



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA DE INGENIERIA CIVIL EN BIOINFORMATICA**

**Reposicionamiento de fármacos para el
Tratamiento del Trastorno Obsesivo
Compulsivo (TOC)**

Christofer Leonardo Núñez Rojas

Profesor Tutor: Gabriel Núñez Vivanco
Profesor Informante: Horacio Poblete Vilches

Talca-Chile
28 de Diciembre, 2019

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

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	II
Índice de cuadros	III
Resumen	IV
Abstract	V
1. Marco teórico	1
1.1. Trastorno Obsesivo-Compulsivo	1
1.1.1. Sintomatología	2
1.1.2. Tratamientos farmacológicos	2
1.1.3. Causas	3
1.2. Los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT)	5
1.2.1. EAAT3	7
1.2.2. Glutamato y Cisteína	7
1.2.3. Modulación Sináptica	8
1.2.4. EAAT y su relación con el TOC	9
1.3. Modelo de inhibición	10
1.4. Reposicionamiento de Fármaco	10
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	13
4. Metodología	14
4.1. Obtención de la estructura 3D de la proteína EAAT3	14
4.1.1. Identificación de proteína homóloga	14
4.1.2. Modelamiento por Homología	15
4.1.3. Minimización	15
4.2. Simulación de acoplamiento molecular	16
4.2.1. Identificar posibles sitios de unión en EAAT3 que puedan estar siendo afectados por el residuo R447.	16
4.2.2. Simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando	17
4.2.3. Mutación in silico de EAAT3 del residuo R447 y simulación de acoplamiento molecular	18
4.2.4. Reevaluación del acoplamiento molecular con PLIP	18
4.3. Virtual Screening con inteligencia artificial CNN	19
5. Resultados y discusión	21
5.1. Estructura tridimensional	21
5.2. Minimización	24
5.3. Sitios de Unión	25
5.4. Mutación y Docking Molecular	26
5.5. Reevaluación Docking con PLIP	27
5.6. Virtual Screening con CNN	28
6. Conclusión	32
Referencias	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Topología EAAT	5
Figura 1.2: Diagrama de transporte	6
Figura 1.3: Modulación Sináptica del Glutamato.	8
Figura 4.1: La ilustración del procedimiento metaPocket 2.0.	17
Figura 4.2: Resumen de CNN entrenada.	20
Figura 5.1: Secuencia aminoacídica de EAAT3	21
Figura 5.2: BLASTp de la secuencia aminoacídica de EAAT3.	21
Figura 5.3: Estructura cristalográfica de 5LLM.	22
Figura 5.4: Gráfico de puntaje DOPE de loops refinados.	22
Figura 5.5: Trímero de EAAT3	23
Figura 5.6: Sistema de EAAT3 luego de Minimización.	24
Figura 5.7: Resultados ProSA-web	24
Figura 5.8: Gráfico de Ramachandran del monómero de EAAT3.	25
Figura 5.9: Pocket con el residuo R447.	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1: Criterios del DSM-5 para el TOC	2
Cuadro 1.2: Nomenclatura de la familia EAAT	5
Cuadro 1.3: Localización EAAT.	6
Cuadro 1.4: Reposicionamiento de fármacos.	11
Cuadro 5.1: Docking Wildtype vs Mutada.	27
Cuadro 5.2: Análisis PLIP EAAT3 Wildtype y Mutado.	28
Cuadro 5.3: Energía UCPH-101 vs nuevo fármaco.	29
Cuadro 5.4: Galantamina vs Fluticasona furoato.	30
Cuadro 5.5: Interacciones del complejo galantamina-EAAT3	30

RESUMEN

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es una condición neuropsiquiátrica cada vez más común del cual se desconoce su etiología, aunque la evidencia científica sugiere que el TOC es de origen neuroquímico. Actualmente, los inhibidores de recaptación de serotonina (IRS) es el tratamiento más utilizado, sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes con TOC exhiben una respuesta inadecuada a estos inhibidores (IRS), y la anomalía funcional del sistema de serotonina no siempre se observa en pacientes con TOC. Recientemente, estudios en ratas han observado que niveles elevados de glutamato en el líquido cefalorraquídeo no solo genera neurotoxicidad, sino que también se ha vinculado con la presencia de TOC. Las proteínas capaces de modular estas concentraciones de glutamato son las EAAT, en particular la proteína EAAT3. La presente investigación se centra en una variante genética de la proteína EAAT3, cuya mutación puntual en el residuo 447 (arginina) evidenció un cambio funcional en el transporte de glutamato. Dada la necesidad de regular la actividad de este transportador, es que en este trabajo se modeló homológicamente la estructura de EAAT3, se identificaron posibles sitios de unión capaces de inhibir a EAAT3, se realizó simulación de acoplamiento molecular con los neurotransmisores (Asp, Glu y Cis), y además se realizó un virtual screening mediante redes neuronales convolucionales (CNN). Las primeras observaciones ocurrieron con la herramienta FPOCKET donde se encontraron 34 posibles sitios de unión del cual solo uno estaba asociado el residuo 447, luego con ayuda de inteligencia artificial se realizó virtual screening de fármacos ya aprobados por la FDA (Reposicionamiento de fármacos) y comparando con la droga UCPH-101 (inhibidor de EAAT1) los mejores puntajes estuvieron entre Galantamina y Fluticasona furoato. Al aplicar un docking molecular a estas moléculas dando como resultado a Galantamina como droga inhibitoria alostérica para la proteína de EAAT3. De este modo, se obtiene una potencial herramienta farmacológica de utilidad para entender los mecanismos que subyacen al TOC, y posiblemente una línea que conduzca a mejores tratamientos de los ya conocidos.

ABSTRACT

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is an increasingly common neuropsychiatric condition whose etiology is unknown, although scientific evidence suggests that OCD is neurochemical in origin. Currently, serotonin reuptake inhibitors (SRIs) are the most widely used treatment, however, approximately 50% of OCD patients exhibit an inadequate response to these inhibitors (SRIs), and functional abnormality of the serotonin system is not always observed in OCD patients. Recently, studies in rats have observed that elevated levels of glutamate in cerebrospinal fluid not only generate neurotoxicity but have also been linked to the presence of OCD. The proteins capable of modulating these glutamate concentrations are the EAATs, in particular the EAAT3 protein. The present investigation focuses on a genetic variant of the EAAT3 protein, whose point mutation at residue 447 (arginine) evidenced a functional change in glutamate transport. Given the need to regulate the activity of this transporter, we homologically modeled the structure of EAAT3, identified possible binding sites capable of inhibiting EAAT3, simulated molecular coupling with neurotransmitters (Asp, Glu and Cis), and performed a virtual screening using convolutional neural networks (CNN). The first observations were made with the FPOCKET tool, where 34 possible binding sites were found, of which only one was associated with residue 447. Then, with the help of artificial intelligence, virtual screening of drugs already approved by the FDA (drug repositioning) was performed and comparing with the drug UCPH-101 (EAAT1 inhibitor) the best scores were between Galantamine and Fluticasone furoate. Applying molecular docking to these molecules resulted in Galantamine as an allosteric inhibitory drug for EAAT3 protein. Thus, a potentially useful pharmacological tool is obtained to understand the mechanisms underlying OCD, and possibly a line leading to better treatments than those already known.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Trastorno Obsesivo-Compulsivo

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es una condición neuropsiquiátrica común y compleja, tan común que se ha situado como el cuarto desorden mental con más ocurrencia después de la depresión, abuso de alcohol y fobia social (Veale y cols., 2014). Este trastorno se caracteriza por la presencia de obsesiones y/o compulsiones, donde a menudo son acompañados por comportamientos de evitación social que son suficientemente severos para causar sufrimiento o interferir con la rutina. Se estima que este trastorno tiene una prevalencia del 2-3% en la población general (Kessler y cols., 2005), sin diferencias en la distribución por sexo, con la excepción de que en la niñez el trastorno es más común en niños que en niñas (Wu y cols., 2016).

El TOC es un trastorno perteneciente al grupo de los trastornos de ansiedad caracterizado por:

- Obsesiones: son ideas, pensamientos, imágenes o impulsos recurrentes y persistentes que no son experimentados ni producidos voluntariamente, sino más bien como pensamientos que invaden la conciencia y que son catalogados como repugnantes o sin sentido.
- Compulsiones: son conductas repetitivas que se realizan según determinadas reglas de forma estereotipada. El acto se realiza con una sensación de compulsión subjetiva junto con un deseo de resistir a la compulsión, por lo menos inicialmente.

El inicio suele ser gradual y, si no se trata, el curso es principalmente crónico, con síntomas que cambian con el tiempo, a menudo en respuesta a factores estresantes de la vida (Mataix-Cols y cols., 2002). Por lo general, se presenta en la adolescencia tardía o en la edad adulta temprana, aunque el inicio en la infancia o la edad adulta tardía también puede ocurrir (Heyman y cols., 2001). La presentación clínica del trastorno en niños y adultos es generalmente similar.

1.1.1. Sintomatología

La sintomatología del TOC se traduce en actitudes concretas, aunque puede variar ciertos matices según el paciente. Los criterios propuestos en el DSM-5 se muestran en la Tabla 1 (DSM-5, 2013).

Los criterios del DSM-5 propuestos para el trastorno obsesivo-compulsivo
Las obsesiones se definen por:
1. Pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que son intrusivos e inapropiados y que causan ansiedad o angustia marcadas
2. Pensamientos, impulsos o imágenes que no son simplemente preocupaciones excesivas sobre problemas de la vida real.
3. Ignorar o suprimir tales pensamientos, impulsos o imágenes, o neutralizarlos con algún otro pensamiento o acción
4. Reconocimiento de que los pensamientos, impulsos o imágenes obsesivos son un producto de su propia mente en lugar de imponerse desde fuera.
Las compulsiones se definen por:
1. Comportamientos repetitivos o actos mentales que la persona se siente obligada a realizar en respuesta a una obsesión, o de acuerdo con reglas que deben aplicarse de manera rígida
2. Es evidente que los comportamientos excesivos o los actos mentales tienen como objetivo prevenir o reducir la angustia o prevenir algún evento o situación temida

Cuadro 1.1: Criterios del DSM-5 para el TOC

A pesar de la carga de este trastorno, a menudo no se reconoce en entornos primarios y psiquiátricos (Leon y cols., 1995) en parte porque sus síntomas a menudo se manifiestan internamente en lugar de externamente y los pacientes pueden ser reacios a revelar pensamientos o comportamientos que perciben como vergonzosos.

1.1.2. Tratamientos farmacológicos

Históricamente se ha tratado el TOC en base a los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS), el primer fármaco que tuvo efectividad en pacientes con TOC fue clomipramina (antidepresivo tricíclico; Insel y cols., 1983) (antidepresivo tricíclico), el que mostró efectividad tanto en adultos como en niños. Aplicado por primera vez en pacientes con TOC a principios de los años 1980, funcionó pero presentó una serie de problemas asociados a sus efectos secundarios, lo que limitó ubicar este fármaco como agente de primera línea.

Desde entonces, más de 20 estudios cegados, controlados con placebo, han establecido firmemente la eficacia de la monoterapia con ISRS en el TOC (Soomro, 2012). Debido a la combinación de eficacia probada y un perfil de efectos secundarios típicamente benigno,

los ISRS son la primera opción farmacológica para el tratamiento del TOC (Koran y cols., 2007).

Dentro de los ISRS los más usados y actuales son:

- Fluoxetina
- Fluvoxamina
- Sertralina

Actualmente no existe evidencia de beneficio diferencial entre los ISRS (Soomro y cols., 2008), por lo que la elección del agente se realiza mejor en función de los efectos secundarios, las interacciones farmacológicas, la preferencia del paciente y consideraciones similares. El problema que radica en estos fármacos, además de los efectos secundarios que estos posean, es que sólo el 50-60% de los pacientes responden adecuadamente a los actuales tratamientos en base a ISRS (Soomro y cols., 2008) y la mayoría de los pacientes aun se mantienen con síntomas residuales que siguen teniendo significancia clínica (Dougherty y cols., 2004).

Si bien actualmente existen diversas opciones de tratamientos farmacológicos y conductual de primera línea para el trastorno obsesivo-compulsivo en adultos, a menudo se pasa por alto en los entornos de atención primaria y con frecuencia se trata poco. El desarrollo de un nuevo y más efectivo tratamiento representa una necesidad clínica urgente debido al impacto que este trastorno posee (Pittenger, 2015).

