

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



MECANISMO DE INTERACCIÓN ENTRE LA (3S)-3-AMINO-1-HIDROXI-3,4-DIHIIDROQUINOLIN-2-(1H)-ONA Y LA QUINURENINA AMINOTRANSFERASA I (KAT I), POR MECÁNICA MOLECULAR

Tesis presentada por la **Bachiller Rosado Espinoza Ximena Victoria** para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Dr. Gómez Valdez Badhin

*Arequipa – Perú
2018*

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 16009644
N° Trámite en Fac. 178-2016
Fecha Recop. Fac. 17-03-2016

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: ROSADO ESPINOZA, Ximena Victoria

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DETERMINACION DEL MECANISMO DE INTERACCION FARMACO RECEPTOR ENTRE LA (3S) -AMINO-1-HIDROXI-3,4-DIHIIDROQUINOLIN-2-(1H)-ONA Y LA QUINURENINA AMINO TRANSFERASA I (KAT I), PARA EVALUAR EL POTENCIAL MECANISMO DE REACCION EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA"

DICTAMINADORES: 1) Dr. Jaime Cárdenas García 2) Dr. José Villanueva Salas

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "DETERMINACION DEL MECANISMO DE INTERACCION FARMACO RECEPTOR ENTRE LA (3S) -AMINO-1-HIDROXI-3,4-DIHIIDROQUINOLIN-2-(1H)-ONA Y LA QUINURENINA AMINO TRANSFERASA I (KAT I), MEDIANTE GEMM, PARA EVALUAR EL POTENCIAL MECANISMO DE REACCION EN EL TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA" después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente:

FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 1/4/16

ASESOR: Dr. Badán Gómez Valdez

DICTAMEN ASESORÍA: Habiendo revisado el manuscrito y culminado la investigación, pongo a disposición de los jurados el borrador de tesis: Determinación, mediante mecánica molecular, del mecanismo de interacción fármaco receptor entre la (3S)-3-amino-4-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)ona y la Quinurenina Amino transferasa I (KAT I), para evaluar el potencial mecanismo de reacción en el tratamiento de la esquizofrenia.
Ante su despacho,

FIRMA FECHA 11-12-17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- | | |
|------------------------------|------------------------------------|
| 1) Dr. José Villanueva Salas | 3) Mgster Jaime Barreda del Carpio |
| 2) Dr. Jaime Cárdenas García | |

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis titulado: "DETERMINACION, MEDIANTE MECANICA MOLECULAR DEL MECANISMO DE INTERACCION FARMACO RECEPTOR ENTRE (3S)-3-AMINO-1-HIDROXI-3,4-DIHIIDROQUINOLIN-2-(1H)-ONA Y LA QUINURENINA AMINOTRANSFERASA I (KAT I), PARA EVALUAR EL POTENCIAL MECANISMO DE REACCION EN EL TRATAMIENTO DE ESQUIZOFRENIA" y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente:

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 16/01/18 HORA 12.00 LOCAL SUM C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA 02/01/18

Dedicatoria

Quiero dedicar y agradecer esta lucha a Dios, porque Él es el que me mantiene en pie, aunque el mundo se venga encima. También quiero dedicarla y agradecer a todos mis seres queridos, que siempre estuvieron apoyándome, dándome consejos, levantando mi ánimo, dispuestos a entrar en la batalla si era necesario.

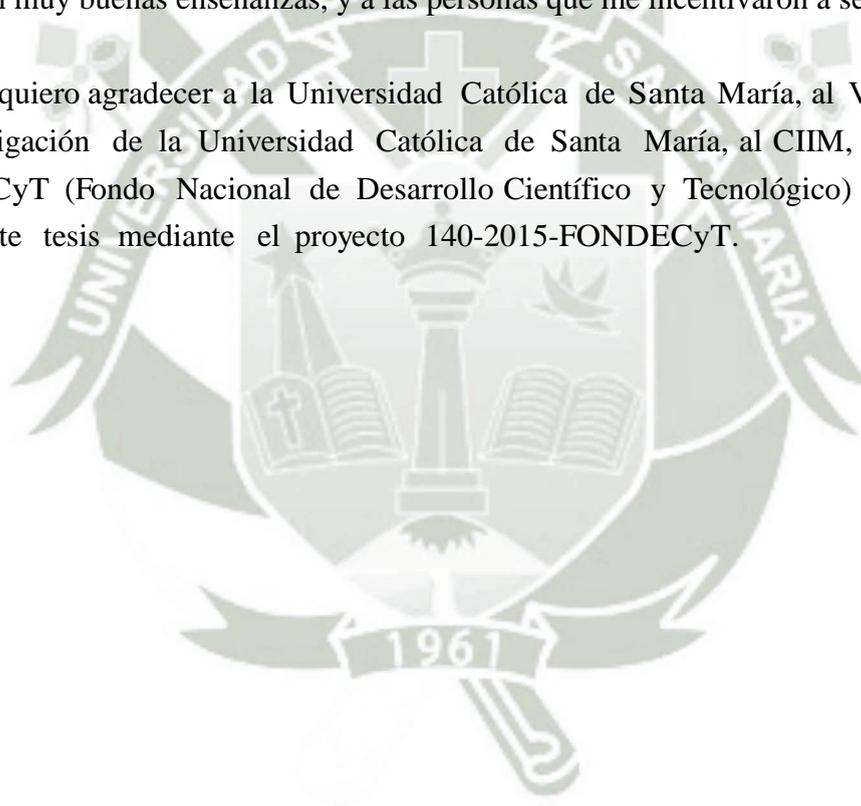
También quiero dedicarla a mis abuelitos, Nelly y Godo, y a mi mamá Vicky, porque son uno de mis principales motivos para seguir adelante.



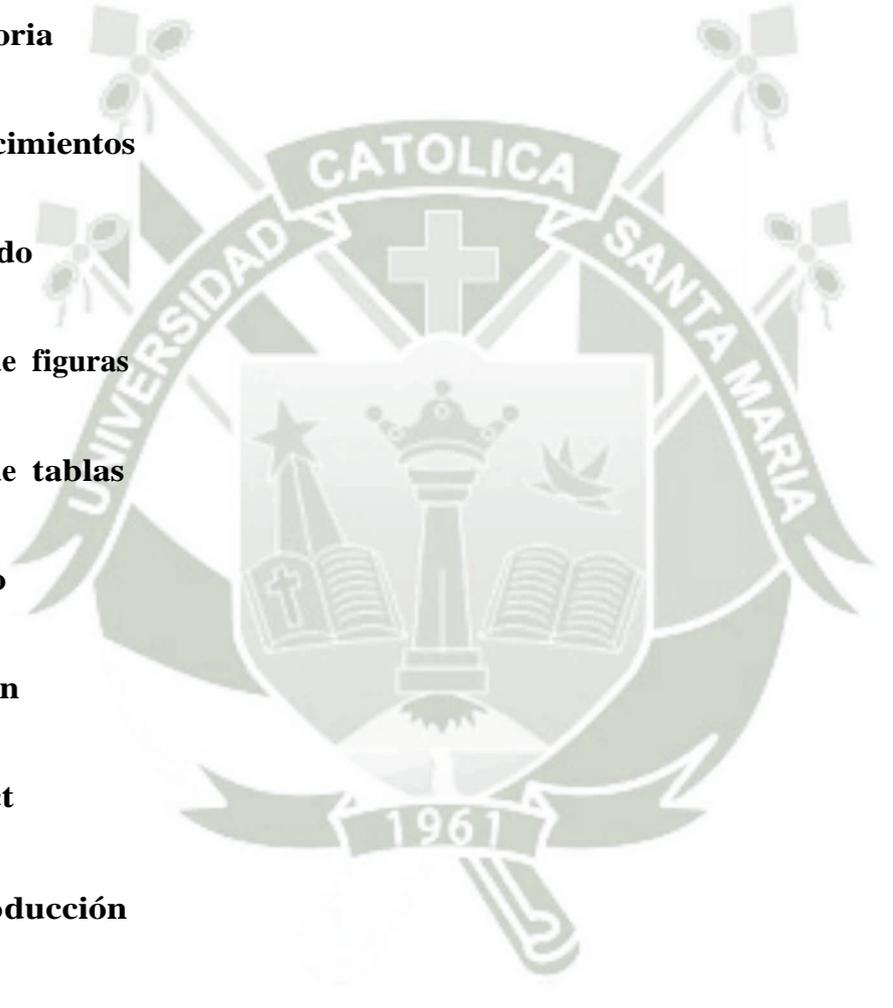
Agradecimientos

Quiero agradecerle a la Virgen María, a toda mi familia, en especial a mis abuelitos, a mi mamá, a mi papá y a mis tíos Alex y Beto; también a todos mis amigos, en especial a Lili, Pao, Heillen, Mafer Loo, JuanCarlos y Rodrigo; a los tesisistas del CIMM (2016-2017), en especial a Carla y a Miriam Q.; también a los profesores de mi colegio y universidad que me dieron muy buenas enseñanzas, y a las personas que me incentivaron a seguir adelante.

También quiero agradecer a la Universidad Católica de Santa María, al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, al CIIM, al Programa FONDECyT (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico) que financió la presente tesis mediante el proyecto 140-2015-FONDECyT.



