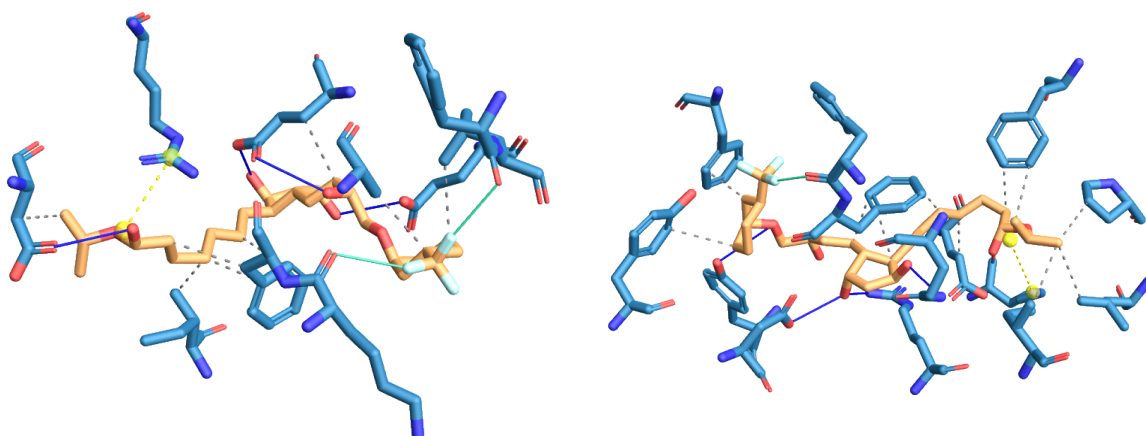
## Complejo sitio de unión 1-Travoprost

---

EAAT3

SERT

---



---

**Figura 24. Visualización del complejo proteína-ligando** asociado al sitio de unión 1 identificado en EAAT3 y SERT. En amarillo el ligando Travoprost, la líneas azules representan los enlaces de hidrogeno y las líneas discontinuas en amarillo representan el puente salino. Imágenes obtenidas desde PLIP.

Para la simulación en el sitio de unión 2. EAAT3 con ticagrelor (figura 25) establece enlaces de hidrógeno con el residuo de Gly78 también con Asn85 (ambos residuos de la cadena A) sin embargo, este último residuo no forma parte del sitio de unión 2 caracterizado. En este mismo sitio 2 para SERT con el mismo compuesto, no se establecieron enlaces con los residuos del bolsillo, sin embargo se mostró un enlace de tipo catión- $\pi$  con el anillo de un residuo cercano, Phe341. Dado que las poses producidas para este caso no mostró enlaces con los residuos del sitio de unión, se realizó el experimento con un tamaño (30x30x30Å) y centro de grilla en Leu99. Obteniéndose un puntaje de docking de -4.497 kcal/mol, no se produjeron enlaces con los residuos del bolsillo propuesto, pero el compuesto se posó y estableció enlace de hidrógeno con Gly278 y puente salino con Asp87.

---

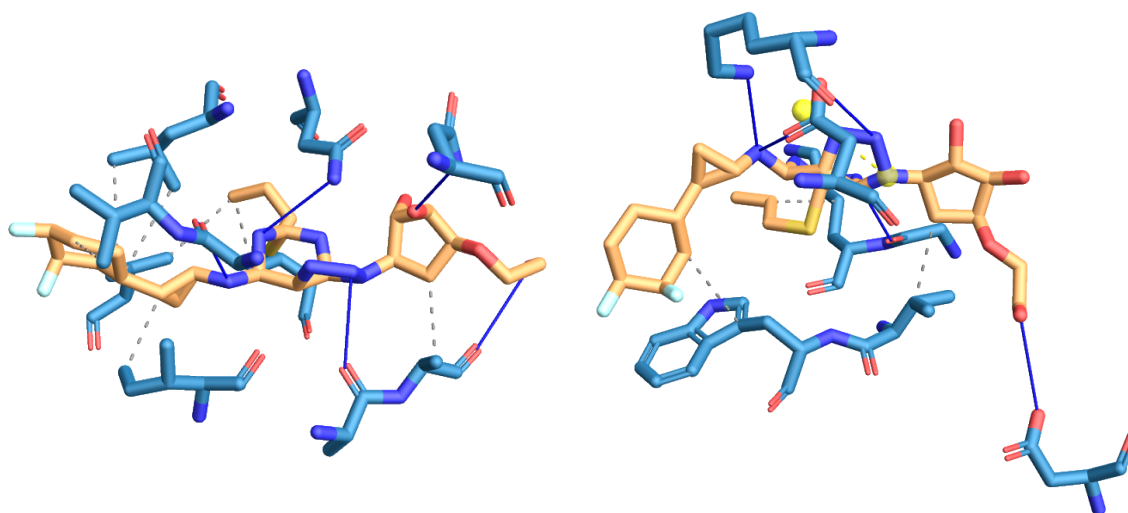
## Complejo sitio de unión 2- ticagrelor