1.1.3. Causas

Si bien el TOC aún sigue teniendo una etiología desconocida, es probable que exista una predisposición genética. Esta suposición está sostenida en base a estudios de enlace de gemelos (van Grootheest y cols., 2005) y de genoma completo (Walitza y cols., 2010), además otros estudios en donde se abarcó como un trastorno multifactorial tanto genético como ambiental se pudo evidenciar que los genes contribuyen sobre el 54% a padecer de TOC (Tambis y cols., 2009). Esta evidencia indica que los factores genéticos juegan un rol importante en el desarrollo del TOC (Pauls, 2010). A pesar de los numerosos estudios realizados, no se ha podido establecer una causa única responsable de la enfermedad, aun así existen factores de riesgos que se asocian a este trastorno:

1. **Factores Genéticos:** estudios realizados en gemelos han revelado que el TOC aparece en una proporción significativamente mayor (casi el doble) en los gemelos monocigóticos. Los genes implicados en el trastorno no son conocidos aunque se ha encontrado relación con los cromosomas 6, 8, 9 y 20, así como el brazo largo del cromosoma 22.

2. **Factores Natales y Prenatales:** Madre con edad mayor a 39 años, anemia, abortos previos, parto prolongado, nacimientos múltiples, calcificación de la placenta, problemas respiratorios del neonato, bebé muy sensible o irritable, elevado nivel de Cortisol (Hormona del estrés).
3. **Factores biológicos:** En estudios de imagen con marcadores cerebrales se ha visto una posible anomalía en el lóbulo frontal y en los ganglios cerebrales basales. Algunos estudios recientes han observado un aumento de sustancia gris en los núcleos lenticulares. Este hecho contrasta con lo observado en pacientes con trastornos de ansiedad de otra clase, donde lo que hay es una disminución de la sustancia gris en dichos núcleos cerebrales.
4. **Factores ambientales y educativos:** Suele ser bastante frecuente que los padres de pacientes con TOC tengan personalidades muy rígidas y controladoras y hayan dado a sus hijos una educación excesivamente recta y severa. Esta actitud de los padres provoca en el hijo una pérdida de confianza y un aumento de la inseguridad y la ansiedad. Si bien existe una predisposición genética y neurológica de ciertas personas, que las hace vulnerables para padecer Esquizofrenia, lo cierto es que esta surge si las condiciones ambientales y sociales brindan el medio adecuado. En esto podemos citar: disfuncionalidad en la relación madre-hijo cuando éste era un neonato o se encontraba en sus primeros meses de nacido, ambiente familiar o laboral altamente estresante el cual genera altas cargas de ansiedades en las personas, vivencia de algún trauma actual que active su vulnerabilidad a la esquizofrenia: muerte de un familiar, emigrar a otro país, etc.
5. **Factores bioquímicos:** Algunos neurotransmisores como la serotonina podrían estar implicados en el origen del TOC. El déficit de serotonina podría implicar un enlentecimiento del trasvase de información interneuronal, hecho comprobado en pacientes con TOC.

Las múltiples líneas de evidencia indican que los ganglios basales están afectados de manera crítica en el TOC. Los estudios de neuroimagen estructural demuestran un volumen en la parte interior del encéfalo (caudado) alterado en el TOC (Radua y cols., 2009; Alonso y cols., 2015), y la imagen funcional ha identificado una hiperactividad en los circuitos corticoestriatos, tanto al inicio como con la provocación de los síntomas (Menzies y cols., 2008). Algunos informes que utilizan espectroscopia de resonancia magnética describen una señal glutamatérgica estriatal elevada en el caudado (Starck y cols., 2008), lo que sugiere un aumento del glutamato intracelular y/o GABA. Esto se sustenta además por los hallazgos descubiertos en 2002 (Hanna y cols., 2015), donde a través de un mapa elaborado por marcadores de microsateélites se determinó que la región cromosómica 9p24 tuvo la puntuación más predominante. Esta vinculación sugere a la región cromosómica 9p24 contiene el gen SLC1A1 además de otros genes el cual codifica el transportador de glutamato neuronal EAAT3 (transportador de aminoácidos excitador 3) (Willour y cols., 2004).

1.2. Los transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT)

La familia de transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) son proteínas que regulan el glutamato (principal neurotransmisor excitador) extracelular. Los cinco subtipos de transportadores en humanos son los productos de los genes SLC1A3, SLC1A2, SLC1A1, SLC1A6 y SLC1A7, correspondientes a las proteínas humanas EAAT1, EAAT 2, EAAT 3, EAAT 4 y EAAT 5, respectivamente (Tabla 2; Bjørn-Yoshimoto y cols., 2016).

Transportadores de aminoácidos excitadores		
Nomenclatura	Gen	Nombre Original
EAAT1	SLC1A3	GLAST (glu-asp transporter, (Storck et al., 1992))
EAAT2	SLC1A2	GLT-1 (glu transporter, (Pines et al., 1992))
EAAT3	SLC1A1	EAAC1 (excitatory amino acid carrier 1, (Kanai and Hediger, 1992))
EAAT4	SLC2A6	EAAT4 (Fairman et al., 1995)
EAAT5	SLC2A7	EAAT5 (Arriza et al., 1997)

Cuadro 1.2: Nomenclatura de la familia EAAT

La estructura de las EAAT se probó bioquímicamente y definió la topografía de 8 a 10 hélices transmembrana (TM) con terminaciones N y C intracelulares (Figura 1.1; Slotboom y cols., 1996). Si bien los EAAT comparten una identidad de aminoácidos de aproximadamente 35–65%, los diferentes subtipos tienen distintos perfiles de expresión celular y de desarrollo distintas (Amara y Fontana, 2002).

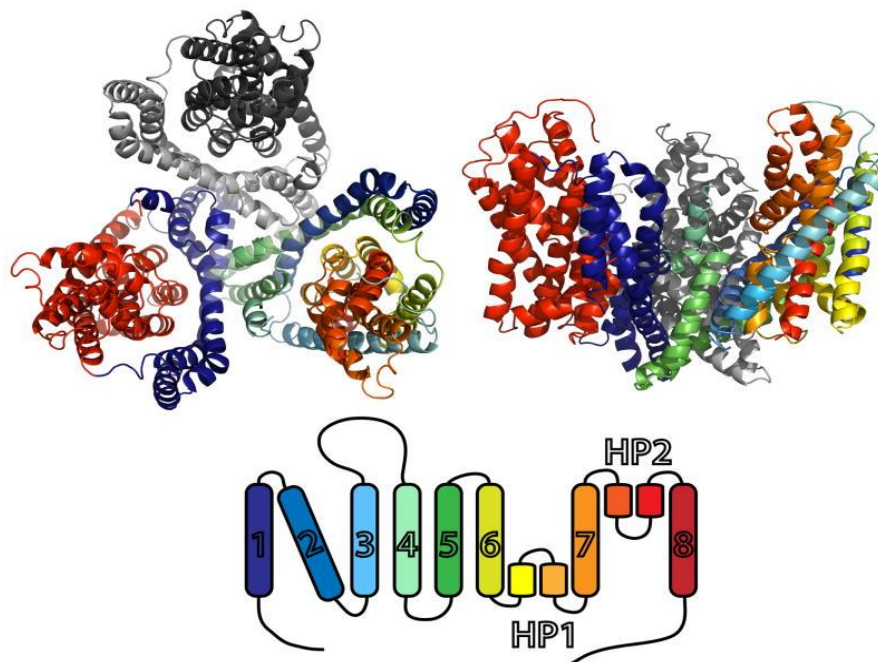


Figura 1.1: Topología EAAT. El transportador se puede dividir aproximadamente en subdominios funcionales, con TM1, -2, -4 y -5 como un dominio de andamiaje relativamente estático, mientras que TM3, -6, -8 y horquilla 1 (HP1) y horquilla 2 (HP2) son parte del dominio de transporte (Bjørn-Yoshimoto y cols., 2016).

Los EAAT son transportadores activos secundarios, que traslocan tres iones de sodio, un protón y un contra-transporte de un ion de potasio para cada sustrato, lo que proporciona la fuerza impulsora energética para transportar glutamato contra su gradiente electroquímico (Reyes y cols., 2009). El transportador funciona mediante un mecanismo llamado "elevador", que transloca el sitio de unión al sustrato del dominio de transporte a través del plano de la membrana plasmática, mientras que el dominio de andamiaje permanece relativamente estático. El movimiento de los bucles flexibles (HP1 y HP2) que conectan los andamios y los dominios de transporte median el movimiento relativo de los dos dominios. Este es el primer tipo de transportador para el que se ha observado este modo de transporte

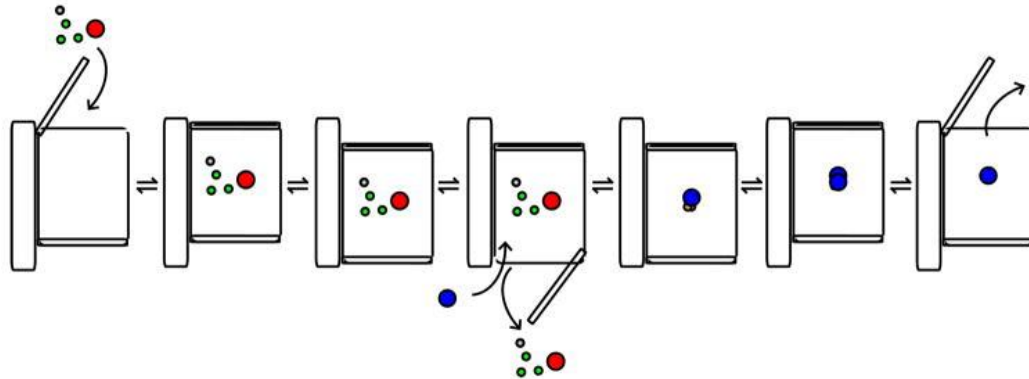


Figura 1.2: Diagrama de transporte. El transportador abre la horquilla (HP2), y el glutamato entra, junto con 3 iones de sodio (verde) y un protón (gris). HP2 se cierra, el dominio de transporte se mueve a través del plano de la membrana, donde HP1 se abre y el glutamato y los iones salen. Un ion potasio (azul) ingresa desde el espacio intracelular, HP1 se cierra y el transportador se reorienta hacia afuera, donde HP2 se abre y sale el potasio, el acto ocurre en milisegundos (Greuer y cols., 2000).

Todos los EAAT participan en el sistema nervioso central (SNC), sin embargo EAAT1 y EAAT2 son los que se encuentran más presentes en el cerebro con cerca del 99% del total (Furuta y cols., 1997; Holmseth y cols., 2012). Estos datos por tanto orientan a descartar el aporte funcional de los otros EAAT, sin embargo existe evidencia de que EAAT3 juega un papel fundamental en el reciclaje de glutamato, siendo el único que posee incidencia en el TOC (Bjørn-Yoshimoto and cols., 2016). Esto se explica por la ubicación y los neurotransmisores que transporta en particular esta proteína.

Caracterización familia EAAT		
Nomenclatura	Expresión	Ubicación
EAAT1	Astrocitos	Células muller de la retina, Glia Bergmann del cerebelo
EAAT2	Astrocitos	Los astrocitos en todo el cerebro
EAAT3	Neuronas	Somas y dendritas.
EAAT4	Neuronas	Células purkinje cerebelares.
EAAT5	Neuronas	Fotorreceptores retinales.

Cuadro 1.3: Localización EAAT.

Se han encontrado cantidades significativas de EAAT3 en compartimentos intracelulares en células de glioma C6, cultivos neuronales y en el cerebro in vivo, lo que sugiere una localización intracelular de hasta 70 a 80%, y además de transportar glutamato es el único que transporta cisteína, estos son puntos cruciales los cuales lo convierten en un principal blanco a analizar.

1.2.1. EAAT3

En el SNC, el EAAT3 se encuentra presente principalmente en las neuronas, con altas densidades en los terminales postsinápticos donde se observa una localización perisináptica (He y cols., 2000).

La expresión de EAAT3 en el cerebro maduro se estima en aproximadamente 100 veces más baja que EAAT2 (Holmseth y cols., 2012), aunque como EAAT3 se encuentra a menudo cerca de las regiones dendríticas, parece razonable pensar que la modulación de la captación de EAAT3 pueda tener mayores efectos en las concentraciones locales de glutamato que en las concentraciones globales (EAAT2), y modular los receptores en la misma neurona donde se encuentra la EAAT3.