Contenido



| | |
|------------------------------|-------------|
| Dedicatoria | I |
| Agradecimientos | II |
| Contenido | I |
| Índice de figuras | V |
| Índice de tablas | VII |
| Glosario | VIII |
| Resumen | XII |
| Abstract | XIII |
| 1. Introducción | XIV |
| Objetivos | XVI |
| 2. Marco Teórico | 1 |
| 2.1. Esquizofrenia | 1 |
| 2.1.1. Definición | 1 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2. Historia | 3 |
| 2.1.3. Fisiopatología | 5 |
| 2.2. Hipótesis Glutamatérgica | 9 |
| 2.2.1. Glutamato | 11 |
| 2.2.2. Receptores Glutamatérgicos | 12 |
| 2.2.3. Receptor NMDA | 13 |
| 2.3. Ácido Quinurénico (KYNA) | 16 |
| 2.4. Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I) | 20 |
| 2.4.1. Quinurenina Aminotransferasa (KAT) | 20 |
| 2.4.2. Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I) | 21 |
| 2.4.3. Formación de KYNA mediada por KAT | 22 |
| 2.4.4. Inhibición de KAT I | 25 |
| 2.5. Tratamiento de la Esquizofrenia | 26 |
| 2.6. Fármaco (3S) - amino - 1 - hidroxí - 3,4 - dihidroquinolin - 2(1H) - ona | 29 |
| 2.7. La Bioinformática | 31 |
| 2.7.1. Definición | 31 |
| 2.7.2. Bioinformática Estructural | 31 |
| Bases de la Bioinformática Estructural | 33 |
| 2.8. Mecánica Cuántica | 34 |
| 2.8.1. Cálculos de Mecánica Cuántica | 35 |
| Cálculos <i>Ab Initio</i> | 35 |
| Cálculos Semiempíricos | 36 |
| 2.8.2. La Teoría del Funcional de la Densidad | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8.3. Aplicaciones | 37 |
| Set de Bases | 38 |
| Modelo teórico | 39 |
| Análisis Poblacional de Hirshfeld | 39 |
| 2.9. Mecánica Molecular | 40 |
| 2.9.1. Campos de Fuerza | 41 |
| 2.9.2. Simulación Molecular | 42 |
| Minimización | 43 |
| Dinámica | 43 |
| Análisis de Trayectoria - RMSD | 44 |
| 2.9.3. <i>Docking</i> Molecular | 45 |
| 3. Metodología | 46 |
| 3.1. Materiales | 46 |
| 3.1.1. Equipos | 46 |
| 3.1.2. Software Computacionales | 46 |
| 3.1.3. Servidores en Internet | 47 |
| 3.2. Metodología | 48 |
| 3.2.1. Optimización del Fármaco | 48 |
| 3.2.2. Modelamiento Estructural de KAT I | 49 |
| 3.2.3. Acoplamiento del Fármaco con el Receptor | 51 |
| 3.2.4. Evaluación de las Propiedades | 52 |
| 4. Resultados y Discusión | 53 |
| 4.1. Optimización del Fármaco | 53 |

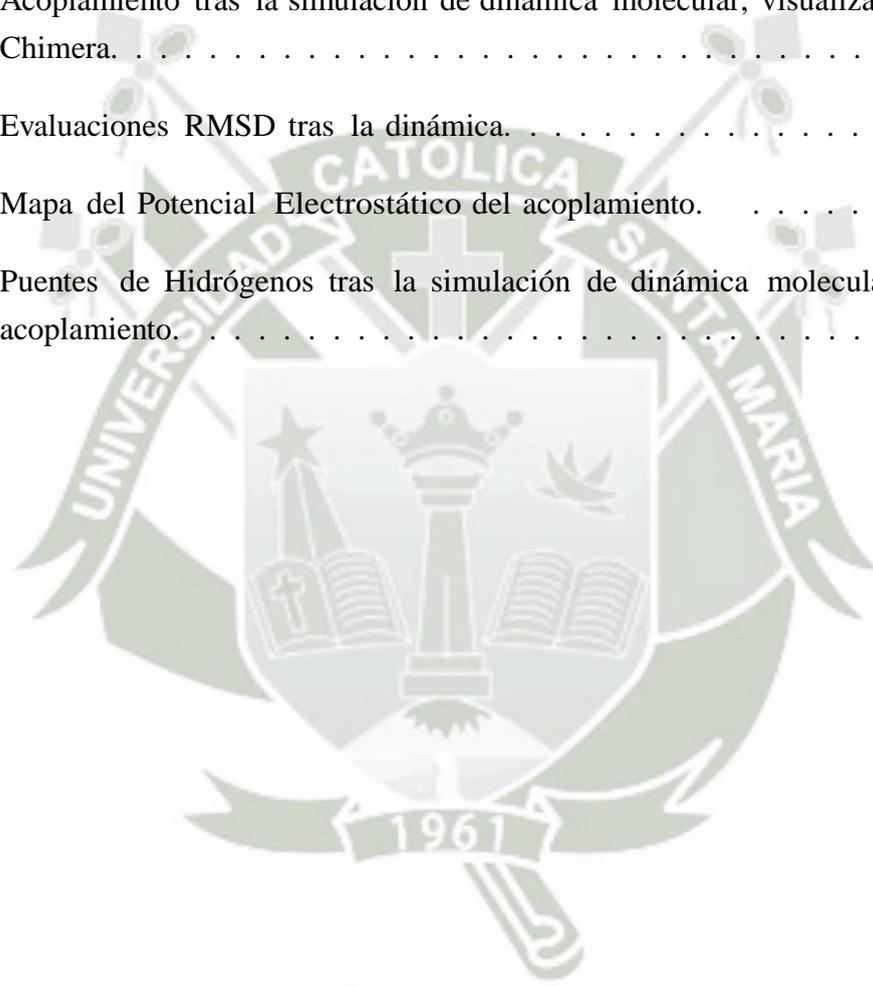
| | |
|---|-----------|
| 4.2. Modelamiento Estructural de KAT I | 58 |
| 4.3. Acoplamiento del Fármaco con el Receptor | 65 |
| 4.4. Evaluación de las Propiedades | 69 |
| Conclusiones | 71 |
| Recomendaciones | 72 |
| Referencias Bibliográficas | 73 |



Índice de figuras

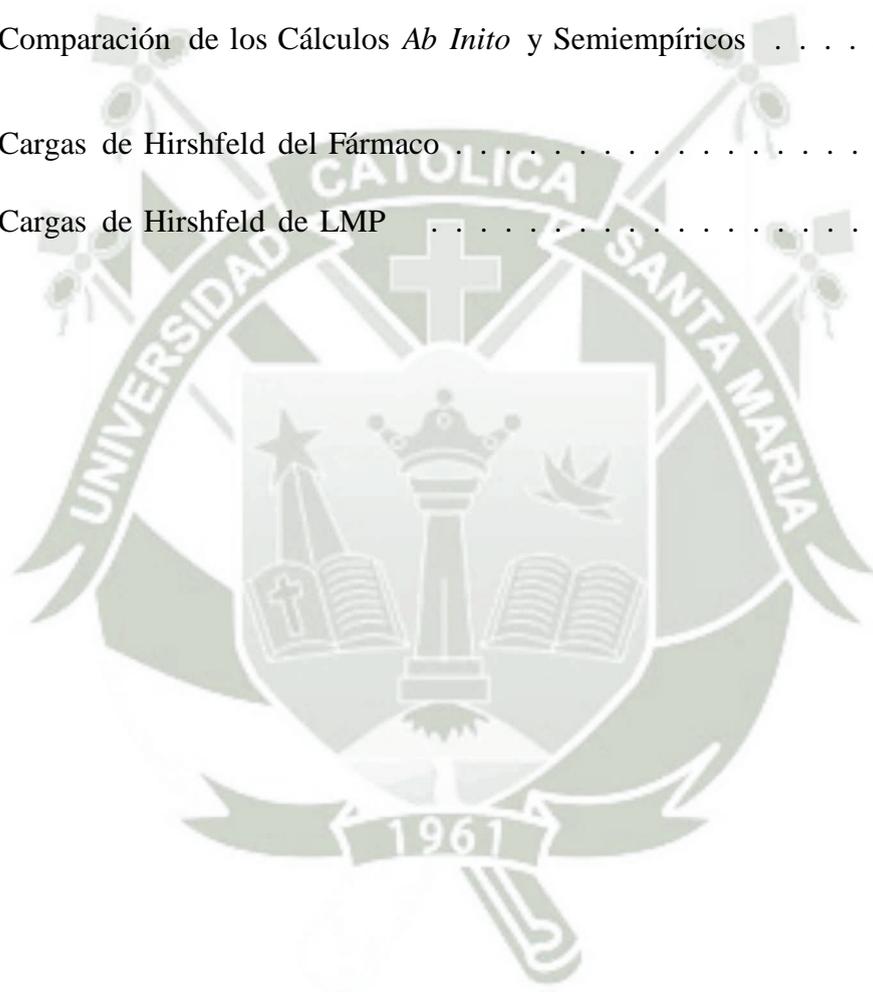
| | |
|---|----|
| 2.1. Activación del receptor NMDA | 15 |
| 2.2. La vía de la Quinurenina | 19 |
| 2.3. Formación de KYNA, mediada por KAT | 23 |
| 4.1. Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona visualizado en GaussView. | 53 |
| 4.2. Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona tras la minimización. | 55 |
| 4.3. Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona tras la dinámica. | 56 |
| 4.4. Evaluación RMSD del fármaco tras la dinámica. | 56 |
| 4.5. Estructura del fármaco, potencial electrostático y densidad total de cargas del mismo. | 57 |
| 4.6. Estructuras secundarias de la KAT-I visualizados en Chimera. | 58 |
| 4.7. Archivo tipo fasta de la 4wlh. | 59 |
| 4.8. KAT-I completa unida a su cofactor. | 60 |
| 4.9. KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera | 60 |
| 4.10. KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera tras la minimización. | 62 |
| 4.11. KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera tras la dinámica | 63 |

| | |
|---|----|
| 4.12. Evaluaciones RMSD y RMSF tras la dinámica. | 63 |
| 4.13. Diagrama de la evaluación Ramachandran. | 64 |
| 4.14. Gráfico de la evaluación DSSP. | 65 |
| 4.15. Acoplamiento de la enzima KAT-I unida al cofactor (PLP) y el fármaco visualizado en Chimera. | 66 |
| 4.16. Acoplamiento tras la minimización, visualizado en Chimera. | 66 |
| 4.17. Acoplamiento tras la simulación de dinámica molecular, visualizado en Chimera. | 67 |
| 4.18. Evaluaciones RMSD tras la dinámica. | 67 |
| 4.19. Mapa del Potencial Electrostático del acoplamiento. | 69 |
| 4.20. Puentes de Hidrógenos tras la simulación de dinámica molecular del acoplamiento. | 70 |