---

EAAT3

SERT

---



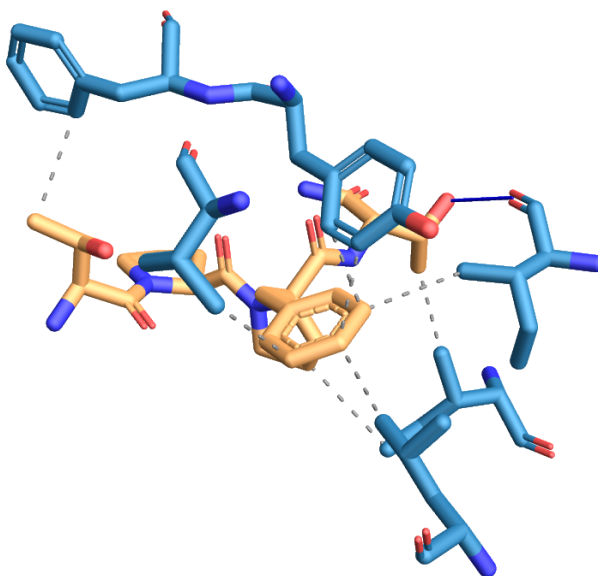
**Figura 25. Visualización del complejo proteína-ligando** asociado al sitio de unión 2 identificado en EAAT3 y SERT. En amarillo el ligando ticagrelor, las líneas azules representan los enlaces de hidrogeno y las líneas discontinuas en amarillo representan el puente salino. Imágenes obtenidas desde PLIP.

En el sitio de unión 3, el compuesto NRX-1074 constituyó con EAAT3, enlace de hidrógeno con el residuo Thr402B y un puntaje de *docking* de -4.613 Kcal/mol, sin embargo, con un puntaje de *docking* inferior (-3.415 Kcal/mol) se mostraron enlaces del tipo *pi-stacking* con el anillo de Tyr98B junto a enlace de hidrógeno con Ile365B (figura 26). Para el mismo sitio de unión 3 en SERT, el mejor puntaje de *docking* (-7.882 Kcal/mol) sin embargo, en esta pose no se apreció enlace con los residuos del sitio de unión identificado.



EAAT3

---

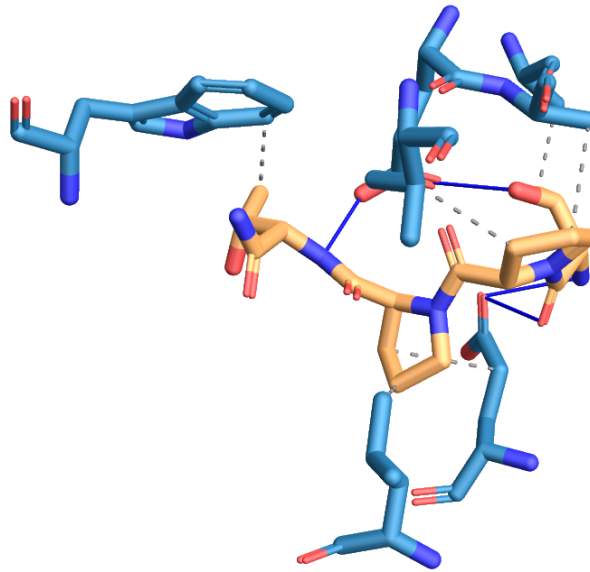


**Figura 26. Visualización del complejo proteína-ligando** asociado al sitio de unión 3 identificado en EAAT3. En amarillo el ligando NRX-1074, las líneas discontinuas en gris representan interacciones hidrofobicas. Imágenes obtenidas desde PLIP.