La localización intracelular de EAAT3 sugiere que la capacidad de EAAT3 para amortiguar los receptores locales podría cambiar rápidamente en respuesta a ciertos estímulos. Por lo tanto, aunque EAAT2 es responsable de la mayor parte de la captación de glutamato en todo el cerebro, y es poco probable que EAAT3 regule significativamente los niveles de glutamato en el ambiente, no es sorprendente que los cambios en la captación de glutamato mediada por EAAT3 tengan efectos fisiológicamente relevantes a través de receptores.

1.2.2. Glutamato y Cisteína

El EAAT3 es el encargado de transportar tanto el glutamato así es como también es el único encargado de esta familia de proteínas de transportar la cisteína.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro (Meldrum, 2000), en sí mismo también es tóxico en ciertas circunstancias, como apoplejía, lesión cerebral traumática o en ciertos trastornos neurodegenerativos, donde un exceso de glutamato sobreestimula los receptores ionotrópicos de glutamato, lo que lleva a la muerte y daño de las células excitotóxicas (Pina-Crespo y cols., 2014). La ubicuidad de la neurotransmisión glutamatérgica hace que sea un sistema importante de entender, pero un sistema difícil de atacar, farmacológicamente.

La cisteína por otro lado es el sustrato limitante de la velocidad para la síntesis de glutatión el cual protege del daño oxidativo, sin el glutatión las células pueden dañarse o bien destruirse (Pereira y cols., 2000). Las neuronas dependen principalmente de la cisteína extracelular para la síntesis de glutatión (Sagara y cols., 1993). El mecanismo por el cual las

neuronas absorben la cisteína libre no se ha caracterizado por completo (Chen y Swanson, 2003).

1.2.3. Modulación Sináptica

En condiciones normales, el glutamato que está dentro de la neurona es liberado mediante la hendidura sináptica hacia el medio extracelular. Una vez liberado el glutamato, los receptores NMDA y AMPA reconocen el glutamato y abren sus compuertas para la entrada Na^+ y a su vez sale de K^+ generando así un potencial de membrana postsináptica. Una vez finalizado esto, EAAT3 recapta el glutamato extracelular. Este glutamato es descarboxilado gracias a la acción de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), para sintetizar el neurotransmisor GABA (inhibidor por excelencia) en caso de ser necesario, de lo contrario reutilizado para una próxima sinapsis o también puede participar en la síntesis de glutatión junto con la cisteína y la glicina (3 aminoácidos precursores).

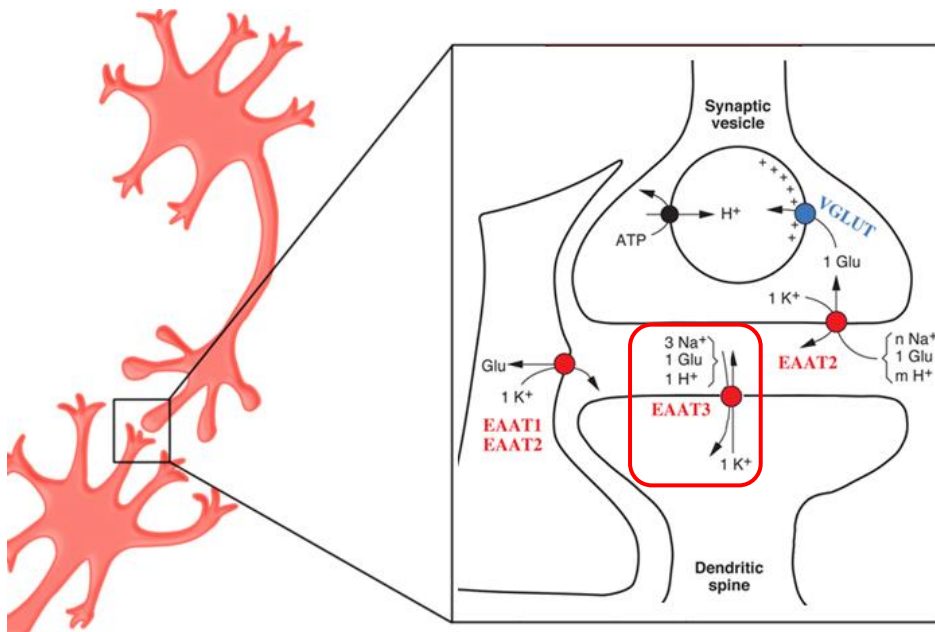


Figura 1.3: Modulación Sináptica del Glutamato. El glutamato se encapsula y se libera al medio extracelular, los receptores NMDA y AMPA generan un potencial de membrana gracias al glutamato y luego el glutamato libre es reciclado por el transportador EAAT3.

Además EAAT3 es una fuente importante de cisteína y contribuye a la protección de las neuronas contra el estrés oxidativo (Nieoullon y cols., 2006). Esto hace plantear la hipótesis de que este EAAT3 intracelular desempeña un papel clave en la regulación de la producción de glutatión y, por lo tanto, protege a las neuronas del daño oxidativo (Nieoullon y cols.,

2006). En ausencia de EAAT3, el glutatión se reduce y el daño oxidativo puede contribuir a la consiguiente pérdida neuronal (Aoyama y cols., 2006).

1.2.4. EAAT y su relación con el TOC

Varios estudios de vinculación y asociación (Arnold y cols., 2006; Dickel y cols., 2006; Stewart y cols., 2007) proporcionan evidencia de una relación entre las variantes en Slc1A1 y el riesgo de TOC, pero brindan una visión limitada de la naturaleza de la supuesta anomalía funcional de Slc1A1 que puede explicar el trastorno.

Varios modelos animales que carecen total o parcialmente de EAAT3 no han mostrado alteraciones en los comportamientos de referencia relevantes para el TOC (Gonzalez et al, 2017; Peghini et al, 1997; Zike et al, 2017b). Esto nos podría dar una evidencia que el problema no radica en la baja actividad del EAAT3. Una posibilidad alternativa es que la función reducida de EAAT3 conduce a una mala distribución del glutamato, tal vez alterando la proporción de glutamato sináptico-extrasináptico y la relación de activación de NMDA, , la desactivación del gen Slc1A1 reduce el glutatión (Aoyama et al., 2006) y, por lo tanto, aumenta el estrés oxidativo, lo que podría llevar a anomalías funcionales.

Sin embargo, una teoría que está tomando mayor relevancia debido al incremento del conocimiento y nuevas técnicas de investigación, es el alelo “rs301430C”, un polimorfismo de un nucleótido (SNP) en el gen SLC1A1 altamente replicado en estudios de TOC se asocia con un aumento de los niveles de transcripción en el tejido cerebral humano (Wendland y cols., 2009), lo que sugiere que la sobreexpresión podría contribuir a la susceptibilidad de TOC (Zike y cols., 2017).

Una investigación realizada en base a un ratón transgénico con sobreexpresión condicional de EAAT3 (Delgado-Acevedo y cols., 2018), respalda la noción de que EAAT3 tiene un papel en la patogénesis de los comportamientos relevantes al TOC, ya que EAAT3^{glo}/CMKII de ratones exhiben una alta tasa de ansiedad, mayores comportamientos repetitivos y una mayor recuperación espontánea del miedo, muchos de los cuales son síntomas centrales del TOC. Además, el aumento de la expresión de EAAT3 afecta las sinapsis corticostriatales que podrían contribuir, al menos en parte, a la base neuronal involucrada en el TOC.

Es posible que este nuevo modelo permita obtener una visión más profunda del papel de EAAT3 en la patogénesis del TOC y de este modo crear una nueva ruta farmacológica para el tratamiento de este complejo trastorno.

1.3. Modelo de inhibición

Dada la apreciación emergente de la importancia de EAAT3 en el trastorno obsesivo-compulsivo, la modulación farmacológica de EAAT3 es de interés, tanto como herramientas para la comprensión científica básica como para un posible enfoque clínico. Si bien existe un inhibidor selectivo para EAAT1 (UCPH-101) (Abrahamsen et al., 2013) y EAAT2 (DHK) (Arriza et al., 1994), no hay ninguno para EAAT3. Aunque los análogos de β -benzo-Asp (Esslinger et al., 2005) y NBI-59159 muestran una ligera preferencia hacia EAAT3 (Coon et al., 2004, Dunlop, 2006), pero esta preferencia no es selectiva, lo que dificulta los métodos farmacológicos para atacar selectivamente EAAT3.

Se ha identificado que el residuo 447 (arginina) del monómero EAAT3 está involucrada en el control del reconocimiento de sustratos cargados, como glutamato y aspartato (Bendahan y cols., 2000). Cuando el residuo 447 del EAAT3, que corresponde a una arginina (R), se reemplaza por cisteína (C), se inhibe el transporte de glutamato y/o aspartato, pero el transporte de cisteína dependiente del sodio queda intacto. El análisis de otros mutantes de sustitución muestra que la sustitución de arginina en lugar de la cisteína introducida es responsable del fenotipo observado (Bendahan y cols., 2000). Según un análisis electrofisiológico detalla que el transportador EAAT3 con cisteína mutante, se ha vuelto neutral en lugar de electronegativo, por lo que provoca que su interacción con el potasio sea defectuosa. De este modo, la arginina 447 desempeña un papel fundamental en la interacción secuencial de aminoácidos ácidos y potasio con el transportador y, por lo tanto, constituye uno de los determinantes moleculares de acoplamiento de sus flujos.

1.4. Reposicionamiento de Fármaco

El descubrimiento de fármacos tradicional es un proceso lento, de alta inversión y de alto riesgo, tienen una duración aproximada de entre 10-17 años, con costes y tasas de fracaso muy elevados (Xia y cols., 2018). Por tanto el reposicionamiento de fármacos surge como una estrategia popular en los últimos años.

El reposicionamiento de fármacos (Drug Repositioning), es el proceso de desarrollo de fármacos basado en la identificación y el desarrollo de nuevas aplicaciones para medicamentos aprobados (Padhy and Gupta, 2011). Estos medicamentos pueden estar en el mercado, o bien, haber sido descartados debido a fallos en las últimas fases de los ensayos clínicos.

Actualmente ya existen estudios relacionadas con el reposicionamiento de fármacos, por ejemplo los que se muestran en el cuadro 1.4.

Cuadro 1.4: Reposicionamiento de fármacos.

Droga	Indicación Original	Nueva indicación
Amantadina	Influenza	Parkinson
Aspirina	Inflamación, dolor	Antiplaquetario
Zidovudina	Cáncer	VIH
Atomoxetina	Antidepresivo	Déficit atencional
Gabapentin	Epilepsia	Dolor neuropático
Bromocriptina	Parkinson	Diabetes mellitus
Propranolol	Hipertensión	Migraña
Metotraxato	Cáncer	Psoriasis, Artritis

El reposicionamiento presenta ventajas por sobre el descubrimiento de fármacos convencional, principalmente en el tiempo y los recursos I+D empleados para encontrar un fármaco idóneo para solucionar la problemática biológica. Además, se ha visto reducido la tasa de efectos secundarios, lo cual crea un mejor perfil de seguridad ante el fármaco.

Distintas estrategias como simulación molecular o docking molecular han ayudado a identificar posibles nuevos blancos para fármacos conocidos, sin embargo su eficacia sigue siendo limitada. Por lo mismo, existe la necesidad de explorar otro tipo de herramientas, entre las cuales ha sido de interés por los métodos basados en metodologías de data mining, machine learning, deep learning e inteligencia artificial. Estas han sido utilizadas para predecir la composición de secuencias de proteínas, estructuras secundarias, la forma del plegamiento de proteínas, identificación de motivos conservados, entre otros usos. Además, y considerando que el crecimiento exponencial de datos biológicos ha presentado un gran desafío, principalmente en lo que se refiere a la transformación de datos heterogéneos a información o conocimiento biológico significativo, se ha propuesto que la aplicación de técnicas de aprendizaje automático en este tipo de problemáticas ha sido muy eficientes.

Considerando lo anteriormente expuesto, el presente trabajo busca mediante la utilización de métodos de inteligencia artificial de aprendizaje automático basado en las bases de datos PDB, la identificación de un posible fármaco conocido con actividad en el EAAT3.

2. HIPÓTESIS

Problema:

El trastorno obsesivo compulsivo es un trastorno mental cada vez más frecuente en el cual las personas tienen pensamientos, sentimientos, ideas, sensaciones (obsesiones) y/o comportamientos repetitivos e indeseables que los impulsan a hacer algo (compulsiones) lo cual obstruyen o impiden su vida cotidiana.