Índice de tablas

| | |
|--|----|
| 2.1. Comparación de los Cálculos <i>Ab Inito</i> y Semiempíricos | 36 |
| 4.1. Cargas de Hirshfeld del Fármaco | 54 |
| 4.2. Cargas de Hirshfeld de LMP | 61 |



Glosario

1. 3-HK = 3-hidroxiquinurenina
2. 3-HANA = Ácido 3-hidroxiantranílico
3. 3-HAO = 3-hidroxiantranilato-3,4-dioxigenasa
4. α -7 nAChRs = Receptor Nicotínico de Acetilcolina α -7
5. AA = Ácido Antranílico
6. ACh = Acetilcolina
7. ACMS = 2-amino-3-carboximucónico semialdehido
8. ADA = 2-aminoadipato aminotransferasa
9. AGP = Antipsicóticos de Primera Generación
10. AMPA = α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol Ácido Propiónico
11. Anti-DA = Anti-Dopamina
12. ARNm = ARN mensajero
13. ASAT = Aspartato Animotransferasa
14. ASG/ SGA = Antipsicóticos de Segunda Generación
15. BBB = Barrera Hematoencefálica
16. BDNF = Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
17. CA 1 = Primera región en el circuito del hipocampo
18. CCBL/ CCBL 2 = cisteína-S-conjugado β -liasa 1/cisteína-S-conjugado β -liasa 2
19. COMT = catecol-O-metiltransferasa
20. CPU = Unidad Central de Procesamiento
21. DA = Dopamina
22. DA D2/ D2 = Receptor de dopamina relacionado con un efecto inhibitor
23. DFT = Teoría del Funcional de la Densidad

24. DISC = Complejo de señalización de inducción de muerte
25. DM = Dinámica Molecular
26. DSM-V = Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales- Quinta Edición
27. DZ/ TZ/ QZ/ PZ o 5Z = Set de bases tipo Doble Z/ Triple Z/ Cuádruple Z/ Quintuple Z
28. EMA = Agencia Europea de Medicamentos
29. ErbB = Familia de proteínas relacionadas al receptor del factor de crecimiento epidérmico
30. FDA = Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
31. FF = Funciones de Fukui
32. GABA = Ácido γ -aminobutírico
33. GI = Gastrointestinal
34. Gln = Glutamina
35. Glu = Glutamato
36. GluN/ NR/ GRIN = Subunidades del Receptor NMDA
37. Gly T = Transportador de Glicina
38. GMS = Sitio Modulado por Glicina
39. GR1A1 = Receptor de Glutamato 1
40. GRM3 = Receptor Metabotrópico de Glutamato 3
41. GTK = Glutamina transaminasa K
42. GTO = Orbitales de Tipo Gaussiano
43. GWAS = Asociación para el Estudio de Genomas Completos
44. HF = Hartree Fock
45. HPA = Análisis Poblacional de Hirshfeld
46. ICD-10 = Clasificación Internacional de Enfermedades - Décima Revisión

47. IDO1- IDO2 = indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 / indoleamina 2,3-dioxigenasa 2
48. iGluRs/ iGlu = Receptores Glutamatérgicos Ionotrópicos
49. IL 6, IL 8, IL10 = Interleucina 6, Interleucina 8, Interleucina 10
50. KAT = Quinurenina Aminotransferasa
51. KP = Vía de la Quinurenina
52. KMO = Quinurenina 3-monooxigenasa
53. KYN = Quinurenina
54. KYNU = Quinureninasa
55. LAT = Grandes Transportadores de Aminoácidos Neutros
56. LTD = Depresión a Largo Plazo
57. LTP = Potenciación a Largo Plazo
58. MATRICS = Medición y Tratamiento para Mejorar la Conciencia en la Esquizofrenia
59. mGluRs/ mGlu = Receptores Glutamatérgicos Metabotrópicos
60. MK-801 = Dizocilpina
61. MM = Mecánica Molecular
62. MPA = Análisis Poblacional de Mulliken
63. nAChRs = Receptores Nicotínicos Acetilcolina
64. NMDA = Receptor N-metil-D-aspartato
65. OMS = Organización Mundial de la Salud
66. PCP = Fenilciclidina
67. PF-04859989 = Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona
68. Phe = Fenilalanina
69. PLP = Piridoxal-5-fosfato
70. PMP = Fosfato de piridoxamina

71. Psd-95 = Proteína de la Densidad Postsináptica 95
72. QM = Mecánica Cuántica
73. QPRT = Quinolinato fosforribosil transferasa
74. QUIN = Ácido quinolínico
75. RMN = Resonancia Magnética Nuclear
76. RMSD = Cálculo de las Desviaciones Cuadráticas Medias
77. RMSF = Cálculo de la Fluctuación Media
78. SNC = Sistema Nervioso Central
79. SNPC = Sustancia Negra en la Pars Compacta
80. SRR = Serina Racemasa
81. STO = Orbitales de Tipo Slater
82. TDO2 = Triptófano 2,3-dioxigenasa
83. TRP = Triptófano
84. TRS = Esquizofrenia Resistente al Tratamiento
85. TZVP = Base tipo Pople con triple zeta en los electrones de valencia.

Resumen

En la presente investigación, se ha querido estudiar fenómenos relacionados a la enfermedad de la esquizofrenia, la cual afecta y afectará a un buen número de personas. Es así que se analizó la interacción de la KAT I unida a su cofactor PLP, y un fármaco modelo. Hemos obtenido las estructuras disponibles en la literatura para la KAT I, mediante un proceso de completado de la estructura secundaria desde su información de la estructura primaria de los restos aminoacídicos del sistema. Se obtuvo las estructuras en el equilibrio del fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona y la enzima KAT I (unida al cofactor), así como el sistema acoplado. Se analizó el RMSD, RMSF, Diagrama de Ramachandran, y en algún caso la naturaleza de los puentes de hidrógeno, y la conservación de la estructura secundaria durante el proceso de la dinámica molecular en toda la trayectoria. El proceso de acoplamiento fue identificado mediante un acoplamiento *Docking*, para su posterior estabilización mediante una simulación de dinámica molecular del mismo, logrando determinar un mínimo en la hipersuperficie de potencial para el sistema interactuante de la enzima KAT I (unida a su cofactor), el cual se adhiere al fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona, lo que sugiere un proceso de inhibición.

Palabras clave: Esquizofrenia, bioinformática.

Abstract

In the present investigation, we aimed to study events related to schizophrenia, which affects and will affect a considerable number of people. Thus, we analyzed the interaction between KAT I, linked to its cofactor PLP, with a model drug. We have obtained the available structures in literature for KAT I, through a process of completing secondary structure from the information of the primary structure of the amino acid residues of the system. The structures of the drug (3S)-amino-1-hydroxy-3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one and the enzyme KAT I (attached to the cofactor), as well as the coupled system, were obtained in the equilibrium. We analyzed the RMSD, RMSF, Ramachandran diagram, and in some cases the nature of the hydrogen bridges and the conservation of the secondary structure during the process of molecular dynamics throughout the trajectory. The coupling process was identified by a *Docking*, to its posterior stabilization by a simulation of molecular dynamics, obtaining a minimum in the hypersurface of potential for the KAT I enzyme interacting system (attached to its cofactor), which adheres to the drug (3S) -amino-1-hydroxy-3,4-dihydroquinolin-2 (1H) -one, what suggests a process of inhibition.

Key words: Schizophrenia, bioinformatics.