Finalmente, el compuesto Rapastinel en el sitio de unión 4 con SERT (figura 27) estableció enlace de hidrógeno con Glu508 y con Glu136, este último no formando parte del sitio de unión 4 y con un puntaje de acoplamiento de -6.519 kcal/mol. En el sitio de unión correspondiente a EAAT3 se repitió 4 veces el experimento bajo diferentes tamaños de grilla y centros pero en definitiva el compuesto no se poso ni estableció enlaces en el sitio de unión propuesto.

SERT

---



---

**Figura 27. Visualización del complejo proteína-ligando** asociado al sitio de unión 4 identificado en SERT. En amarillo el ligando Rapastinel, las líneas azules representan los enlaces de hidrogeno y las líneas discontinuas en gris representan interacciones hidrofobicas. Imágenes obtenidas desde *PLIP*.

En general, la mayoría de las puntuaciones de acoplamiento son valores predichos de la energía libre de unión de proteína-ligando, esta afinidad expresada como una razón de unidades de kcal/mol, no son predictores de afinidad precisos (Kireev, 2017). Sin embargo, se debe tener presente que la función de puntuación en un programa de acoplamiento es encontrar la pose o el modo de unión correcto de un ligando y no para predecir afinidad, independiente de lo que señalen los desarrolladores de los software de acoplamiento, se deben realizar validaciones con antelación sobre el blanco con los ligandos en estudio, es decir, si se tiene la estructura blanco con ligandos co-cristalizados volver a realizar simulaciones de acoplamiento molecular y realizar comparaciones (Boland, 2014).

## Conclusión

A nivel topológico, estructural y de secuencia SERT y EAAT3 son diferentes. De hecho, a nivel de secuencia su similitud a nivel global corresponde 17,8% y a nivel local con 41,8% (ver anexo: figura 28). Sin embargo, a pesar de estas diferencias la metodología utilizada permitió determinar 4 posibles sitios de unión común y con afinidad a droga, entre ambas estructuras. Las simulaciones de acoplamiento o docking molecular indican que Travoprost interactúa en ambos sitios de unión y en los mismos residuos tanto en SERT como en EAAT3. En el caso de SERT, Asp98 forma parte del sitio putativo central del transportador y Arg104 es parte del sitio alostérico, sin embargo en EAAT3 no se aprecia en la literatura que los residuos de Asp140 y Arg147 formen parte de algún sitio de unión a ligando conocido, aún así, se señala que particularmente el transportador EAAT3 tiene algunas condiciones asociados a su funcionamiento. La unión de iones  $\text{Na}^+$  a los sitios Na1 y Na3 es un requisito previo para la unión de sustrato y  $\text{Na}^+$  en el sitio Na2 y conduce a movimientos de dos residuos críticos, en donde es necesario romper la interacción entre Glu374 y Arg447 para que este último residuo esté disponible para coordinar el sustrato (Qiu et al., 2021). En vista de los resultados propuestos es posible aceptar la hipótesis planteada, sin embargo mayores análisis computacionales y experimentales son necesarios para evaluar el impacto de estas estimaciones. En particular, es necesario validar los resultados del acoplamiento a través de otros enfoques de precisión superior como lo son *MM/GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area)* para calcular afinidades de unión del ligando, este método realiza una re-puntuación de la energía libre de unión basado en el campo de fuerza (Zhang et al., 2017). También es necesario caracterizar el mecanismo de acción del Travoprost sobre ambas proteínas, por ello se deberían realizar simulaciones de dinámica molecular dirigida que permitan evidenciar la actividad de ambos transportadores, con la finalidad de determinar y analizar las interacciones que se generan a través del tiempo.