Se desconoce la causa del TOC, sin embargo la evidencia experimental indica que el TOC tiene un fuerte componente genético, dentro de los candidatos, el gen SLC1A1, que codifica para el transportador EAAT3, es hasta la fecha el gen más fuertemente asociado con esta patología.

Se ha encontrado una mutación puntual del transportador EAAT3 en pacientes con TOC, que tiene directamente incidencia en el bolsillo o zona por la cual traspasa los aminoácidos por la proteína EAAT3. Por tanto conocer la implicancia de esta mutación R447/C que regula la actividad un altísimo interés en la neuropsiquiatría. Por ello, se propone la búsqueda de fármacos existentes que pudieran interactuar con EAAT3 mutado y alterar su función. De este modo, se obtendrá una herramienta farmacológica de utilidad para entender los mecanismos que subyacen al TOC, y posiblemente una línea que conduzca a mejores tratamientos.

Hipótesis:

La mutación R447 en EAAT3 describe un posible sitio de unión para drogas.

3. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Identificar posibles sitios de unión relacionados con la mutación puntual de la R447 en EAAT3 para buscar posibles nuevos usos a droga conocidos.

Objetivos específicos

- Modelar por homología el transportador EAAT3 a partir del cristal EAAT1
- Crear trímero a partir de modelamiento molecular
- Identificar posibles sitios de unión en EAAT3 que puedan estar siendo afectados por el residuo R447.
- Evaluar la simulación de acoplamiento molecular de cisteína, glutamato y aspartato en los sitios de unión detectados.
- Realizar mutación *in silico* de la R447 en EAAT3 y realizar evaluaciones de acoplamiento molecular.
- Reevaluar Docking con el software PLIP.
- Realizar Virtual Screening con inteligencia artificial.
- Proponer una nueva droga.

4. METODOLOGÍA

La siguiente metodología describe los pasos realizados para cumplir con los objetivos planteados y de esta manera dar respuesta a la hipótesis.

4.1. Obtención de la estructura 3D de la proteína EAAT3

4.1.1. Identificación de proteína homóloga

Actualmente la proteína EAAT3 no se encuentra cristalizada por lo cual es fundamental encontrar una proteína homóloga que sirva como referencia para realizar este estudio. Para ello se realizó una búsqueda en la base de datos de NCBI→Protein (national center for biotechnology information), en donde se identificó la secuencia aminoacídica de la proteína EAAT3 (secuencia 524 aminoácidos), guardada en formato fasta. A continuación, con la finalidad de identificar secuencias con alta identidad al transportador EAAT3, se realizó un alineamiento local entre la secuencia aminoacídica de EAAT3 y la base de datos de proteínas mediante la herramienta BLAST (Johnson y cols., 2008).

BLAST (basic local alignment search tool) es un programa que usa el algoritmo con enfoque heurístico que se aproxima al algoritmo de Smith-Waterman para encontrar secuencias homólogas. El reporte de BLAST consiste en todos los alineamientos estadísticamente significativos encontrados en la búsqueda heurística. Los alineamientos resultantes son llamados pares de alta puntuación (high score pairs). La significancia estadística de los alineamientos resultantes se determinan mediante la probabilidad que tiene cada alineamiento de haber sido por azar de acuerdo al tamaño de la base de datos, obteniendo así solo los alineamientos que hayan obtenido una probabilidad menor al e-value (expect value). Cuanto menor sea el e-value más significativo es el alineamiento (Altschul y cols., 1990).

Para el alineamiento se utilizó BLASTp ocupando la base de datos “protein data bank” de BLAST. Como templatado se utilizó la secuencia peptídica del transportador de aminoácidos excitadores 3 (EAAT3) descargada anteriormente. La salida del programa contiene los identificadores de la secuencia con alta similitud al templatado. Se seleccionan las proteínas más relevantes según los criterios pertinentes (similitud sobre 50%, e-value pequeño, cobertura), y en base a los identificadores de las proteínas seleccionadas se realiza la búsqueda en el repositorio PDB (<https://www.rcsb.org/>), el cual almacena información acerca de las estructuras 3D de una gran cantidad de moléculas biológicas. Se guardó las estructuras 3D de las proteínas en formato PDB.

4.1.2. Modelamiento por Homología

El modelamiento por homología permite obtener una representación tridimensional de las secuencias de proteínas que aún no tienen resueltas sus estructuras experimentalmente, a partir de la cual se estiman las mejores conformaciones 3D de la secuencia de aminoácidos de interés (query). Esta técnica es fundamental para el proceso de modelado de la estructura de EAAT3.

Una vez seleccionadas la o las secuencias de proteínas molde (con estructura conocida), es necesario realizar alineamientos de las secuencias aminoacídicas. En aquellos casos en que las estructuras moldes y los query tengan un largo de secuencia muy distintos, es aconsejable utilizar algoritmos de alineamiento local (Smith y Waterman, 1981), mientras que en los casos en que ambas secuencias de proteínas (o las múltiples) tengan largo similar, se recomienda un algoritmo de alineamiento global (Needleman y Wunsch, 1970). Luego de tener un alineamiento consenso se construyó el modelo.

En este proyecto se utilizó el software Modeller v9.21 (Fiser y Sali 2003). Modeller es un método matemático que establece restricciones basadas en que la distancia de un par de aminoácidos en el modelo es similar a la distancia de los correspondientes aminoácidos en la estructura de referencia. Esta restricción es complementada con otras restricciones estereoquímicas que se aplican sobre los ángulos de enlace, el largo de los enlaces, entre otros. En aquellas zonas en que la secuencia query no encuentra una estructura en el molde, Modeller realiza una estimación de novo de acuerdo a las características fisicoquímicas particulares de cada aminoácido, tomando en cuenta la estructura secundaria prevista de los aminoácidos (alfa-helice, beta-plegada o random coil).

La salida Modeller reporta los modelos generados evaluados energéticamente y además el programa descarta automáticamente los modelos que no son viables desde la perspectiva estereoquímica.

4.1.3. Minimización

Con el fin de obtener un mínimo energético de la estructura de EAAT3 y como la proteína se sitúa en la membrana celular en forma de trímero, aunque cada monómero funciona por separado, es que la minimización se torna una necesidad.

Para la minimización se creó un sistema en donde el trímero de EAAT3 está inmerso en una membrana lipídica recubierta de aguas y solvatadas con NaCl. Para la creación de la membrana se recurrió a la base de datos de Orientaciones de Proteínas en Membranas (OPM), en el cual el modelo de orientación de referencia fue 5LLU. Luego mediante scripts en lenguaje bash y tcl, se logró insertar el trímero de EAAT3 en una membrana lipídica, además se agregaron aguas por ambos extremos de la membrana y se neutraliza el sistema con iones de NaCl.

Luego con el software NAMD se realizó una dinámica molecular (Equilibrado y minimización), con la proteína embebida en la membrana lipídica y en una caja de agua esta fue sometida a evaluaciones.

Posterior a eso se evalúa el modelo mediante las herramientas Ramachandran (Kleywegt & Jones, 1996) y ProSA-web (Wiederstein & Sippl, 2007).

El gráfico Ramachandran muestra los principales ángulos de torsión de la cadena phi, psi (ϕ , ψ); en una proteína de estructura conocida. Además, muestra los ángulos de Ramachandran junto con un resultado de análisis detallado.

Por otro lado, ProSA-web se emplea con frecuencia en la validación de la estructura de proteínas. ProSA calcula un puntaje de calidad general (Z-score) para una estructura de entrada específica. Si esta puntuación está fuera del rango característico de las proteínas nativas, la estructura probablemente contenga errores. Además reporta una gráfica de puntuaciones de calidad local que evidencia a partes problemáticas del modelo que también se destacan en un visor de moléculas 3D para facilitar su detección.

4.2. Simulación de acoplamiento molecular

4.2.1. Identificar posibles sitios de unión en EAAT3 que puedan estar siendo afectados por el residuo R447.

MetaPocket2.0 (Bingding Huang, 2009) es un meta servidor para identificar los sitios de unión de ligandos en la superficie de la proteína. MetaPocket es un método de consenso, en el que los sitios de unión predichos de ocho métodos: LIGSITEcs, PASS, Q-SiteFinder, SURFNET, Fpocket, GHECOM, ConCavity y POCASA se combinan para mejorar la tasa de éxito de predicción. El procedimiento de MetaPocket2.0 se engloba en tres pasos generales:

- Llamado de los predictores
- Generación de sitios meta-pocket
- Asignación de residuos de enlace

En el primer paso, la estructura de la proteína dada se enviará a 8 predictores de LIGSITEcs, PASS, Q-SiteFinder, SURFNET, Fpocket, GHECOM, ConCavity y POCASA para identificar sitios de bolsillo en su superficie, todos los predictores se llaman en paralelo para ahorrar tiempo de ejecución.

En el segundo paso, los sitios de bolsillo identificados por estos elementos predictores tienen diferentes funciones de puntuación de clasificación, por lo que es difícil comparar y evaluar los sitios de bolsillo predichos directamente. Para hacer que las puntuaciones de clasificación sean comparables, una puntuación z se calcula por separado para cada sitio de bolsillo en diferentes predictores. Posteriormente, solo los tres primeros sitios de bolsillo en cada predictor se toman en consideración. Por lo tanto, tenemos un total de 24 sitios de bolsillo. Luego, los sitios de bolsillo se agruparán de acuerdo con su similitud espacial y todos los grupos finales se clasificarán según los valores totales de puntuación z de ellos. Los sitios finales de bolsillo son el centro de masas de los grupos finales.

El propósito del tercer paso es identificar los residuos funcionales alrededor del sitio de meta bolsillo identificado, que podrían ser los posibles sitios de unión del ligando en la superficie de la proteína.

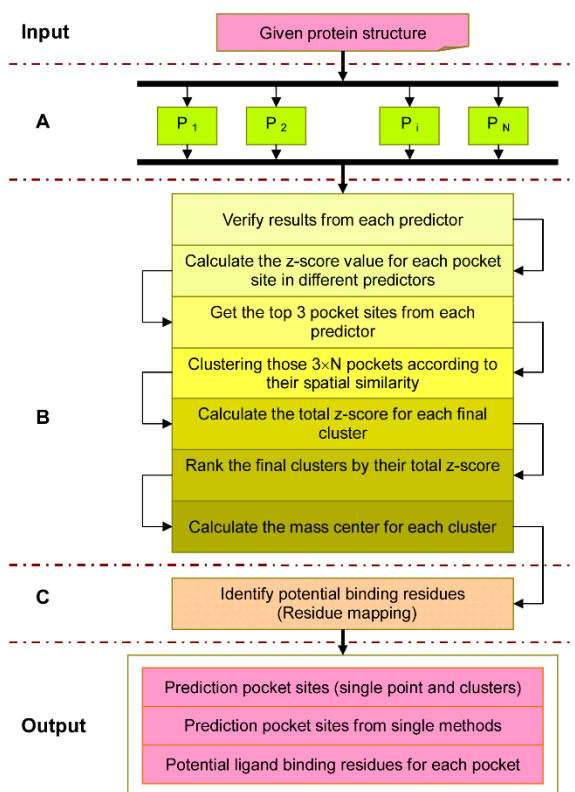


Figura 4.1: La ilustración del procedimiento metaPocket 2.0.

Es necesario realizar este procedimiento para la estructura Wildtype y la mutada, de esta manera establecer diferencias o similitudes entre los sitios de unión formados, ya sea de carácter energético o bien modificaciones en el mismo sitio y tratar de darle explicación al posible cambio.

4.2.2. Simulación de acoplamiento molecular proteína-ligando

El acoplamiento molecular o Docking permite simular la interacción de acoplamiento, en este caso proteína-ligando. Si bien contamos con las estructuras de proteína Wildtype y mutado, aún falta generar las estructuras de los ligandos para su correspondiente interacción.

La creación de ligandos se realizará en Molview, programa web de código abierto contiene una gran base de datos de compuestos y residuos, lo cual facilita su manipulación. En este caso como nuestro transportador es un transportador de glutamato, cisteína y aspartato, se crearon estos 3 residuos en formato PDB con tal de trabajar en el mismo formato todo.