Introducción

La esquizofrenia es una devastadora enfermedad mental, ¹ que afecta de sobremana al paciente, ya que su vida entera se reorganiza en torno a esta y se genera un efecto negativo en el concepto propio del individuo. ² La etiología de la enfermedad permanece en gran medida desconocida, ³ sin embargo existen numerosas hipótesis que intentan explicarla. Una de ellas es la hipótesis glutamatérgica, que se enfoca en los disturbios de las vías glutamatérgicas y en la discapacidad en la señalización de receptores de glutamato, como el NMDAR (receptor N-metil-D-aspartato). ⁴ El ácido quinurénico (KYNA), es un antagonista endógeno de glutamato, con una acción preferencial sobre el sitio-glicina del NMDAR. Además, se han encontrado niveles elevados de KYNA en el fluido cerebroespinal de pacientes con esquizofrenia. ¹ KYNA es producida a partir de quinurenina (KYN), mediante las enzimas quinurenina aminotransferasas (KATs) ⁵. Cuatro isoenzimas (KAT I, II, III, IV) están involucradas en la síntesis de KYNA en el sistema nervioso central de mamíferos, ⁶ siendo KAT II la responsable de la mayor producción de KYNA cerebral ⁵, sin embargo KAT I juega un importante papel, ya que proporciona una expresión compensatoria junto a KAT III. ⁷ Es así, que KYNA se ha convertido en un candidato valioso en el descubrimiento de nuevos fármacos, ⁸ y KAT en un objetivo enzimático clave en el tratamiento de la esquizofrenia. ⁹ Desafortunadamente inhibidores sistémicos de KAT II son escasos, pero el fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona (PF-04859989) es un potente inhibidor sistémico de KAT II con penetración en el cerebro, ¹⁰ lo que lo hace muy prometedor. Sin embargo, faltan estudios sobre la interacción entre el fármaco y KAT I.

El descubrimiento de un nuevo fármaco podría tomar 13 años y un costo de US \$1778 millones, además una de las principales razones o fallas en el descubrimiento

y desarrollo de nuevos fármacos probablemente sea el uso de modelos animales para predecir la eficacia y la seguridad en seres humanos. Por lo tanto, la aplicación de la investigación bioinformática tiene el potencial de dar lugar a un cambio fundamental mediante el aprovechamiento de los datos de origen humano para superar algunas de las limitaciones inherentes asociadas con el uso de modelos animales,¹¹ y reducir los costos o el tiempo de lanzamiento en las diferentes etapas del descubrimiento y desarrollo de fármacos.



Capítulo 1

Objetivos

Objetivos Generales

- Determinar, el mecanismo de interacción entre la (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona y la Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I), por Mecánica Molecular.

Objetivos Específicos

- Optimizar el fármaco (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona.
- Modelar estructuralmente la Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I).
- Acoplar el fármaco (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona con el receptor Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I).
- Evaluar las propiedades del acoplamiento.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Esquizofrenia

2.1.1. Definición

La esquizofrenia es un complejo desorden neuropsiquiátrico,⁷ que causa diversas discapacidades y afecta el desempeño de capacidades sociales en amplios ámbitos.¹² A nivel mundial, este desorden crónico, tiene un punto de prevalencia estimado entre 0.5 % - 1.0 %, ¹³ es decir, afecta entre 26 a 45 millones de personas en el mundo.¹⁴ En el Perú, más de 280 mil personas sufren este trastorno, de las cuales, el 62 % cuenta con un diagnóstico definido y recibe tratamiento. Sin embargo, el porcentaje restante no acude a los servicios de salud y/o no tiene las facilidades para ser tratado por un médico psiquiatra.¹⁵

Este desorden mental usualmente se inicia en la vida adulta temprana o en un estado intermedio de esta,³ resultando en importantes discapacidades físicas, psicológicas, sociales y mortalidad prematura.¹⁴ Además es heredable en más del 80 % de casos, y presenta un riesgo de recurrencia mayor al 50 % en gemelos monocigóticos.¹⁶

El esquema de categorización de la esquizofrenia recientemente ha obtenido mayor interés, ya que es un síndrome heterogéneo, es decir, una multitud de estados patológicos bajo la categoría englobante de esquizofrenia. Además, la concepción de esquizofrenia ha cambiado drásticamente; desde la concepción de un desorden de deterioro mental a su más reciente categorización como un único trastorno con múl-

tiples subtipos. El debate de cómo definir mejor a la esquizofrenia aún continúa; hoy en día no hay un modelo estrictamente establecido de anomalías que hayan sido identificadas como características fiables del trastorno; aunque algunas características conductuales son normalmente asociadas con la esquizofrenia, tales como desórdenes de procesos de pensamientos o cambios en la afectividad, aunque estas no se manifiestan establemente de la misma manera en todas las personas diagnosticadas con esquizofrenia. Por consiguiente, hasta que una característica estructural o conductual pueda ser confirmada como una característica determinante de la esquizofrenia, se recurre a medidas de diagnóstico anteriores.³

Es así, que se puede decir que la esquizofrenia presenta síntomas positivos (como delirios, alucinaciones, discurso desorganizado y comportamiento catatónico), síntomas negativos (como abulia o falta de motivación y aislamiento emocional)¹⁷ y afecta tanto a las funciones cognitivas básicas como a las de alto nivel.¹⁸

Ya que la esquizofrenia presenta una disfunción en los procesos perceptivos, cognitivos, emocionales, y conductuales, contribuye a una significativa carga emocional, social, y financiera; tanto para los pacientes, como para sus familias y comunidades. A través del proceso de sumergimiento del paciente en la enfermedad, el concepto propio del paciente empieza a reorganizarse enteramente alrededor de la experiencia de tener esquizofrenia, es así que la esquizofrenia es particularmente devastadora debido a su efecto negativo en el concepto propio del individuo.²

El hecho de que el paciente mejore es crucial. Tras las dos últimas décadas, el enfoque en el concepto de recuperarse de esta enfermedad ha crecido. Estudios muestran que la percepción de la recuperación de los pacientes es diferente de la percepción de los profesionales clínicos. La orientación de los profesionales clínicos respecto a la recuperación está más enfocada a los síntomas y aspectos funcionales, mientras que la orientación de los pacientes está más enfocada hacia alcanzar sus metas, el conocimiento acerca de la enfermedad mental, el contacto con otros fuera de su familia, planes de prevención de recaídas, afrontar la enfermedad mental e involucrarse en actividades de autoayuda.¹⁹

Las creencias de las causas de la esquizofrenia, están muy relacionadas entre los pacientes que la padecen, sus cuidadores y el desenvolvimiento en su proceso de mejoría. A la esquizofrenia se le atribuyen causas biológicas (desorden del cerebro debido en parte a factores hereditarios), psicosociales (causada por factores externos como condiciones económicas, factores estresantes o nivel de logros educacionales), o mágico-religiosas (originada a partir de fuerzas sobrenaturales o espirituales). Un estudio de

253 pacientes diagnosticados con esquizofrenia (basándose en el ICD-10), los cuales presentaban síntomas moderadamente severos y provenían del sur de Perú, norte de Chile y centro-oeste de Bolivia; mostró que los pacientes y sus cuidadores atribuían causas psicosociales a la enfermedad más que biológicas o mágico-religiosas.²⁰ Se sabe también que los pacientes que le atribuyen a la esquizofrenia causas biológicas, entienden mejor la naturaleza de su problema. Y si un paciente acepta las terapias y se trata con la medicación adecuada, tiene muchas probabilidades de obtener una notable mejoría.

2.1.2. Historia

Históricamente, resultados desfavorables han sido considerados como parte del concepto de esquizofrenia.²¹ Se sabe que desde hace 3000 años ya se comentaba acerca de personas que mostraban comportamiento irracional o se veían dementes, mas pocas descripciones se asemejaban a la moderna esquizofrenia de hoy, que fue registrada previamente a 1800. La hipótesis de que la esquizofrenia es una enfermedad reciente puede explicar porque descripciones de desórdenes parecidos a la esquizofrenia eran raras antes de 1800.²²

Intentos para tratar la demencia empezaron aproximadamente 200 años atrás; el tratamiento normalmente consistía en dar vueltas al paciente en un banco hasta que pierda la conciencia o lanzar a la persona en un lago de hielo. Y antes de 1800, personas con retardos mentales y personas consideradas dementes eran usualmente confinadas a prisiones o asilos.²²

Esfuerzos por entender la naturaleza de la esquizofrenia iniciaron a mitades del siglo XVIII, cuando Morel introdujo el término demencia precoz para describir un desorden mental de degeneración iniciado en la pubertad. Previo a ese entonces, condiciones de locura congénita, demencia, manía, melancolía y locura común no eran diferenciados. A finales del siglo XVIII, Emil Kraepelin observó que la demencia precoz, previamente descrita por Morel, era idéntica a condiciones de hebefrenia y catatonía, identificadas por Hecker y Kahlbaum.²² En 1899, Kraepelin sugirió que los diversos síntomas de demencia precoz reflejan una única enfermedad y predicen un curso degenerativo,²¹ describiéndola como un desorden caracterizado por un curso crónico progresivo con mínimas posibilidades de mejora clínica.²³ En 1919, Kraepelin escribió:

*“El nombre demencia precoz consiste en una serie de estados, de los cuales la característica común es una particular destrucción de las conexiones internas de la personalidad psíquica. Los efectos de este daño predominan en esferas emocionales y en la voluntad de la vida mental”.*²²

En 1911, Eugene Bleuler introdujo el nuevo término esquizofrenia, que reemplazó a demencia precoz. Traducido literalmente, esquizofrenia significa mentalidad partida, y según Bleuler la división de la personalidad era la característica principal del trastorno.²² Además él creía que la esquizofrenia no permitía una completa restitución, a pesar de tener un curso variable con mejorías en algunos casos.²¹ Posteriormente Adolph Meyer vio a los trastornos mentales como una reacción a conflictos y hábitos permanentes que conducen hacia el desglose mental. Él opinó que la esquizofrenia era el resultado natural de una historia de vida que podía haber sido trazada conjuntamente por varios factores físicos, sociales, y psicológicos en el pasado del paciente.²²