El proceso de descubrir un fármaco o droga, es un proceso lento, económicamente costoso y arriesgado, de hecho, algunos autores señalan costos por sobre los 1000 millones de dólares por molécula (Bernardo, 2015). Normalmente transcurren entre 10 a 17 años desde la investigación inicial, los ensayos clínicos hasta el lanzamiento en el mercado con importantes probabilidades de fracaso (Xue et al., 2018). En cada uno de los pasos existe un riesgo importante de que el compuesto no cumpla con los requisitos necesarios para seguir adelante con su desarrollo, en tal caso es

posible que se pierda el trabajo y la inversión. Es en ese sentido, que las dificultades existentes en el I+D de la industria farmacéutica establecen esta oportunidad o necesidad de aplicar nuevas estrategias, una de ellas, por ejemplo corresponde a el reposicionamiento de fármacos que básicamente consiste en desarrollar fármacos basado en la identificación y el desarrollo de nuevas aplicaciones para drogas existentes y aprobadas (Padhy & Gupta, 2011). Estas drogas pueden estar en el mercado, o bien, haber sido descartadas debido a fallos en las últimas fases de los ensayos clínicos, lo cual, evidentemente trae consigo ahorro en tiempo y dinero para la industria. Otra posibilidad, es la estrategia de diseño de compuestos multiblanco o multiobjetivo basada en una cavidad o receptor desarrollada en la presente investigación que aprovecha las similitudes estructurales entre proteínas que son blanco de una misma enfermedad. Algunos podrían ser patrones 3D compartidos que aparezcan por casualidad, sin embargo, otros podrían representar un evento clave en la evolución convergente estructural de las proteínas implicadas, corresponder a sitios de unión secundarios y que según Szilágyi y colegas dentro del contexto del diseño racional de fármacos muestran menores efectos secundarios y toxicidad.

## Referencias

1. Baronina, A., Pike, A.C.W., Han, S., Carpenter, E.P. *Structure of human excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3)*. Manuscript submitted for publication.
2. Boland, Sandro. (2014). Re: Can someone help me with the interpretation of results obtained by docking study (SwissDock)?. Retrieved from: [https://www.researchgate.net/post/Can\\_someone\\_help\\_me\\_with\\_the\\_interpretation\\_of\\_results\\_obtained\\_by\\_docking\\_study\\_SwissDock/548ea5edd3df3e7d668b467f/citation/download](https://www.researchgate.net/post/Can_someone_help_me_with_the_interpretation_of_results_obtained_by_docking_study_SwissDock/548ea5edd3df3e7d668b467f/citation/download).
3. Brandl EJ, Müller DJ, Richter MA. Pharmacogenetics of obsessive-compulsive disorders. *Pharmacogenomics*. 2012;13(1):71-81. doi:10.2217/pgs.11.133
4. Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell Jr, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., ... & Karplus, M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545-1614.
5. Caballero, J. (2020). The latest automated docking technologies for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 1-21.
6. Chamberlain, S. R., Menzies, L., Hampshire, A., Suckling, J., Fineberg, N. A., del Campo, N., ... & Robbins, T. W. (2008). Orbitofrontal dysfunction in patients with obsessive-compulsive disorder and their unaffected relatives. *Science*, 321(5887), 421-422.
7. Coleman, J. A., Green, E. M., & Gouaux, E. (2016). X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature*, 532(7599), 334-339.
8. Coleman, J. A., & Gouaux, E. (2018). Structural basis for recognition of diverse antidepressants by the human serotonin transporter. *Nature structural & molecular biology*, 25(2), 170-175.
9. Douguet, D. (2010). *e-LEA3D: a computational-aided drug design web server*. *Nucleic Acids Research*, 38 (Web Server), W615–W621. doi:10.1093/nar/gkq32.
10. Douguet, D.; Munier-Lehmann, H.; Labesse, G.; Pochet, S., LEA3D: A Computer-Aided Ligand Design for Structure-Based Drug Design. *J Med Chem* 2005, 48, (7), 2457-2468.
11. Evans, D. W., Lewis, M. D., & Lobst, E. (2004). The role of the orbitofrontal cortex in normally developing compulsive-like behaviors and obsessive-compulsive disorder. *Brain and cognition*, 55(1), 220-234.
12. Goodman, W. K., Grice, D. E., Lapidus, K. A., & Coffey, B. J. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric Clinics*, 37(3), 257-267.
13. Heinzelmann, G., & Kuyucak, S. (2014). Molecular dynamics simulations of the mammalian glutamate transporter EAAT3. *PLoS One*, 9(3).
14. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33-28. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
15. Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>
16. Kireev, Dmitri. (2017). Re: Is docking score proper way to measure affinity?. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/post/Is-docking-score-proper-way-to-measure-affinity/58e3b4d796b7e420a62788d9/citation/download>.
17. Korb O, Stützle T, Exner TE. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J Chem Inf Model*. 2009;49(1):84-96. doi:10.1021/ci800298z