Para la realización del docking se utilizará el software Autodock4.2.6 (Morris y cols., 1998). Primero se preparan las estructuras de proteína y ligando con el fin de darle cargas parciales,

cierta flexibilidad a la estructura, agregar los hidrógenos en caso de faltar. Posterior a eso se define el sitio inicial de interacción (donde se centrará la caja), donde se establece las dimensiones de la grilla o (grid box), una caja delimitada en la cual el ligando puede generar cambios conformacionales aleatorios para evaluar nuevamente la interacción, y finalmente la cantidad de generaciones de pockets y ciclos a evaluar.

Para realizar el docking en Autodock, luego de la preparación del sistema, se selecciona un algoritmo para buscar la mejor posición o acoplamiento del sistema proteína-ligando. Se utilizan algoritmos genéticos, por lo general el Lamarkiano (AGL).

El AGL comienza creando una población de individuos al azar (distintas conformaciones del ligando), evalúa, luego se someten nuevamente a cambios al azar, seleccionando aquellos genotipos en los cuales el valor de interacción con la proteína es favorable. Las evaluaciones de las conformaciones se realizan en base a un pre-cálculo proveniente de AUTOGRID, donde se limitan por grilla creada, cada valor representa la energía de interacción de cada átomo del ligando, con cada átomo de la proteína, optimizando de este modo el tiempo de cómputo.

Cabe destacar que el docking se realizará para EAAT3 Wildtype para los 3 residuos que transporta esta proteína (Glutamato, Cisteína y Aspartato).

4.2.3. Mutación in silico de EAAT3 del residuo R447 y simulación de acoplamiento molecular

Una vez obtenida la estructura de EAAT3 tridimensional, es necesario realizar una mutación del residuo R447 con tal de evaluar la contraposición de los futuros procedimientos entre la estructura Wildtype (creada por modelamiento) y la mutada.

Para realizar una mutación in silico de la R447 en EAAT3 se ocupará software VMD (Visual Molecular Dynamics), más bien, un complemento (plugin) de este programa llamado “mutator” (v1.3). Este complemento proporciona un método muy simple para mutar un residuo objetivo, se requiere como input archivos PDB y PSF de la proteína a mutar, y como parámetros es necesario el ID del residuo a cambiar, y el código de residuo de tres caracteres del aminoácido mutante. También puede construir, para el propósito específico de los cálculos de energía libre, una estructura híbrida donde están presentes tanto las cadenas laterales iniciales como las mutadas.

Posterior a la mutación se realiza Docking molecular de EAAT3 mutada para los 3 residuos que transporta esta proteína en Wildtype (Glutamato, Cisteína y Aspartato).

4.2.4. Reevaluación del acoplamiento molecular con PLIP

PLIP es un generador de perfiles de interacción proteína-ligando (PLIP) (Salentin y cols., 2015), un servicio web gratuito para la detección y visualización totalmente automatizadas de contactos de proteína-ligando no covalentes relevantes en estructuras 3D. La entrada es un

archivo PDB con el complejo proteína-ligando a estudiar. A diferencia de otras herramientas, el algoritmo PLIP basado en reglas no requiere ninguna preparación de estructura. Devuelve una lista de interacciones detectadas a nivel de un solo átomo, que abarca siete tipos de interacción (enlaces de hidrógeno, contactos hidrofóbicos, apilamiento de pi, interacciones de pi-cati3n, puentes salinos, puentes de agua y enlaces hal3genos). PLIP se destaca por ofrecer im3genes listas para publicaci3n, archivos de sesi3n PyMOL para generar im3genes personalizadas y archivos de resultados analizables para facilitar el procesamiento de datos sucesivo. PLIP se basa en una aplicaci3n de l3nea de comandos de Python que realiza procesamientos locales por lotes o de forma online.

En base a este software se evalúan los diferentes contactos que existen entre la proteína (wild-type y mutada) y los tres amino3cidos estudiados.

4.3. Virtual Screening con inteligencia artificial CNN

Las redes neuronales son sistemas inform3ticos inspirados en las redes neuronales biol3gicas que no es un algoritmo propiamente tal, sino crea una instancia para que muchos algoritmos de aprendizaje autom3tico trabajen juntos y procesen entradas de datos complejos. Una red neuronal artificial consiste en un conjunto de nodos llamados neuronas que son capaces de conectarse entre s3, generando una red de nodos. Esta red de nodos se compone de capas, las cuales se dividen en

- capa de entrada.
- capa oculta.
- capa de salida.

Las conexiones entre nodos cumplen la funci3n de modificar el valor de salida de cada nodo, esto es mediante algoritmos de peso que permiten multiplicar su valor, pudiendo esto potenciar o inhibir el alcance de la red mediante la activaci3n o desactivaci3n de la conexi3n entre neuronas (nodos). Este sistema de conexiones permite discernir la presencia de elementos de aprendizaje, logrando identificar patrones o reglas. Estas reglas son evaluadas mediante la propagaci3n hacia atr3s de errores, la cual modifica los pesos de los nodos buscando minimizar la funci3n de p3rdida. Esta disminuci3n es obtenida por medio de estad3sticas en funci3n de la primera capa (entrada) que contiene los datos brutos de entrada y la tercera capa (salida) que contiene un nodo por cada clase.

Las redes neuronales convolucionales (CNN) son un tipo de redes neuronales artificial de aprendizaje supervisado que intentan imitar el c3rtex de la visi3n del ojo humano. As3, este m3todo procesa im3genes y/o patrones por capas, lo que permite identificar diferentes caracter3sticas que propician a una identificaci3n adecuada de los objetos.

Para la creaci3n de esta red neuronal se entren3 en base a todos los f3rmacos aprobados los cuales tienen asociada una prote3na como target.

- Para la creación de la imagen de entrada, que es básicamente una matriz binaria, el programa tiene 3 capas: una con los 20 aminoácidos conocidos, otra capa con los aminoácidos que interactúan con el ligando en específico a estudiar y una última con las propiedades fisicoquímicas de este pocket (hidrofobicidad por ejemplo).
- Dentro de la capa oculta las CNN se dividen en 2 procesos, capa convolucional y de agrupamiento (Pooling); en la capa convolucional es un proceso donde se aplican filtros. El filtro utiliza una matriz de tamaño $N \times N$ con valores aleatorios llamada kernel que recorre toda la imagen de izquierda a derecha y de arriba a abajo cada pixel, recorriendo toda la matriz, en el recorrido el kernel va multiplicando (producto escalar) el conjunto de pixeles correspondientes, generando como resultado una matriz nueva que es una nueva capa de neuronas ocultas, esta multiplicación dada por el kernel es denominada peso. Todos los filtros de una convulsión tienen los mismos parámetros, solo varía los valores del kernel (Pesos). En el caso de la capa de agrupamiento o pooling reduce el tamaño de muestreo filtrando los mejores valores y así de esta manera reduciendo a matrices aún más pequeñas que están siempre asociadas a las matrices anteriores, esto aumenta indefinidamente el número de capas
- Para la salida se ocupa la función flattening. esta función permite transformar la imagen con cada capa de profundidad (multidimensional) a un vector (1 dimensión).

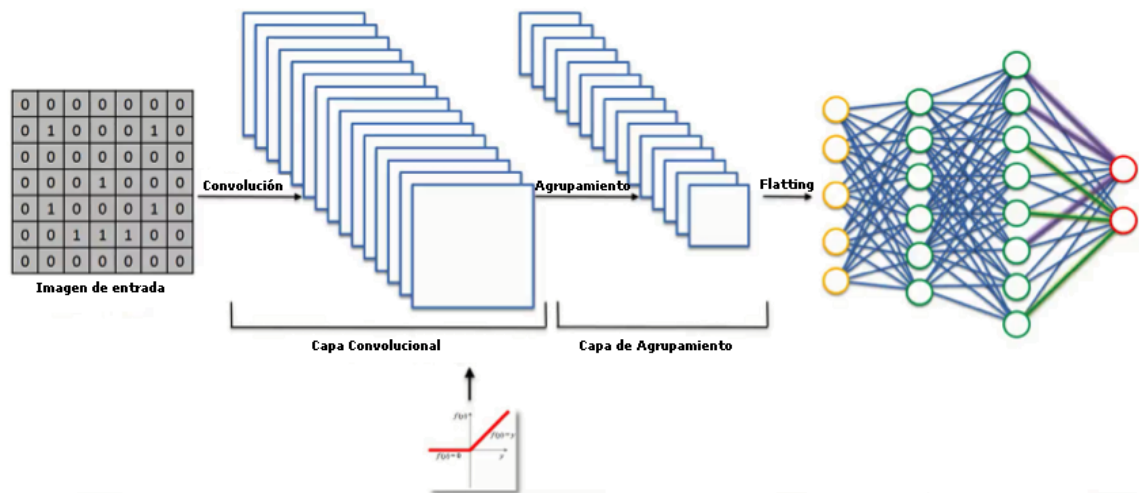


Figura 4.2: Resumen de CNN entrenada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estructura tridimensional

La creación de la estructura tridimensional de EAAT3 se basó la secuencia NP_004161.4 de la base de datos de NCBI → protein, la cual contiene 524 aminoácidos.

excitatory amino acid transporter 3 [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: NP_004161.4

[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)

```
>NP_004161.4 excitatory amino acid transporter 3 [Homo sapiens]
MGKPKARKGCEWKRFLKNNWVLLSTVAAVVLGITTGVLVREHSNLSTLEKFFAFPPGEILMRHLKLIILPL
IISSMITGVAALDSNVSGKIGLRAWVYFCTTLIAVILGIVLVVSIKPGVTQKVGEIARTGSTPEVSTVD
AMLDLIRNMFENLVQACFQQYTKREEVKPPSDPENMTEESFTAVMTTAISKNKTKKEYKIVGMYS DGI
NVLGLIVFCLVFGVLVIGKMGKEGQILVDFFNALSDATMKIVQIIMCYMPLGILFLIAGKIIIEVEDWEIFR
KLGLEYMATVLTGLAIHSIVILPLIYFIVVRKNPFRFANGHAQALLTALNIISSSSATLPVTFRCAEENQV
DKRITRFVLPVGATINMDGTALYEAVAAVFIQLNDLGLIGQIITISITATSASIGAAGVPQAGLVTMV
IVLSAVGLPAEDVTLIIAVDWLLDRFRTMNVNLGDAFGTGIVEKLSKKELEQNDVSSSEVNIWNPFALEST
ILDNEDSDTKKSYVNGGFVADKSDTISFTQTSQF
```

Figura 5.1: Secuencia aminoacídica de EAAT3

A partir del alineamiento en BLAST y la búsqueda de plantados en NCBI se llevó a cabo el modelamiento por homología en el cual se utilizó las 2 mejores estructuras cristalizadas que tienen un porcentaje de identidad cercano al 60%, con un 93% de cobertura y e-value 0.0, como se muestra en la imagen.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Chain A, Excitatory Amino Acid Transporter 1, neutral Amino Acid Transporter B(0), excitatory Amino Acid Transporter 1 (Homo sapiens)	556	556	93%	0.0	59.49%	5LLM_A
✓	Chain A, Excitatory Amino Acid Transporter 1, neutral Amino Acid Transporter B(0), excitatory Amino Acid Transporter 1 (Homo sapiens)	556	556	93%	0.0	59.49%	5LLU_A
✓	Chain A, Neutral amino acid transporter B(0) (Homo sapiens)	360	360	82%	2e-118	45.25%	6RVX_A
✓	Chain A, Neutral amino acid transporter B(0) (Homo sapiens)	356	356	82%	5e-117	45.02%	6GCT_A
✓	Chain A, 425aa long hypothetical proton glutamate symport protein (Pyrococcus horikoshii OT3)	201	201	87%	7e-59	31.73%	4X2S_A
✓	Chain A, Glutamate transporter homolog (Pyrococcus horikoshii OT3)	196	196	84%	4e-57	31.83%	6CTF_A

Figura 5.2: BLASTp de la secuencia aminoacídica de EAAT3.

Estas estructuras corresponden al transportador EAAT1 en humanos y se ocuparon de molde el monómero 5LLM y el trímero 5LLU para construir un modelo homólogo al transportador EAAT3 (Excitatory amino acid 3). En ambas estructuras contaban con un ácido aspártico (ASP) y 2 iones de sodio (Na⁺), donde teóricamente el EAAT3 transporta sus aminoácidos.

Estos cristales tenían residuos perdidos y se observó que estos residuos que faltaban pertenecían a loops en el inicio, final e interconexiones entre alfa-hélices.