En 1960, Klesist, y en 1961, Leonhard, insistieron en que si un paciente se recupera no puede ser un posible caso de esquizofrenia, convirtiéndola así en sinónimo de una crónica y debilitante enfermedad mental. Años después, el concepto de resultados desfavorables fue desafiado por estudios de Brown (1966), Bleuler (1978) y Ciompi y Mueller (1978); quienes mostraron que resultados desfavorables eran variables y eludibles. Sus estudios al menos dieron alguna esperanza acerca de un resultado favorable frente a la esquizofrenia.²¹

En 1971, en una encuesta de seguimiento de 12 años a pacientes con esquizofrenia de primer ingreso, Murphy y Raman mostraron que el 59% de los casos no tenían síntomas al término del periodo de 12 años, iniciando así un debate mayor acerca del curso y desenlace de la esquizofrenia, y trayendo a contienda el tema de factores que influyen el curso y desenlace de esta, siendo de los más importantes, las diferencias culturales entre países.²¹

Cabe destacar, que el desarrollo de medicamentos neurolépticos a inicios de 1950 fue un hito en el tratamiento de la esquizofrenia. La farmacoterapia permitió a pacientes con esquizofrenia trabajar a un nivel más alto, sin centrarse continuamente en sus mundos internos de alucinaciones y delirios. Neurolépticos como clorpromazine y haloperidol eran ampliamente utilizados durante los años sesenta, e hicieron que administradores de hospitales públicos y psiquiatras consideren la opción de dar de alta a la comunidad de pacientes con esquizofrenia, quienes probablemente habían sido hospitalizados por décadas.²² Mientras los medicamentos neurolépticos presentaban

usualmente un impacto positivo frente a alucinaciones y delirios, en general tenían efecto pobre en la mejora de la percepción o juicio, o sobre los síntomas negativos de la esquizofrenia como la planificación deficiente, la higiene y la voluntad.²²

Por otra parte, los GWAS (estudio de asociación del genoma completo) son encuestas sistemáticas, de todo el genoma, que analizan las relaciones entre la variación genética común y el riesgo de enfermedad. Y para la esquizofrenia, se han publicado varios GWAS (O'Donovan et al., 2008; Stefansson, et al., 2009; Shi, et al. 2009; International Schizophrenia Consortium, 2009; Ikeda, et al., 2011; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium, 2011; Rietschel, et al., 2012; Irish Schizophrenia Genomics Consortium and Wellcome Trust Case Control Consortium, 2012; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, 2013; Hamshere, et al. 2013; Lee et al., 2013; Smoller, et al. 2013; Ripke et al., 2013b; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014).²⁴

La esquizofrenia continúa presentando una serie de desafíos para la neurociencia y psiquiatría, como para los sistemas del cuidado de la salud y para los pacientes y sus familias, quienes sufren esta terrible e incapacitante enfermedad. Además el mayor desarrollo en los campos de la genética y fármacos, obligan a considerar el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia.²⁵

2.1.3. Fisiopatología

Como ya se mencionó, la esquizofrenia posee una marcada heterogenicidad en sus síntomas,²⁶ presentando una psicopatología que incluye síntomas positivos, síntomas negativos, síntomas afectivos y disfunción cognitiva.²⁷

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de Desórdenes Mentales (DSM-V) los síntomas son psicosis, síntomas negativos, desorganización, comportamiento motor anormal y aunque no forman parte del criterio formal de diagnóstico para la enfermedad, síntomas de estado de ánimo incluyendo depresión y ansiedad son comunes en muchos pacientes.²⁶ Por otro lado, también se suelen presentar perturbaciones en los sistemas inmune, metabólico y endocrino.²⁸

La esquizofrenia está asociada con una baja expectativa de vida (de 25-30 años), debido a la morbilidad médica y el riesgo de suicidio, siendo la mortalidad cardiovascular la principal causa natural.²⁷ Además, se ha reportado que pacientes mayores presentan niveles más elevados de síntomas negativos,²⁶ y que el estrés psicosocial puede desencadenar el inicio de la esquizofrenia y empeorar su curso y desenlace.²⁷

Adicionalmente, durante la última década, estudios del transcriptoma de tejidos post-mortem de pacientes con esquizofrenia revelaron que cambios sinápticos, mitocondriales, inmunológicos, gamma-aminobutírico acidérgicos y oligodendrocíticos son parte del proceso de la enfermedad.²⁹

La etiología de la enfermedad aún permanece en gran medida desconocida,³ mas se han propuesto muchas hipótesis que intentan explicarla. Inicialmente, la dopamina (DA) y dos de sus receptores específicos recibieron mayor atención. Luego, el glutamato (GLU) y uno de sus receptores (NMDA) entraron en escena. Posteriormente, se sospechó de otros sistemas, como los GABAérgico, opioides, colinérgicos (o serotoninérgicos), entre otros. Respecto a la hipótesis de la DA, se propuso que los síntomas positivos se deben a una hiperactividad en la transmisión de DA, esta hipótesis se formuló debido a la eficacia de los fármacos antipsicóticos y su potencial para bloquear los receptores DA D2, y porque las moléculas potenciadoras de DA son psicogénicas. Por otra parte, hay mucha evidencia que apoya que la esquizofrenia también podría estar asociada con un defecto persistente en la transmisión glutamatérgica, involucrando a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Además, ahora se sabe que la dopamina tiene un papel modulador en el desenvolvimiento del glutamato, por lo tanto, los cambios en la función DA pueden a su vez afectar a la actividad de NMDA,³⁰ entrelazando ambas hipótesis.

Además, se ha descrito también que el bloqueo de D2 puede ser particularmente favorable para el tratamiento de los síntomas positivos; el del receptor 5 - metil-HT2 o del receptor NMDA para los síntomas negativos, y el del receptor α 7 nicotínico para los síntomas cognitivos.³¹

Por otra parte, se sabe que anormalidades presentes en el sistema el sistema neurotransmisor GABAérgico (incluyendo cambios en las subclases de las interneuronas GABAérgicas), están implicadas en la esquizofrenia.³²

Cabe mencionar que, por el grado de complejidad de la enfermedad, existen numerosas otras hipótesis y factores relacionados a la etiología de esta. Dentro de ellos encontramos:

Hipótesis Neuroinflamatoria: Hace cuarenta años, se sugirió que los procesos pro-inflamatorios podían jugar un papel clave en la fisiopatología de la esquizofrenia.³³ En la última década, se ha acumulado evidencia que acredita la importancia de la neuroinflamación en su fisiopatología, y se ha investigado como la neuroinflamación puede conectarse con las anormalidades del desarrollo neurológico en la desconectividad patológica progresiva de la materia blanca en la esquizofrenia.³⁴ Además, se

hallaron alteraciones en moléculas pro y anti-inflamatorias en el sistema nervioso central y tejidos periféricos, correlacionándolas con los síntomas de la esquizofrenia.²⁸ Los mecanismos neuroinflamatorios implicados en la esquizofrenia incluyen fallas gliales (pérdida y activación astrogliar, activación y preparación microglial) y oxidativas (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno); además se piensa que estos mecanismos resultan de la desregulación glutamatérgica (hipofunción) y dopaminérgica (hiperfunción límbica, hipofunción frontal) por varios supuestos caminos; como el incremento de la síntesis astrogliar del ácido quinurénico (un antagonista de receptor NMDA, del receptor α -7- nicotínico acetilcolina y de S100 β) y la expresión excitatoria sobre-regulada de transportadores de aminoácidos.³⁴ Un interés específico ha surgido en las microglías, debido a que las microglías desordenadas tienen una supuesta conexión con la respuesta neuroinflamatoria en la esquizofrenia. Además, ellas son el mayor recurso de citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina-6 en el sistema nervioso central. También se sabe que procesos inflamatorios en la esquizofrenia probablemente juegan un rol en la alta incidencia del síndrome metabólico en la esquizofrenia.³ Sumándose a esto, anomalías en la expresión constitutiva de citoquinas inflamatorias, tales como las interleucinas IL-6, IL-8 e IL-10, se han encontrado en el suero de pacientes esquizofrénicos.³² Además, algunas características clínicas, epidemiológicas y genéticas pueden ser compartidas entre la esquizofrenia y algunas enfermedades autoinmunes.²⁸

Hipótesis de los Neuropilos Reducidos: La hipótesis de neuropilos reducidos enfatiza que tras presentar esquizofrenia por un tiempo, la cantidad de neuropilos decrece. La reducción de neuropilos puede ser el resultado de un recorte sináptico excesivo durante el desarrollo y la maduración, o es posible que el complemento total de las sinapsis falle en desarrollarse en primera instancia, o que se haya dado un encaminamiento erróneo de axones. Además, pacientes con la enfermedad usualmente presentan cambios sinápticos en dirección de reducción, particularmente en la sinapsis glutamatérgica.³

Hipótesis de la Red Neuronal: La hipótesis de la red neuronal propone que la esquizofrenia resulta de fuertes efectos causados por una integración neuronal alterada. Esta hipótesis predice que los fármacos que restablecen el tono de la red de interacciones neuronales, son eficaces en el tratamiento de la esquizofrenia. Los trastornos neurodesarrollados asociados con una conectividad anormal, son el resultado de defectos en la poda sináptica y migración de neuronas. Además, alteraciones en la poda sináptica se deben a alteraciones genéticas heredadas en genes como *DISC1* o *dysbindin*.¹⁶