18. Krebs, G., & Heyman, I. (2015). Obsessive-compulsive disorder in children and adolescents. *Archives of disease in childhood*, 100(5), 495-499.
19. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D370-376. doi:10.1093/nar/gkr703
20. Marinova, Z., Chuang, D. M., & Fineberg, N. (2017). Glutamate-modulating drugs as a potential therapeutic strategy in obsessive-compulsive disorder. *Current neuropharmacology*, 15(7), 977-995.
21. Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
22. Mataix-Cols, D., Boman, M., Monzani, B., Rück, C., Serlachius, E., Långström, N., & Lichtenstein, P. (2013). Population-based, multigenerational family clustering study of obsessive-compulsive disorder. *JAMA psychiatry*, 70(7), 709-717.
23. Mavrogiorgou, P., Enzi, B., Steinmann, S., Mulert, C., & Juckel, G. (2018). Relationship Between Neuroanatomical and Serotonergic Hypotheses of Obsessive-Compulsive Disorder: A Combined Functional Magnetic Resonance Imaging-Evoked Potential Study. *The Journal of clinical psychiatry*, 79(6).
24. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.
25. Morgat A, Lombardot T, Coudert E, Axelsen K, Neto TB, Gehant S, Bansal P, Bolleman J, Gasteiger E, de Castro E, Baratin D, Pozzato M, Xenarios I, Poux S, Redaschi N, Bridge A, UniProt Consortium. Enzyme annotation in UniProtKB using Rhea Bioinformatics 36(6):1896-1901 (2019)
26. Murphy, D. L., Lerner, A., Rudnick, G., & Lesch, K. P. (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular interventions*, 4(2), 109.
27. Núñez-Vivanco, G., Fierro, A., Moya, P., Iturriaga-Vásquez, P., & Reyes-Parada, M. (2018). 3D similarities between the binding sites of monoaminergic target proteins. *PloS one*, 13(7), e0200637.
28. Núñez-Vivanco, G., Valdés-Jiménez, A., Besoain, F., & Reyes-Parada, M. (2016). Geomfinder: a multi-feature identifier of similar three-dimensional protein patterns: a ligand-independent approach. *Journal of cheminformatics*, 8(1), 19.
29. Padhy, B. M., & Gupta, Y. K. (2011). Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *Journal of postgraduate medicine*, 57(2), 153.
30. Pauls, D. L., Abramovitch, A., Rauch, S. L., & Geller, D. A. (2014). Obsessive-compulsive disorder: an integrative genetic and neurobiological perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(6), 410-424.
31. Pena-Garijo, J., Ruipérez Rodríguez, M. Á., & Barrós Loscertales, A. R. (2010). Neurobiología del trastorno obsesivo-compulsivo: aportaciones desde la resonancia magnética funcional (I).
32. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1781-1802.
33. Pittenger, C. (2015). Glutamatergic agents for OCD and related disorders. *Current treatment options in psychiatry*, 2(3), 271-283.
34. Pittenger, C., Bloch, M. H., & Williams, K. (2011). Glutamate abnormalities in obsessive compulsive disorder: neurobiology, pathophysiology, and