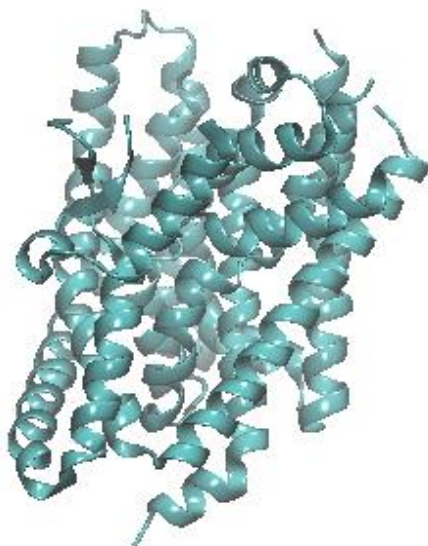


Figura 5.3: Estructura cristalográfica de 5LLM.
Contiene residuos perdidos que corresponden a loops.

Para solucionar esto se usó Modeller para completar estos residuos faltantes tratando la estructura original (sin los residuos faltantes) como una plantilla y construyendo un modelo nuevo utilizando la secuencia completa evitando que estas inserciones modifiquen los residuos que ya estaban.

Luego con el software modeller se generaron 2000 estructuras para representar la EAAT3, cada una de estas con un puntaje DOPE (Discrete Optimized Protein Energy) diferente, mientras menor sea el valor DOPE, mejor y más estable es el modelo.

La estructura seleccionada anteriormente se sometió a un refinamiento de loops, debido a que estos loops como no estaban cristalizados requieren de un refinamiento para minimizar aún más su valor DOPE, a partir de esto se crearon 5 nuevos modelos y nuevamente se eligió el con mejor valor.

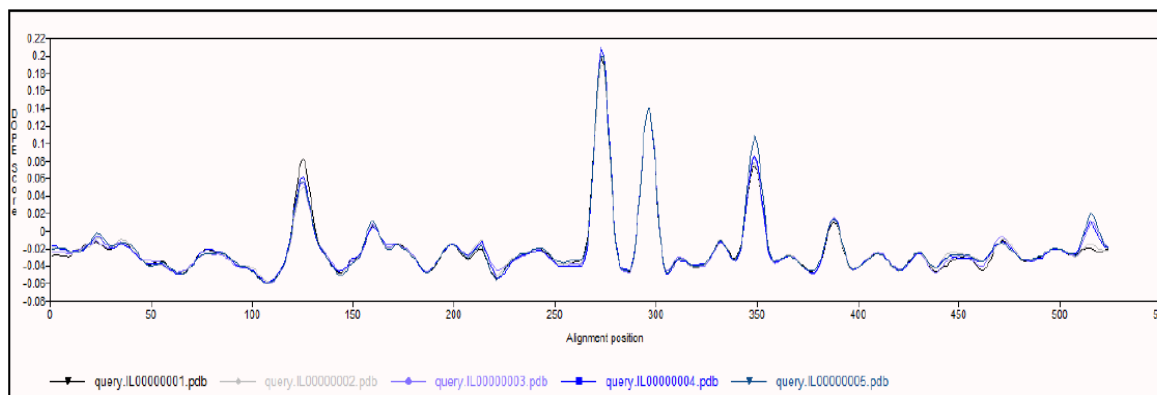


Figura 5.4: Gráfico de puntuaje DOPE de loops refinados.

En este caso se aprecia en la imagen del gráfico que los grandes picos es en donde hay más cambios en la puntuación DOPE, además en aquellas zonas en donde habían pérdidas de residuos (missing residues) es en donde se aprecian diferencias entre los modelos creados. Cabe destacar la creación del modelo de EAAT3 fue solo de 1 cadena, por lo cual para una correcta minimización energética este debe estar en forma de trímero como se expresa en naturalmente en la membrana celular de las neuronas post-sinápticas.

Para la formación del trímero se utilizó la herramienta MultiSeq del software VMD (Visual Molecular Dynamics), en el cual se alineó las estructuras de EAAT3 generada por Modeller y el modelo 5LLU (trímero), donde se alineó el monómero de EAAT3 por cadena (A, B y C) del modelo de referencia por separado y luego se guardaron las 3 cadenas en un solo archivo PDB.

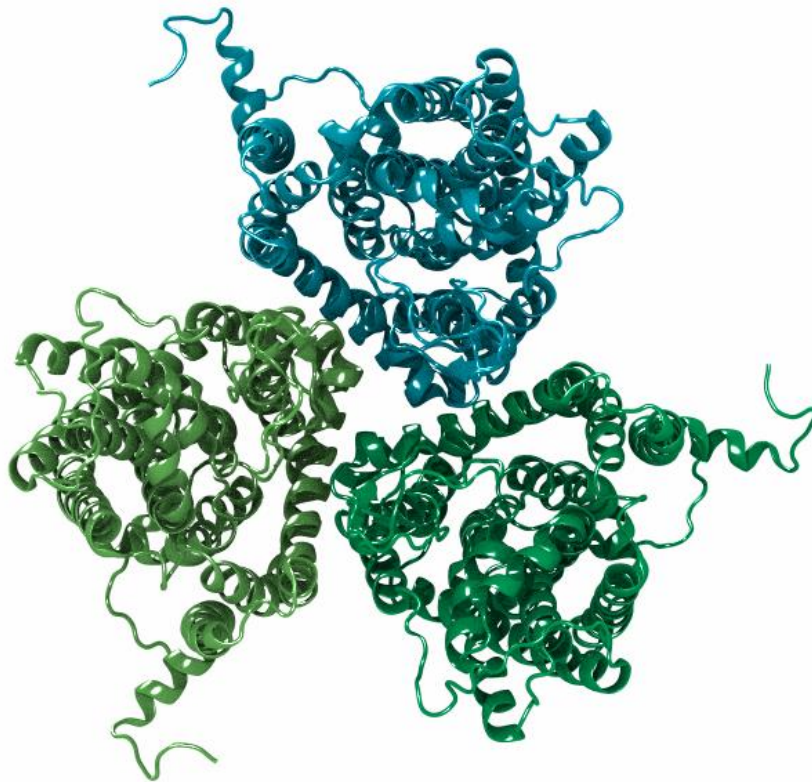


Figura 5.5: Trímero de EAAT3

5.2. Minimización

Para la minimización, como se mencionó anteriormente se creó un sistema en dónde el trímero de EAAT3 está inmerso en una membrana lipídica recubierta de aguas y neutralizada con iones de NaCl, como se aprecia en la figura 5.6.

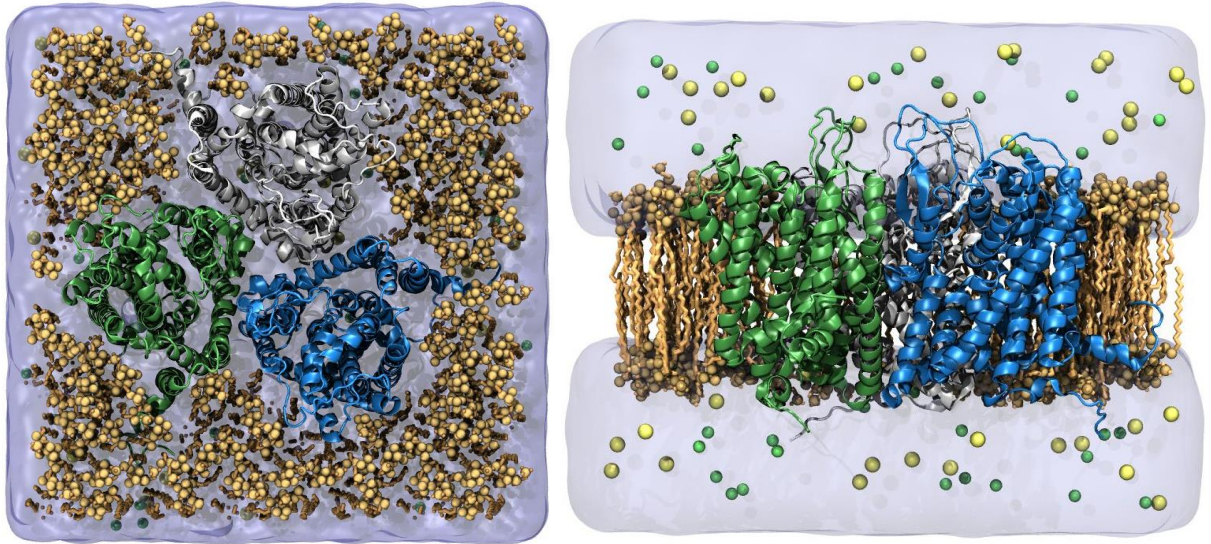


Figura 5.6: Sistema de EAAT3 luego de Minimización.

Luego de la dinámica molecular con el software NAMD se analizó la proteína con el software online ProSA-web .

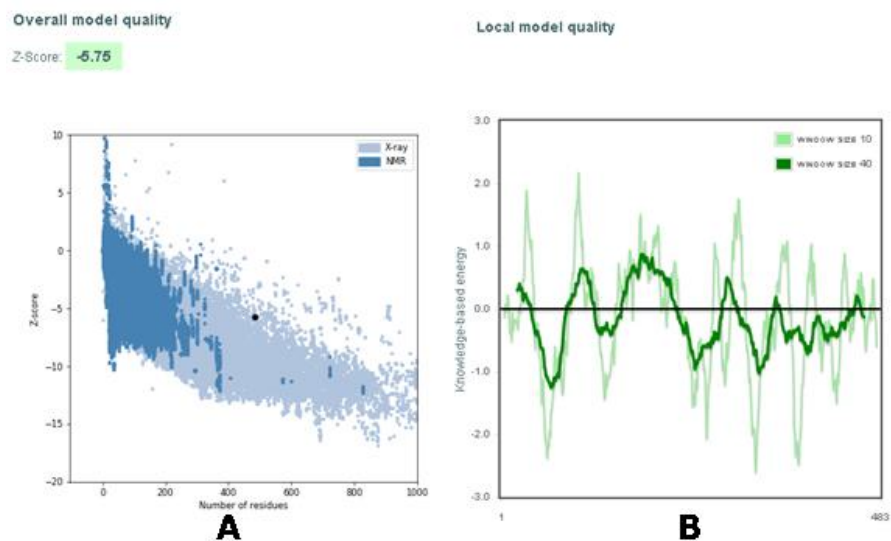


Figura 5.7: Resultados ProSA-web. En la imagen A se muestra el valor de z-score donde evalúa la calidad del modelo en base a todas las proteínas experimentales existentes según el largo de la proteína y lo muestra en un gráfico de puntos; por otro lado la imagen B muestra un gráfico con la calidad del modelo al representar las energías en función de la posición de la secuencia de aminoácidos.

Los resultados entregados por ProSA-web nos indican que nuestra proteína está dentro del rango aceptable en término globales, en el gráfico de puntos nuestro modelo lo sitúa casi en el centro, lo que nos dice que la calidad del modelo está en rango promedio según su largo de cadena. En el gráfico de líneas nos muestra el nivel energético aminoácido por aminoácido con en el cual los picos altos indicaría un fallo, sin embargo con respecto a un general el modelo tiene menos picos de máximos, por lo cual nos advierte que el modelo es aceptable.

De acuerdo al grafico de ramachandran se puede apreciar que la estructura secundaria que predomina en la proteína EAAT3 son las alfa-hélices, lo cual corrobora con la literatura que infiere que esta proteína posee 8 regiones alfa-hélice transmembranales.

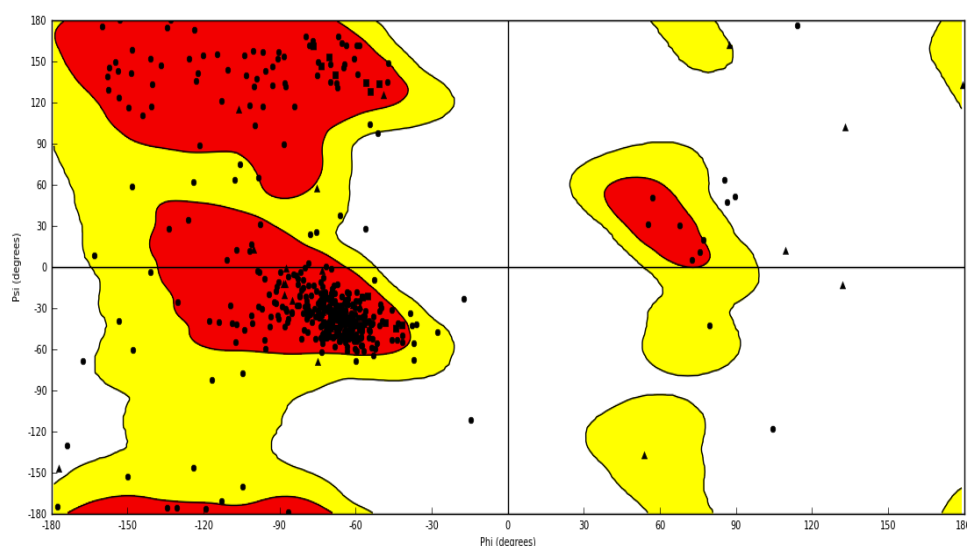


Figura 5.8: Gráfico ramachandran del monómero de EAAT3.