Uso de *Cannabis*: Hay evidencia que relaciona el uso de *cannabis* con la esquizofrenia, particularmente entre el uso de *cannabis* y el desarrollo de psicosis en individuos susceptibles. Gran parte de la literatura sugiere que el uso continuo de *cannabis* durante la esquizofrenia, está asociado con resultados desfavorables, incluyendo períodos más largos de hospitalización, altos índices de recaídas y menos adherencia a la medicación. Usualmente el hipocampo es estructuralmente anormal en pacientes que padecen esquizofrenia y se ha demostrado que el uso crónico de *cannabis* en individuos saludables está asociado con volúmenes más pequeños de hipocampo, amígdala y reducciones de tramos de materia blanca en la región del hipotálamo. Por otra parte, una serie de estudios proponen que el uso de *cannabis* puede estar asociado con un mejor funcionamiento cognitivo y social en la esquizofrenia.³⁵

Trauma Infantil: El trauma infantil, incluyendo tanto maltrato físico como psicológico, el abuso sexual en la infancia, la pérdida o el divorcio de los padres, el abuso de sustancias en los padres y la pobreza, aparentan ser factores de vulnerabilidad potencial para el desarrollo de la esquizofrenia en la vida posterior. Además, el trauma infantil también parece estar asociado con peores síntomas positivos, la no-remisión de síntomas positivos y la disminución de la expresión de *BDNF* (ARNm) dentro de algunas áreas del cerebro, incluyendo el hipocampo (algunos han sugerido que el déficit en el volumen del hipocampo visto dentro de la esquizofrenia puede deberse a la disminución de la expresión de *BDNF*).³⁵

Diferencias Regionales: Estudios de seguimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS), describen que pacientes que pertenecen a países en desarrollo tienen más resultados favorables que los de países desarrollados. Diferencias en el nivel de industrialización, urbanización, apoyo social, estructura familiar, expresión de emociones, modelo explicativo de la causa del trastorno, retos sociales, entre otros; han sido propuestos para explicar la diferencia del resultado. Estas diferencias observadas pueden ser mejor descritas como diferencias regionales, las cuales comprenden diferencias raciales (genéticas), ambientales y socioculturales.²³

Factores Genéticos: La esquizofrenia es heredable alrededor del 80% , sin embargo, la búsqueda de bases genéticas de este trastorno ha sido frustrante, ya que esta no distingue patología o criterio de diagnóstico, haciendo difícil relacionar cambios genéticos con discretos cambios fisiológicos o bioquímicos asociados a este. La esquizofrenia se ajusta al perfil de un trastorno complejo en el cual múltiples genes interactúan junto con la influencia del medio ambiente para producir una gama de fenotipos.¹⁶ Muchos estudios indican que dentro de los factores ambientales que interactúan con los genéticos, encontramos a factores tóxicos, el estrés o infecciones.³⁶

Alteraciones Congénitas: Algunos autores sugieren que la esquizofrenia puede ser causada, al menos en un subgrupo de pacientes, por alteraciones congénitas que tienen lugar durante el desarrollo neurológico. Estas alteraciones podrían ser el resultado de posibles factores ambientales, particularmente infecciones que se producen durante las etapas prenatales y perinatales. Evidencia epidemiológica muestra que la exposición prenatal o perinatal a diferentes agentes infecciosos, incluyendo *Toxoplasma gondii*, *Citomegalovirus*, *Chlamydia spp.*, y todos los tipos de virus del herpes humano o Influenza, se asocia a un riesgo incrementado de esquizofrenia en la adultez. Añadiendo a esto que ciertos genes asociados con la esquizofrenia, incluyendo aquellos concernientes con la neurofisiología, están íntimamente relacionados con los ciclos de vida de estos patógenos.³⁶ Hoy en día se sabe que hay una comunicación bidireccional entre el cerebro y el intestino que utiliza rutas neurales, hormonales e inmunológicas y que la disfunción de la barrera gastrointestinal (GI), la sensibilidad a antígenos de alimentos, la inflamación y el síndrome metabólico en la esquizofrenia; pueden ser influenciados por la composición de la microbiota intestinal. Lo cual se acredita ya que un subgrupo importante de pacientes se beneficia con el inicio de una dieta libre de gluten y libre de caseína, y porque antimicrobianos y probióticos tienen potencial terapéutico para reducir de la disfunción metabólica y la desregulación inmune. Además, la microbiota modula una serie de neurotrofinas y proteínas tales como el BDNF, la sinaptofisina y la PSD -95, (todos estos involucrados en el desarrollo del cerebro y la plasticidad). En la corteza y el hipocampo de animales libres de gérmenes en comparación con controles, se encontró una disminución en el BDNF, que está asociado con la neurogénesis, la plasticidad cerebral, y la expresión de la subunidad 2A del receptor NMDA (implicado en el control de la plasticidad sináptica en la función de la memoria).³⁷ Además, diversos eventos adversos gestacionales como la hipoxia fetal, complicaciones obstétricas, infecciones maternas-función inmune y estrés materno, han sido asociados con la esquizofrenia, impidiendo la búsqueda de una etiología común.¹⁶

2.2. Hipótesis Glutamatérgica

La neurotransmisión glutamatérgica juega un importante rol en la fisiopatología de la esquizofrenia. El glutamato es el aminoácido neurotransmisor más abundante en el cerebro de los mamíferos, este presenta dos tipos de receptores; metabotrópicos e ionotrópicos. La concentración extracelular de glutamato necesita ser delicadamente regulada para asegurar la neurotransmisión apropiada, puesto que cualquier fluctuación en las concentraciones extracelulares de glutamato puede conducir a una alterada

actividad de los receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato, ocasionando así subsecuentes cambios en la activación neuronal y manifestaciones conductuales.³⁸ Elevaciones en metabolitos glutamatérgicos pueden representar un marcador biológico de riesgo para esquizofrenia, puesto que se han encontrado niveles elevados de glutamato en la precomisura dorsal del núcleo caudado de una población de pacientes con el primer episodio de psicosis y estos niveles también son similarmente elevados en una muestra de pacientes considerados de riesgo ultra elevado para esquizofrenia. Asimismo, en un estudio se mostraron metabolitos glutamatérgicos incrementados en el tálamo y núcleo caudado de individuos con alto riesgo familiar de esquizofrenia.³⁹

La hipótesis glutamatérgica provee una alternativa o teoría complementaria a la hipótesis dopaminérgica en la fisiopatología de la esquizofrenia. Esta hipótesis, principalmente se enfoca en disturbios de las vías glutamatérgicas y en la discapacidad en la señalización de receptores de glutamato, como NMDARs y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs).⁴ Observaciones clínicas proponen que, la esquizofrenia es una consecuencia de la deficiente neurotransmisión excitatoria mediada por el glutamato a través de receptores NMDA.⁴⁰

Originalmente la hipótesis glutamatérgica se basó en que el abuso de fenilciclidina (PCP)⁴¹, un antagonista no competitivo del receptor NMDA⁴², producía síntomas similares a los observados en la esquizofrenia; tales como bloqueo emocional, alteraciones en la memoria de trabajo y alucinaciones auditivas.⁴¹ Estudios de 1960 muestran que la PCP y también la Ketamina, otro agente que bloquea al receptor NMDA, producen los que serían considerados como síntomas positivos, negativos y cognitivos.⁴ Lo que conllevó a sustentar la hipofunción de los receptores NMDA.⁴¹

Otros estudios muestran que el aumento de PCP, aumenta los niveles de glutamato en la corteza prefrontal,⁴¹ induce síntomas similares a los de la esquizofrenia en individuos sanos y exacerba síntomas en pacientes que la padecen.⁴² Por otra parte, bajas dosis de ketamina que no causan delirio o demencia en individuos sanos, producen un amplio rango de síntomas de esquizofrenia en estos, mientras que en aquellas personas con esquizofrenia estabilizada producen una sensibilidad incrementada a esta.⁴³

Se sabe que síntomas de la esquizofrenia usualmente emergen durante la adolescencia o adultez temprana,⁴² y que interacciones dopamina-glutamato en la corteza prefrontal maduran luego de la pubertad.⁴¹ Así también en estudios en animales se encontró que los diferentes estados de regulación de los sistemas glutamatérgicos/dopaminérgicos son importantes en el desarrollo neuronal temprano y la plasticidad sináptica durante la adolescencia y la adultez temprana. Por otra parte, actividad

dopaminérgica excesiva pueden potenciar la liberación de glutamato, lo que a su vez puede causar excitotoxicidad celular o daño dendrítico con consecuencias cruciales en el cerebro adolescente o adulto-joven.⁴⁴ Lo que nos conlleva a recordar que existen mesetas de despolarización glutamatérgica inducidas por la co-activación del receptor NMDA, el cual es regulado por D1 y esta función potenciada del receptor NMDA (glutamatérgico) dependiente de D1 (receptor dopaminérgico) en la corteza prefrontal puede ser sólo observada en animales en la etapa de post-pubertad pero no en animales en la etapa de pre-pubertad.⁴¹ Confirmando así la relación entre la esquizofrenia, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica.