- treatment. *Pharmacology & therapeutics*, 132(3), 314-332.
35. Proschak, E., Stark, H., & Merk, D. (2018). Polypharmacology by design: a medicinal chemist's perspective on multitargeting compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 62(2), 420-444.
  36. Qiu, B., Matthies, D., Fortea, E., Yu, Z., & Boudker, O. (2021). Cryo-EM structures of excitatory amino acid transporter 3 visualize coupled substrate, sodium, and proton binding and transport. *Science Advances*, 7(10), eabf5814.
  37. Ravikumar, B., & Aittokallio, T. (2018). Improving the efficacy-safety balance of polypharmacology in multi-target drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 13(2), 179-192.
  38. Reddy, A. S., & Zhang, S. (2013). Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert review of clinical pharmacology*, 6(1), 41-47.
  39. Roberts, E., Eargle, J., Wright, D., & Luthey-Schulten, Z. (2006). MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC bioinformatics*, 7(1), 1-11.
  40. Rodenas, M. T. T. P., & Carrascosa, A. M. Alicia Gómez Peinado, Paloma Cano Ruiz, Marta Lucas Pérez-Romero, Patricia Romero. (Abril de 2018) EL TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO (TOC) EN LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA. Interpsiquis. *XIX Congreso Virtual Internacional de Psiquiatría*. Congreso llevado a cabo en España.
  41. Russell, R. B., & Barton, G. J. (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 14(2), 309-323.
  42. Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic acids research*, 43(W1), W443-W447.
  43. Sanz Amador, M. (2003). *Alteraciones neuropsicológicas en el trastorno obsesivo-compulsivo: estudio con electroencefalografía cuantitativa*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
  44. Shatsky M, Shulman-Peleg A, Nussinov R, Wolfson HJ. The multiple common point set problem and its application to molecule binding pattern detection. *J Comput Biol*. 2006;13(2):407-428. doi:10.1089/cmb.2006.13.407
  45. Sheshachala, K., & Narayanaswamy, J. C. (2019). Glutamatergic augmentation strategies in obsessive–compulsive disorder. *Indian journal of psychiatry*, 61(Suppl 1), S58.
  46. Schrödinger Release 2020-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
  47. Shulman-Peleg A, Shatsky M, Nussinov R, Wolfson HJ. MultiBind and MAPPIS: web servers for multiple alignment of protein 3D-binding sites and their interactions. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W260-W264. doi:10.1093/nar/gkn185
  48. Simonovsky, M., & Meyers, J. (2020). DeeplyTough: Learning Structural Comparison of Protein Binding Sites. *Journal of chemical information and modeling*, 60(4), 2356-2366.
  49. Sinopoli, V. M., Burton, C. L., Kronenberg, S., & Arnold, P. D. (2017). A review of the role of serotonin system genes in obsessive-compulsive disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 372-381.
  50. Sterling and Irwin, J. Chem. Inf. Model, 2015 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00559>
  51. Szilágyi, A., Nussinov, R., & Csermely, P. (2013). Allo-network drugs:

- extension of the allosteric drug concept to protein-protein interaction and signaling networks. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(1), 64-77.
52. The Protein Data Bank H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) *Nucleic Acids Research*, **28**: 235-242. doi:[10.1093/nar/28.1.235](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235)
  53. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.
  54. Veale, D., & Roberts, A. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *Bmj*, 348, g2183.
  55. Watts, S. D., Torres-Salazar, D., Divito, C. B., & Amara, S. G. (2014). Cysteine transport through excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *PLoS One*, 9(10).
  56. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037.
  57. Xue, H., Li, J., Xie, H., & Wang, Y. (2018). Review of drug repositioning approaches and resources. *International journal of biological sciences*, 14(10), 1232.
  58. Yeturu, Kalidas, and Nagasuma Chandra. "PocketAlign a novel algorithm for aligning binding sites in protein structures." *Journal of chemical information and modeling* 51.7 (2011): 1725-1736.
  59. Zhang, X., Perez-Sanchez, H., & C Lightstone, F. (2017). A comprehensive docking and MM/GBSA rescoring study of ligand recognition upon binding antithrombin. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(14), 1631-1639.
  60. Zheng, X., Gan, L., Wang, E., & Wang, J. (2013). Pocket-based drug design: exploring pocket space. *The AAPS journal*, 15(1), 228-241.
  61. Zitterl, W., Stompe, T., Aigner, M., Zitterl-Eglseer, K., Ritter, K., Zettinig, G., ... & Thau, K. (2009). Diencephalic serotonin transporter availability predicts both transporter occupancy and treatment response to sertraline in obsessive-compulsive checkers. *Biological psychiatry*, 66(12), 1115-1122.



# Anexos

## Resultados de alineamiento de secuencia

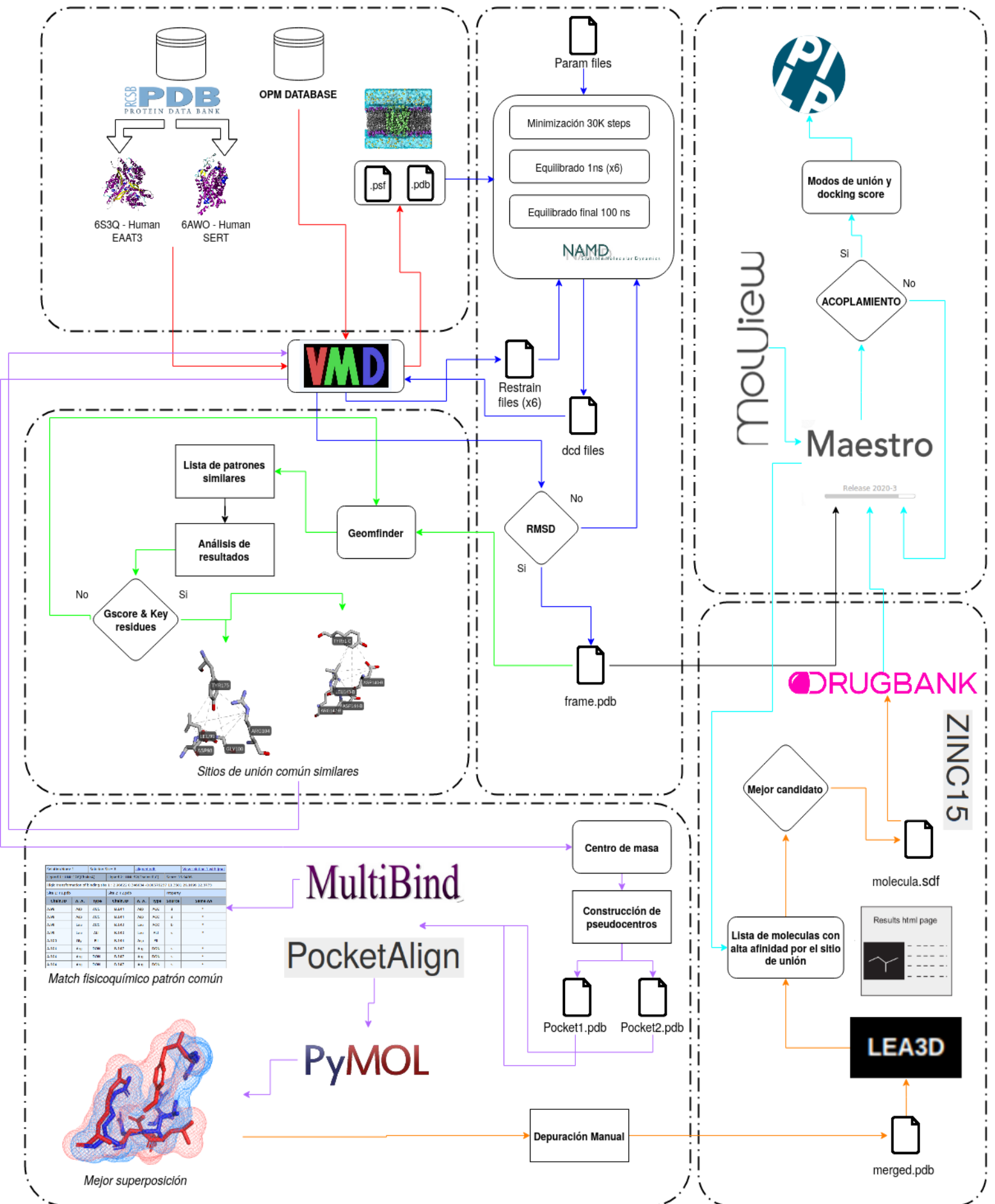
Alineamiento Global ( <i>Needle</i> )	Alineamiento Local ( <i>Water</i> )
<pre> #===== # # Aligned sequences: 2 # 1: EMBOSS_001 # 2: EMBOSS_002 # Matrix: EBL0SUM62 # Gap_penalty: 10.0 # Extend_penalty: 0.5 # # Length: 764 # Identity:      64/764 ( 8.4%) # Similarity:   136/764 (17.8%) # Gaps:         492/764 (64.4%) # Score: 38.0 # #===== </pre>	<pre> ##### #----- # # Aligned sequences: 2 # 1: EMBOSS_001 # 2: EMBOSS_002 # Matrix: EBL0SUM62 # Gap_penalty: 10.0 # Extend_penalty: 0.5 # # Length: 141 # Identity:     27/141 (19.1%) # Similarity:   59/141 (41.8%) # Gaps:         38/141 (27.0%) # Score: 56.0 # #----- </pre>