5.3. Sitios de Unión

Ya obtenido un modelo de la proteína EAAT3 apropiado para nuestro estudio, se realizó la búsqueda de posibles sitios de unión mediante el Web-Service Metapocket, la salida del programa arrojó 35 deferentes posibles pocket, sin embargo el residuo de nuestro interés es el residuo arginina 447, debido a que por literatura se conoce que es un residuo clave para el transporte de aminoácidos como glutamato, aspartato y cisteína. Al filtrar los pocket que contengan este residuo solo se encontró uno, como se muestra en la 5.9.

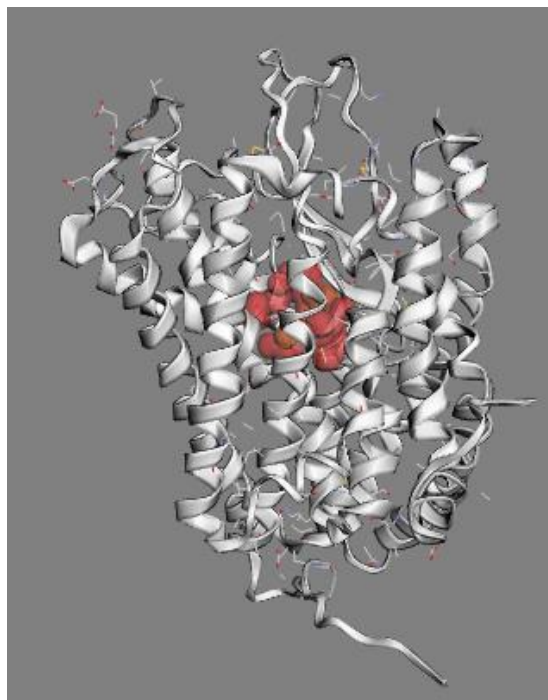


Figura 5.9: Pocket con el residuo R447.

5.4. Mutación y Docking Molecular

Ya conocido el pocket asociado al residuo R447, previo al Docking molecular se realizó la mutación con ayuda de la herramienta de VMD, “residue mutate”, en el cual se seleccionó el residuo R447 y se mutó por cisteína.

Básicamente solo tenemos un pocket asociado al residuo 447, sin embargo, el transportador EAAT3 es capaz de transportar 3 tipos distintos de aminoácidos que son el glutamato, aspartato y cisteína.

Se realizó el docking molecular para establecer diferencias de las interacciones de los ligandos, que dan explicación a que está resultando al ocurrir la mutación puntual, los modelos fueron seleccionados de acuerdo a los resultados de las energías de interacción obtenidas del docking entre los 3 diferentes aminoácidos, los resultados fueron los siguientes:

EAAT3 Wildtype	Docking Score	EAAT3 Mutada	Docking Score
Cisteína	-9.387	Cisteína	-6.404
Glutamato	-7.573	Glutamato	-3.231
Aspartato	-5.764	Aspartato	-2.504

Cuadro 5.1: Docking Wildtype vs Mutada.

Se puede observar una baja considerable en la energía de interacción con los ligandos, lo cual concuerda con lo dicho en literatura que la proteína baja interacción con los ligandos al ocurrir la mutación.

5.5. Reevaluación Docking con PLIP

Posterior a los Docking moleculares se analizaron estos mismos con el software online PLIP (profile ligand interaction protein), es software web libre para la detección y visualización totalmente automatizada de contactos relevantes de proteína-ligando no covalente en estructuras 3D. El input es la estructura tridimensional del complejo proteína ligando en formato PDB. En este caso contamos con 3 ligandos (cisteína, glutamato, aspartato), los cuales fueron acoplados previamente a la proteína wild-type (creada en modeller) y mutada (mutación puntual 447 R/C), en total 6 complejos proteína-ligandos.

El algoritmo PLIP basado en reglas no requiere ninguna preparación de estructura, aunque tiene una opción de realizar pequeñas correcciones en el input.

Devuelve una lista de interacciones detectadas a nivel de un solo átomo, que abarca siete tipos de interacción (enlaces de hidrógeno, contactos hidrófobos, apilamiento de pi, interacciones de pi-cati3n, enlaces i3nicos, enlaces de agua y enlaces hal3genos).

En caso de nombres de ligandos no est3ndar o cadenas faltantes, PLIP realiza peque3as correcciones en el archivo de entrada

PLIP se destaca por ofrecer im3genes listas para publicaci3n, archivos de sesi3n PyMOL para generar im3genes personalizadas y archivos de resultados analizables para facilitar el procesamiento de datos sucesivo. El c3digo fuente completo de Python est3 disponible para descargar en el sitio web. El modo de l3nea de comandos de PLIP permite la creaci3n de perfiles de interacci3n de alto rendimiento.

	Wild type			Mutada		
Ligandos	Aspartato	Glutamato	Cisteína	Aspartato	Glutamato	Cisteína
N° Interacciones	5	7	6	4	4	2
Interacción con residuo 447	si	Si	Si	no	no	No
Tipo de interacción	Enlaces de H Interacciones electrostático	Enlaces de H Interacciones electrostático	Enlaces de H Interacciones electrostático	Enlaces de H Interacción Hidrofóbica	Enlaces de H Interacción Hidrofóbica	Enlaces de H

Cuadro 5.2: Análisis PLIP EAAT wildtype y mutado.

Se puede apreciar en la tabla 5.1 en donde claramente el número de interacciones baja para la proteína mutada, además otra diferencia clave reside en que solo ocurre interacción electrostática en el transportador EAAT3 wild-type por lo que reduce interacción de estos aminoácidos en el espacio para ser transportada.

Un punto clave asociada a la proteína wild type es que tiende a transportar aminoácidos cargados negativamente como el glutamato y aspartato, sin embargo, cuando el residuo arginina 447 cambia por una cisteína (mutación puntual encontrada en pacientes TOC) este bolsillo del transportador cambia electroquímicamente y ya no habría este intercambio de gradientes lo cual impide el paso de estos aminoácidos. Por otro lado la cisteína si logra tener mayor afinidad de debido a que es un aminoácido neutral.

5.6. Virtual Screening con CNN

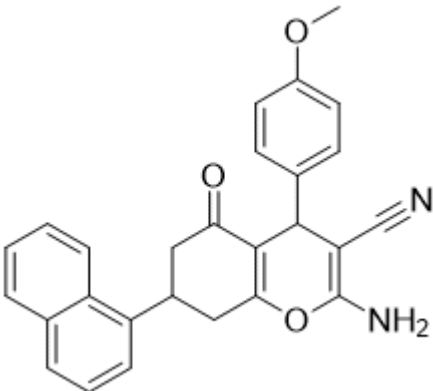
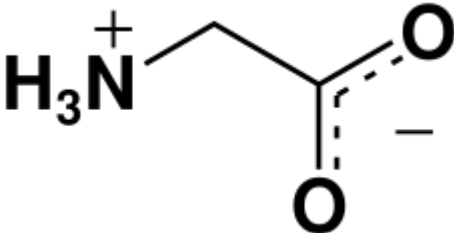
Para realizar estudios de reposicionamiento de fármacos es necesario saber principalmente 2 cosas la estructura del fármaco y el ligando acoplado o en su defecto el pocket, es por eso que se necesita saber que ligando se une a que proteína, desde la base de datos de DrugBank se extrajeron todas los fármacos aprobados por la FDA y que hayan sido cristalizados en algún archivo de la base de datos de PDB y que a su vez estos fármacos estén asociados con al menos una proteína objetivo.

Actualmente en 2019, existen 2621 drogas o fármacos aprobados, sin embargo solo existen 634 fármacos que están asociados con proteínas objetivo, por lo que se necesitaron 1432 PDB, proteínas y fármacos, para el entrenamiento de la red CNN.

Como la familia EAAT tiene estructuras muy parecidas, con identidad cerca del 60%, y como EAAT1 ya tiene un inhibidor selectivo que es el UCPH-101, se realizó un Docking del fármaco UCPH-101 con la proteína mutada EAAT3 de tal manera con el software con CNN se pueda realizar. Debido a que se requiere de un ligando o pocket y una proteína objetivo.

A la red CNN se le entregó la proteína mutada con el pocket asociado a UCPH-101, cerciorándose de que sea exactamente el pocket de la proteína EAAT1, vale decir, replicar lo que sucede en EAAT1, pero en la proteína mutada EAAT3, para poder encontrar un fármaco semejante que ya haya sido aprobado por FDA.

El fármaco encontrado mejor puntaje mediante el método CNN fue GOL lo que corresponde a una glicina, en donde se realizó un docking molecular con tal de apreciar las diferencias, como se aprecia en el cuadro 5.3.

	UCPH-101	GOL
Energía de interacción	-4.669	-1.569
Estructura		

Cuadro 5.3: Energía UCPH-101 vs nuevo fármaco.

Se logra evidenciar que la energía de interacción baja súbitamente con el nuevo fármaco encontrado, esto se puede explicar de muchas maneras, en primer lugar, estructuralmente UCPH-101 es una molécula con 5 anillos formada por 53 átomos, en desmedro de GOL que contiene solo 10 átomos. El pocket en donde se aloja naturalmente el fármaco UCPH101 es un pocket de gran espacio ubicado fuera de la zona de transporte, sitio alostérico. Es posible que el modelo de red CNN le falta aún más entrenamiento para encontrar un fármaco más acertado.

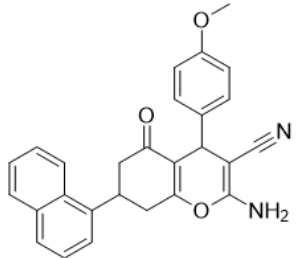
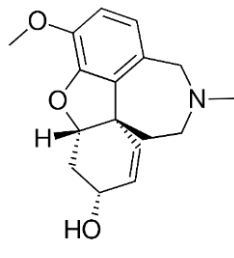
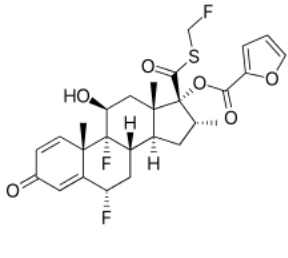
Debido a que el fármaco con mayor puntaje no satisface con el modelo que se plantea se tomaron los 2 siguientes con mayor puntaje, los cuales fueron galantamina y fluticasona furoato.

La galantamina es una benzazepina derivada de la norbeladina. Es un inhibidor de la colinesterasa que se ha utilizado para revertir los efectos musculares del trietioduro de galamina y la tubocurarina, y se ha estudiado como un tratamiento para la enfermedad de

Alzheimer y otros trastornos del sistema nervioso central. Por otra parte fluticasona es un glucocorticoide sintético disponible como inhalador y aerosol que se usa para aliviar los síntomas de la rinitis, como estornudos y secreción, congestión en la nariz, provocado por alergias principalmente.

Sólo con revisar la funcionalidad de ambos fármacos la galantamina destaca por sobre fluticasona debido a que ya existe evidencia que participa en el sistema nervioso central, en donde se ubica la proteína objetivo.

Se realizó Docking moleculares con tal de apreciar las diferencias entre estos fármacos y los resultados

	UCPH-101	Galantamina	fluticasona furoato
Energía de interacción	-4.669	-4.979	-0.856
Estructura			

Cuadro 5.4: Galantamina vs Fluticasona furoato.

Como se puede apreciar en el cuadro 5.4, la galantamina tiene una energía de interacción levemente mejor que el fármaco UCPH-101. Ahora si bien tienen una energía semejante, UCPH-101 es un inhibidor selectivo de EAAT1 por lo que era de esperar que un potencial fármaco para EAAT3 debería tener una energía de interacción un tanto mayor. Por otra parte las interacciones presentes en el complejo galantamina-EAAT3 son como los que se muestran en la figura.