En adición, neuronas glutamatérgicas corticofugales controlan neuronas monominérgicas y proveen activación directa de neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas. Asimismo, ellas inhiben a neuronas monoaminérgicas vía activación de interneuronas intermediarias GABAérgicas habilitando altamente la regulación sensitiva de monoaminas.⁴⁴ Y se evidenció también que sustancias anti-DA (dopamina) y potenciadores de la función del receptor NMDA disminuían síntomas cognitivos, emocionales y psicóticos.⁴¹ Sin embargo, dosis psicomiméticas de antagonistas de NMDA pueden favorecer el balance de la excitación sobre la inhibición, por el bloqueo de entradas excitatorias dependientes de NMDA, hacia interneuronas GABAérgicas.⁴¹

Por otro lado un reciente GWAS de esquizofrenia ha revelado más 100 genes de riesgo de efecto modesto, muchos de los cuales codifican proteínas envueltas en la transmisión glutamatérgica, particularmente relacionadas al receptor NMDA.⁴³

2.2.1. Glutamato

La neurotransmisión glutamatérgica media celularmente la plasticidad sináptica, y de procesos de memoria y aprendizaje.⁴⁵ El glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central de mamíferos, es el mayor modulador de la neuroplasticidad, y participa en la transmisión sináptica normal, potenciación a largo plazo, depresión a largo plazo, maduración neuronal, y sinaptogénesis.⁴⁰ El glutamato media aproximadamente el 70 % de la transmisión sináptica dentro del sistema nervioso central.⁴⁵ Además, es el neurotransmisor excitatorio de células piramidales y está presente en cerca del 40 % de la sinapsis cerebral, jugando un rol crucial en proyecciones corticales a diversas regiones subcorticales (hipocampo, amígdala, ganglio basal), y en proyecciones inter-corticales (entre el tálamo, medial prefrontal y cortices anterior cingular).⁴⁴

El glutamato es sintetizado en axones terminales de neuronas glutamatérgicas, a partir de α -ketoglutarato o glutamina (Gln), existiendo un balance dinámico entre el glutamato y la glutamina para mantener niveles apropiados de glutamato.⁴⁴ Por otra parte, el glutamato ha sido indicado como el factor primario responsable de la excito-toxicidad, un proceso donde se libera excesivo glutamato, que está relacionado con desórdenes neurológicos como la esquizofrenia.⁴⁰

La función de señalización de glutamato se da por la unión y activación a receptores específicos, ya sean ionotrópicos, los cuales son canales iónicos que dejan fluir cationes, o receptores metabotrópicos, los cuales indirectamente activan o inhiben la señalización de segundos mensajeros a través de su interacción con proteínas G.⁴⁰ El glutamato actúa a través de tres tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGlu), que son NMDA, AMPA y kainato, y ocho receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu), los cuales están localizados en casi todas las áreas del cerebro.⁴⁵

2.2.2. Receptores Glutamatérgicos

Los receptores de glutamato son ensamblajes multiméricos de subunidades individuales y la composición combinatoria de estas subunidades define las propiedades funcionales del receptor.⁴⁰ Como ya se mencionó, el glutamato actúa en varios tipos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos; además los receptores nicotínicos acetilcolina (nAChRs) también están relacionados con este.

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs): Son canales iónicos, responsables de la neurotransmisión sináptica rápida.⁴⁵ Estos están divididos en tres clases: NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiónico) y kainato. Y están compuestos de cuatro subunidades; las propiedades de sus canales están determinadas por la composición y expresión de estas subunidades, dándoles diversas propiedades de respuesta. En el cerebro de mamíferos, cerca del 70% de sinapsis contiene receptores NMDA y AMPA.⁴⁰

Los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs): Son un subtipo de receptores de glutamato⁴⁰ de la familia de los receptores acoplados a la proteína G,⁴⁵ que actúan primariamente a través de la activación de proteínas G intracelulares y rutas de transducción de señales *downstream*. Ocho receptores mGlu han sido identificados y se subdividen en tres grupos basados en la secuencia de sus proteínas, la farmacología y el mecanismo de cascada de señales.⁴⁰ Estos receptores metabotrópicos están compuestos de 872-912 aminoácidos, número de aminoácidos que excede al

de otros receptores metabotrópicos, los cuales no contienen más de 590 aminoácidos. Los receptores mGlu consisten en 7 segmentos hidrofóbicos cercanamente localizados y separados por tres lazos extracelulares y tres lazos intracelulares.⁴⁵

Receptores nicotínicos acetilcolina (nAChRs): Son expresados por todo el cerebro, formando canales iónicos entrada-ligando, y están compuestos de cinco subunidades con varias combinaciones de estas, que determinan las propiedades, farmacología y función del receptor maduro.⁴⁰ El $\alpha 7$ nAChRs se encuentra prominentemente en el hipocampo, este ha sido asociado a déficits cognitivos, una variedad de enfermedades y desórdenes neurológicos como la esquizofrenia. Este es un importante componente de la vía colinérgica anti-inflamatoria que inhibe actividades citoquínicas,⁵ y su activación modula la transmisión sináptica glutamatérgica con nicotina o agonistas selectivos para este en el hipocampo.⁴⁶

2.2.3. Receptor NMDA

Los receptores NMDA son mediadores postsinápticos críticos de la plasticidad sináptica dependientes de actividad,⁴³ y están localizados por todo el cerebro.⁴⁷ Principalmente son expresados en neuronas, pero también pueden ser expresados en astrocitos.⁴²

Un receptor NMDA es un receptor heterotetramérico de canal iónico, que puede estar compuesto por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2.⁴³ Estas subunidades reciben distintos nombres, pudiendo llamarse también NR o GRIN. Además han sido caracterizadas tres familias de subunidades del receptor NMDA, las cuales son GRIN1 (NR1), GRIN2A-D (NR2A-D) y GRIN3A-B (NR3A-B).⁴⁰ Obligatoriamente el receptor NMDA tiene a NR1 y facultativamente a NR2A-D y/o NR3A-B,⁴⁸ es decir, al menos una subunidad NR1 junto a una combinación diferente de subunidades NR2 y/o NR3. Por otra parte, la complejidad del receptor NMDA es potenciada por modificaciones post-traduccionales, como fosforilación, glicosilación y ubiquitinación, afectando la localización celular y la función del receptor.⁴²

El receptor NMDA, tiene un sitio modulado por glicina (GMS) que regula su actividad.⁴³ Asimismo, estudios recientes han indicado que el receptor NMDA posee un sitio de unión D-serina/glicina, el cual junto a sus enzimas moduladoras, pueden estar implicados en la disfunción glutamatérgica.⁴² Además del sitio de unión d-serina/glicina, los receptores NMDA contienen varios sitios reguladores sensibles a poliaminas, Zn^{+2} , protones, y glutatión. Es así que las numerosas influencias que con-

vergen en el receptor NMDA resaltan la importancia de estos receptores en diversas funciones del cerebro.⁴²

La glicina, coagonista natural del receptor NMDA,⁴⁷ es un aminoácido abundante encontrado por todo el cerebro, y sus concentraciones sinápticas son estrictamente reguladas por transportadores de glicina.⁴² Los transportadores de glicina dependientes de sodio (GlyT), presentan dos tipos, GlyT1 y GlyT2, estos son considerados los reguladores primarios de niveles de glicina intra-celular y extra-celular.⁴³ En la sinapsis por receptores NMDA, concentraciones de glicina extracelular son primariamente derivadas de células astrogliales y la remoción es mediada por el transportador de glicina 1 (GlyT-1).⁴² El GlyT1 es ampliamente expresado en células gliales, así como en neuronas de la sinapsis glutamatérgica y se piensa que regula la actividad del receptor NMDA afectando la viabilidad de sus coagonistas. Asimismo se sabe que aunque la concentración de glicina es alta en el fluido cerebro-espinal, el GMS del NMDA no es saturado in vivo; y que niveles de glicina local son regulados funcionalmente en la sinapsis.⁴³

El receptor NMDA posee un sitio de reconocimiento de glutamato en la subunidad NR2 (GluN2) y un sitio modulador de glicina o d-serina en la subunidad NR1(GluN1). El sitio de d-serina/glicina en el receptor NMDA debe ser ocupado por el glutamato para activar al receptor. Una vez activado, el canal del receptor NMDA permite la entrada de calcio, la cual estimula cascadas de señalización intracelular que subsecuentemente pueden afectar la plasticidad sináptica y la transcripción de genes. Lo único que provoca la activación del receptor NMDA además de la unión de su agonista glutamato a su subunidad GluN2 y la unión de glicina o d-serina al GMS en la subunidad GluN1, es que la neurona también debe estar despolarizada contemporáneamente, lo que desbloquea el Mg^{+2} bloqueador del canal.⁴³

Cuando el potencial de membrana está en reposo, el poro del canal del receptor NMDA es bloqueado por magnesio, y este bloqueo puede ser removido por el proceso de despolarización de la membrana mediado por el receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA). En adición, agonistas a los sitios d-serina/glicina, tienen un rol en la neuromodulación, para habilitar la activación del receptor NMDA, uniéndose al sitio alostérico d-serina/glicina, influyen al receptor NMDA para potenciar la afinidad y eficacia de glutamato, entre otros.⁴² Como se muestra en la figura 2.1, tomada de Cioffi⁴⁹.