**Figura 28.** Datos obtenidos a partir de la realización de alineamiento global (Emboss Needle) y local (Emboss Water) para las estructuras de 6AWO(SERT) y 6S3Q(EAAT3)

## Resumen de los residuos claves

Sitio / proteína	6AWO	6S3Q
Sitio de unión central	Tyr95 Ala96 Asp98 Leu99 Gly100 Asn101 Tyr176 Trp182 Phe335 Ser336 Phe341 Val343 Ser438 Ala441 Gly442	Ser332 Ser333 Thr370 Glu374 Val411 Pro412 Gln413 Ala414 Gly415 Asp444 Arg445 Arg447 Thr448 Asn451
Sitio alostérico	Trp103 Arg104 Tyr175 Ile179 Asp328 Ala331 Gln332 Pro403 Phe407 Glu494 Phe556	NA
Sitio de unión a Na <sup>+</sup> 1	Ala96 Asn101 Ser214 Ser336 Asn368	Ser333 Gly362 Asn366 Asn451 Asp455
Sitio de unión a Na <sup>+</sup> 2	Gly94 Val97 Leu434 Asp437 Ser438	Ser405 Ile406 Ala408 Thr364 Met367 Ser405 Ile406 Ala408
Sitio de unión a Na <sup>+</sup> 3	NA	Asn366 Asp368 Tyr98 Thr101 Thr102
Sitio de unión a Cl <sup>-</sup>	Tyr121 Gln332 Ser336 Ser372	NA
Sitio de unión 1 a K <sup>+</sup>	NA	Gly362 Ile365 Asn366 Asp455
Sitio de unión 2 a K <sup>+</sup>	NA	Thr370 Glu374
Sitio de unión 3 a K <sup>+</sup>	NA	Ser331 Asp444 Thr448
cavidad hidrofóbica	Leu443 Ser439 Ala169 Ala173	NA

**Figura 29.** Tabla resumen de los residuos que forman parte de los sitios de unión para las estructuras de SERT y EAAT3. Información depurada a partir de literatura científica, base de datos CDD y UniProt.



**Figura 30.** El esquema inicia con la descarga de las estructuras de los cristales de 6s3q y 6awo desde PDB y finaliza con la visualización de las interacciones de acoplamiento molecular con PLIP