Galantamina		
Tipo de interacción	Hidrofóbica	Enlace de hidrógeno
N° Interacciones	6	2
Residuos involucrados	213L, 216I, 217V, 220L, 361V, 361V	91G, 95V

Cuadro 5.5: Interacciones del complejo galantamina-EAAT3

Estructuralmente si bien tienen similitudes, galantamina posee 4 anillos y UCPH-101 por su parte tiene 5 anillos, galantamina es una molécula levemente más pequeña por lo que se infiere que puede amoldarse de mejor manera al bolsillo de la proteína.

Por otra parte, lo cual resulta muy motivador, es que galantamina se ha ocupado como tratamiento del alzhéimer participando en el sistema nervioso central, pero es un inhibidor selectivo de acetilcolinesterasa, por lo cual habría que probar cuán selectivo podría ser este fármaco con respecto a la acetilcolinesterasa.

6. CONCLUSIÓN

Bajo el marco de desarrollo y resultados de esta tesis se concluye que la mutación puntual del residuo 447 si modifica de forma negativa el sitio de unión del trasportador EAAT3. De modo que se e concluye lo siguiente:

- El TOC al ser un trastorno en incremento requiere investigación más a fondo con tal de encontrar el origen de la causa.
- Se evidenció que existe una clara diferencia en interacciones de la proteína mutada y wildtype, en donde las interacciones disminuyen cuando la mutación en el residuo 447 ocurre.
- Se encontró un mecanismo, como el sistema glutamatérgico para afrontar problemas neurológicos, ya que solo existen inhibidores de recaptación de dopamina o serotonina para controlar el TOC.
- El virtual screening en base a CNN puede ser una gran herramienta para la predicción en este caso de nuevos fármacos, aunque tiene algunas limitantes debido a que existen 157.530 proteínas disponibles en el banco de datos de proteínas y solo 634 asociadas a fármacos, por lo cual el muestreo es sumamente pequeño contra la basta evidencia de proteínas.
- El reposicionamiento de fármacos es una estrategia importante a la hora de acortar tiempos frente a una problemática que requieren inmediatez para encontrar su solución. Sin embargo, en muchos casos impide el descubrimiento de nuevos y mejores posibles fármacos.

Como trabajo a futuro se propone realizar dinámica molecular dirigida (SMD) con tal de caracterizar el mecanismo de acción y así de esta manera ser capaces de evidenciar el comportamiento del trasportador y de esta manera dar una solución mejorada a la problemática del TOC, que afecta a cada vez más personas.

REFERENCIAS

1. Alonso, P., Cuadras, D., Gabriëls, L., Denys, D., Goodman, W., Greenberg, B. D., ... & Nuttin, B. (2015). Deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis of treatment outcome and predictors of response. *PloS one*, 10(7), e0133591.
2. Amara, S. G., & Fontana, A. C. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry international*, 41(5), 313-318.
3. Aoyama, K., Suh, S. W., Hamby, A. M., Liu, J., Chan, W. Y., Chen, Y., & Swanson, R. A. (2006). Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature neuroscience*, 9(1), 119.
4. Arnold, P. D., Sicard, T., Burroughs, E., Richter, M. A., & Kennedy, J. L. (2006). Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*, 63(7), 769-776.
5. Bendahan, A., Armon, A., Madani, N., Kavanaugh, M. P., & Kanner, B. I. (2000). Arginine-447 plays a pivotal role in substrate interactions in a neuronal glutamate transporter. *Journal of Biological Chemistry*.
6. Bjørn-Yoshimoto, W. E., & Underhill, S. M. (2016). The importance of the excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3). *Neurochemistry international*, 98, 4-18.
7. Breyer, A., Elstner, M., Gillissen, T., Weiser, D., & Elstner, E. (2007). Glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells is attenuated by extracts from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Phytomedicine*, 14(4), 250-255.
8. Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *Journal of neurochemistry*, 84(6), 1332-1339.
9. Delgado-Acevedo, C., Estay, S. F., Radke, A., Sengupta, A., Escobar, A. P., Henríquez-Belmar, F., ... & Cho, A. (2018). Behavioral and synaptic alterations relevant to obsessive-compulsive disorder in mice with increased EAAT3 expression. *Neuropsychopharmacology*, 1.
10. Diamond, J. S. (2001). Neuronal glutamate transporters limit activation of NMDA receptors by neurotransmitter spillover on CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 21(21), 8328-8338.
11. Dickel, D. E., Veenstra-VanderWeele, J., Cox, N. J., Wu, X., Fischer, D. J., Van Etten-Lee, M., ... & Hanna, G. L. (2006). Association testing of the positional and functional candidate gene SLC1A1/EAAC1 in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Archives of general psychiatry*, 63(7), 778-785.
12. Dougherty, D. D., Rauch, S. L., & Jenike, M. A. (2004). Pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. *Journal of clinical psychology*, 60(11), 1195-1202.
13. Edition, F., & American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Arlington: American Psychiatric Publishing.
14. Fukushima, K. (1980). Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position. *Biological cybernetics*, 36(4), 193-202.
15. Furuta, A., Martin, L. J., Lin, C. L., Dykes-Hoberg, M., & Rothstein, J. D. (1997). Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience*, 81(4), 1031-1042.

16. González, L. F., Henríquez-Belmar, F., Delgado-Acevedo, C., Cisternas-Olmedo, M., Arriagada, G., Sotomayor-Zárate, R., ... & Moya, P. R. (2017). Neurochemical and behavioral characterization of neuronal glutamate transporter EAAT3 heterozygous mice. *Biological research*, 50(1), 1-9.
17. Grewer, C., Watzke, N., Wiessner, M., & Rauen, T. (2000). Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(17), 9706-9711.
18. Hanna, G. L., Veenstra-VanderWeele, J., Cox, N. J., Boehnke, M., Himle, J. A., Curtis, G. C., ... & Cook Jr, E. H. (2002). Genome-wide linkage analysis of families with obsessive-compulsive disorder ascertained through pediatric probands. *American journal of medical genetics*, 114(5), 541-552.
19. He, Y., Janssen, W. G., Rothstein, J. D., & Morrison, J. H. (2000). Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 418(3), 255-269.
20. Heyman, I., Fombonne, E., Simmons, H., Ford, T., Meltzer, H., & Goodman, R. (2001). Prevalence of obsessive-compulsive disorder in the British nationwide survey of child mental health. *The British Journal of Psychiatry*, 179(4), 324-329.
21. Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y. H., Follin-Arbelet, V. V., Grutle, N. J., Mylonakou, M. N., ... & Lehre, K. P. (2012). The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *Journal of Neuroscience*, 32(17), 6000-6013.
22. Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y. H., Follin-Arbelet, V. V., Grutle, N. J., Mylonakou, M. N., ... & Lehre, K. P. (2012). The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *Journal of Neuroscience*, 32(17), 6000-6013.
23. Insel, T. R., Murphy, D. L., Cohen, R. M., Alterman, I., Kilts, C., & Linnoila, M. (1983). Obsessive-compulsive disorder: a double-blind trial of clomipramine and clorgyline. *Archives of General Psychiatry*, 40(6), 605-612.
24. Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., & Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry*, 62(6), 593-602.
25. Koran, L. M., Hanna, G. L., Hollander, E., Nestadt, G., Simpson, H. B., & American Psychiatric Association. (2007). Practice guideline for the treatment of patients with obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*, 164(7 Suppl), 5-53.
26. Leon, A. C., Olfson, M., Broadhead, W. E., Barrett, J. E., Blacklow, R. S., Keller, M. B., ... & Weissman, M. M. (1995). Prevalence of mental disorders in primary care: implications for screening. *Archives of Family Medicine*, 4(10), 857.
27. Mataix-Cols, D., Rauch, S. L., Baer, L., Eisen, J. L., Shera, D. M., Goodman, W. K., ... & Jenike, M. A. (2002). Symptom stability in adult obsessive-compulsive disorder: data from a naturalistic two-year follow-up study. *American Journal of Psychiatry*, 159(2), 263-268.
28. Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1007S-1015S.
29. Menzies, L., Chamberlain, S. R., Laird, A. R., Thelen, S. M., Sahakian, B. J., & Bullmore, E. T. (2008). Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-

- compulsive disorder: the orbitofronto-striatal model revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(3), 525-549.
30. Mohamad Arip, A. A., Sharip, S., & Md Rosli, A. N. (2018). Islamic integrated exposure response therapy for mental pollution subtype of contamination obsessive-compulsive disorder: a case report and literature review. *Mental Health, Religion & Culture*, 1-9.
 31. Nieoullon, A., Canolle, B., Masméjean, F., Guillet, B., Pisano, P., & Lortet, S. (2006). The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?. *Journal of neurochemistry*, 98(4), 1007-1018.
 32. Ortiz, A. E., Morer, A., Moreno, E., Plana, M. T., Cordovilla, C., & Lázaro, L. (2016). Clinical significance of psychiatric comorbidity in children and adolescents with obsessive–compulsive disorder: subtyping a complex disorder. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 266(3), 199-208.
 33. Padhy, B. M., & Gupta, Y. K. (2011). Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *Journal of postgraduate medicine*, 57(2), 153.
 34. Pauls, D. L. (2010). The genetics of obsessive-compulsive disorder: a review. *Dialogues in clinical neuroscience*, 12(2), 149.
 35. Peghini, P., Janzen, J., & Stoffel, W. (1997). Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *The EMBO journal*, 16(13), 3822-3832.
 36. Pereira, C. F., & de Oliveira, C. R. (2000). Oxidative glutamate toxicity involves mitochondrial dysfunction and perturbation of intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Neuroscience research*, 37(3), 227-236.
 37. Pina-Crespo, J. C., Sanz-Blasco, S., & Lipton, S. A. (2014). Concept of excitotoxicity via glutamate receptors. In *Handbook of Neurotoxicity* (pp. 1015-1038). Springer, New York, NY.
 38. Pittenger, C. (2015). Glutamate modulators in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric annals*, 45(6), 308-315.
 39. Radua, J., & Mataix-Cols, D. (2009). Voxel-wise meta-analysis of grey matter changes in obsessive–compulsive disorder. *The British Journal of Psychiatry*, 195(5), 393-402.
 40. Ramos-Cerqueira, A. T. D. A., Torres, A. R., Torresan, R. C., Negreiros, A. P. M., & Vitorino, C. N. (2008). Emotional burden in caregivers of patients with obsessive-compulsive disorder. *Depression and anxiety*, 25(12), 1020-1027.
 41. Reyes, N., Ginter, C., & Boudker, O. (2009). Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*, 462(7275), 880.
 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. Sagara, J. I., Miura, K., & Bannai, S. (1993). Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *Journal of neurochemistry*, 61(5), 1672-1676.
 44. Scimemi, A., Fine, A., Kullmann, D. M., & Rusakov, D. A. (2004). NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4767-4777.
 45. Slotboom, D. J., Lolkema, J. S., & Konings, W. N. (1996). Membrane topology of the C-terminal half of the neuronal, glial, and bacterial glutamate transporter family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(49), 31317-31321.
 46. Soomro, G. M. (2012). Obsessive compulsive disorder. *BMJ clinical evidence*, 2012.

47. Soomro, G. M., Altman, D. G., Rajagopal, S., & Browne, M. O. (2008). Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) versus placebo for obsessive compulsive disorder (OCD). *Cochrane database of systematic reviews*, (1).
48. Starck, G., Ljungberg, M., Nilsson, M., Jönsson, L., Lundberg, S., Ivarsson, T., ... & Carlsson, M. L. (2008). A 1 H magnetic resonance spectroscopy study in adults with obsessive compulsive disorder: relationship between metabolite concentrations and symptom severity. *Journal of Neural Transmission*, 115(7), 1051.
49. Stewart, S. E., Fagerness, J. A., Platko, J., Smoller, J. W., Scharf, J. M., Illmann, C., ... & Jenike, M. A. (2007). Association of the SLC1A1 glutamate transporter gene and obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144(8), 1027-1033.
50. Tambs, K., Czajkowsky, N., Neale, M. C., Reichborn-Kjennerud, T., Aggen, S. H., Harris, J. R., & Kendler, K. S. (2009). Structure of genetic and environmental risk factors for dimensional representations of DSM–IV anxiety disorders. *The British Journal of Psychiatry*, 195(4), 301-307.
51. van Grootheest, D. S., Cath, D. C., Beekman, A. T., & Boomsma, D. I. (2005). Twin studies on obsessive–compulsive disorder: a review. *Twin Research and Human Genetics*, 8(5), 450-458.