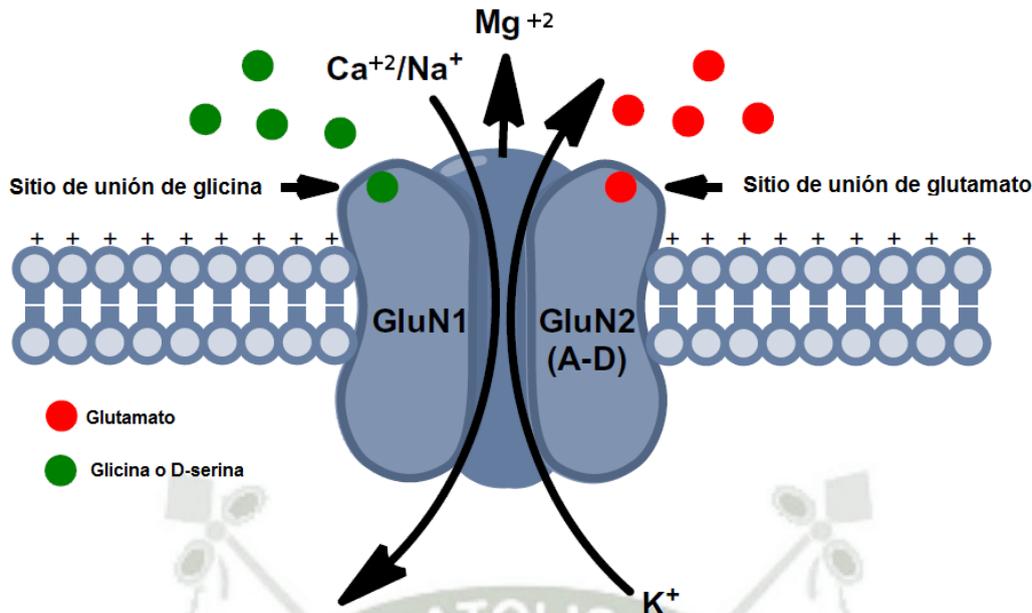


Figura 2.1: Activación del receptor NMDA. Para la activación del receptor NMDA es necesario que el glutamato se una a la subunidad GluN2 y que la glicina o d-serina a la subunidad GluN1, además es necesario la despolarización contemporánea, para desbloquear el Mg^{+2} , y así permitir la entrada de Ca^{+2} .

Como ya se mencionó, el receptor NMDA es altamente permeable al Ca^{+2} , lo que dentro de la neurona desencadena una cascada de eventos intracelulares,⁴³ asociados a la transmisión neuronal,⁴⁰ que agudizan la plasticidad sináptica funcional y cambios en la expresión de genes que influyen la plasticidad estructural neural de largo plazo.⁴³ La entrada de calcio a través del receptor NMDA es uno de los mayores mecanismos que contribuyen a la potenciación a largo plazo (LTP) y a la depresión a largo plazo (LTD) de la sinapsis.⁴⁰

Por otra parte, el modelo genético inspirado en la disfunción hipotética del receptor NMDA en esquizofrenia, está basado en la disminución de la expresión de la subunidad NR1 o de otras subunidades. Mohn y colegas mostraron que la inserción de un gen de resistencia a la neomicina en el intrón 20 del locus NR1 reduce la expresión de la subunidad NR1 al 90% en homocigotos de la corteza cerebral de ratones y ratones con una completa delección del gen de la subunidad NR1, murieron inmediatamente después de nacer.⁴⁸ Además, en un GWAS de esquizofrenia se identificaron los siguientes genes implicados en la transmisión glutamatérgica: *GRIN2A* (subunidad 2A del receptor NMDA), *SRR* (serina racemasa), *GRM3* (receptor metabotrópico glutamato 3) y el *GRIA1* (receptor de glutamato 1).⁴³ Adicionalmente, el receptor NMDA está interconectado con varias proteínas intracelulares como ErbB y disbidina-1 (*dysbidin-1*); y estudios han implicado genes de estas proteínas asociadas con un riesgo incrementado de esquizofrenia. Actualmente, el estudio del rol

del receptor NMDA en la esquizofrenia está evaluando cambios en la transcripción y expresión de proteínas de sus subunidades y de otras proteínas asociadas en pacientes post-mortem que presentaron esquizofrenia.⁴⁸

2.3. Ácido Quinurénico (KYNA)

KYNA es un antagonista natural de receptores de glutamato en el cerebro,⁵⁰ además, incrementos modestamente relativos de KYNA en el cerebro modulan negativamente la liberación de varios neurotransmisores críticos en el proceso cognitivo efectivo, incluyendo a acetilcolina (ACh), glutamato, dopamina y GABA.⁵¹ Por otro lado, se sabe que KYNA puede tener un nuevo rol definido en la patogénesis de desórdenes conductuales y neurológicos asociados a la inflamación.⁶

El ácido quinurénico (KYNA) es un producto sintetizado y liberado en el cerebro por astrocitos,⁵² es derivado de la vía de quinurenina (KP), del metabolismo de triptófano.⁵¹ Su síntesis y liberación está influenciada por un amplio rango de factores, como K^+ , niveles de agonistas de receptores de glutamato y concentraciones de glucosa.⁵³ KYNA también es considerado como un potente antioxidante endógeno,⁶ debido a su habilidad para barrer radicales libres como hidroxilos, aniones superóxido⁵³ y peroxinitrito.⁶ Este es un compuesto polar que pasa pobremente a través de la barrera sangre-cerebro bajo condiciones normales,⁵⁴ y el cual, se ha encontrado en el cerebro humano a concentraciones entre 0,2 y 1,5 μM .⁵ Así mismo, se han reportado concentraciones elevadas de este en regiones discretas del cerebro y en el fluido cerebro-espinal de pacientes con esquizofrenia.⁵⁵

Este metabolito de triptófano es el único antagonista natural conocido de receptores de glutamato en el cerebro humano,⁵⁴ principalmente con acciones hacia receptores NMDA y nicotínicos.⁶ KYNA comparte con el PCP y la ketamina importantes características; es así que concentraciones elevadas del compuesto pueden inducir acciones psicotomiméticas en hombres. Además se descubrió que concentraciones cerebrales endógenas incrementadas de KYNA, están asociados con una activación de neuronas *midbrain* DA, en similitud a los efectos observados después de la administración sistemática de drogas psicotomiméticas como PCP y MK-801.⁵⁰

Con respecto a sus propiedades antagonistas, KYNA ha sido identificado como un potente antagonista de los receptores NMDA y $\alpha 7$ nACh,⁴⁰ funcionando como un modulador alostérico negativo⁶ del receptor $\alpha 7$ nACh a niveles fisiológicos, y a altas concentraciones inhibiendo al receptor NMDA.⁵¹ Se sabe también que es un

antagonista competitivo del GMS del receptor NMDA y antagonista no competitivo del $\alpha 7$ nAChRS.⁴³ Además, KYNA es el único antagonista endógeno al sitio d-serina/glicina del receptor NMDA.⁴² Específicamente es un antagonista al sitio de reconocimiento de glicina y al sitio co-agonista del complejo del receptor NMDA. Altas concentraciones de KYNA tienen la capacidad de antagonizar al receptor en el sitio de unión,⁵ o sitio de reconocimiento de glutamato,⁵² así KYNA tiene el potencial para interferir con la señalización glutamatérgica.⁵ Y a altas concentraciones micromolares también bloquea a AMPA y receptores de kainato.⁵⁵

Las acciones de KYNA sobre el receptor $\alpha 7$ nicotínico y el sitio de unión de glicina del receptor NMDA ocurren a concentraciones relevantes más fisiológicas, mientras que su antagonismo hacia el receptor AMPA o al sitio de unión del receptor NMDA ocurre a concentraciones más elevadas,⁵ reduciendo así la señalización acetilcolinérgica, dopaminérgica y glutamatérgica.⁵³ A bajas concentraciones, este actúa específicamente en el sitio del co-agonista de glicina del receptor NMDA.⁵⁴ Así mismo, acumulación anormal de KYNA en el sistema nervioso central más allá de niveles fisiológicos normales puede inducir la hipofunción glutamatérgica, perturbando potencialmente la función cognitiva.⁶

Más cabe resaltar que KYNA es un agente antiexcitotóxico endógeno en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica, en vías que pueden impactar en la neuroprotección.⁶ Por otra parte, este metabolito neuroprotector del KP puede servir para contraatacar la toxicidad relacionada al ácido quinólico (QUIN).⁵ QUIN es un metabolito neurotóxico de la KP que activa selectivamente a receptores NMDA,⁵³ incrementa la actividad neuronal, y eleva las concentraciones intercelulares de calcio, por otra parte causa daño neuronal, actuando como un agonista del receptor NMDA, mas este efecto es mayormente mediado a través de la actividad inhibitoria hacia los receptores NMDA.⁶ Inicialmente QUIN fue identificado como una potencial neurotoxina cuando al brindarles una inyección intracerebro ventricular a ratones, estos presentaron fuertes convulsiones.⁵³ Hay evidencia acumulada que QUIN está involucrado en la neurotoxicidad asociada con varias enfermedades cerebrales inflamatorias. También fue reportado que QUIN excita neuronas en la corteza cerebral de ratas anestesiadas, un efecto que fue prevenido por el antagonismo selectivo hacia receptores NMDA.⁶ Consecuentemente, el promedio de ácido quinolínico frente a KYNA es usado como un indicador para la activación relacionada al receptor NMDA y la neurotoxicidad.⁵

Esa así que los receptores NMDA que están implicados en modular la migración neuronal, la formación de sinapsis, el crecimiento de neuritas y la formación de espinas

y otros factores que contribuyen a la plasticidad neuronal, pueden ser activados o inhibidos por metabolitos de la KP (QUIN y KYNA respectivamente).⁵⁶

KYNA está presente en altas concentraciones nanomolares en el cerebro humano,⁴³ y es producido a partir de quinurenina (KYN), mediante las enzimas quinureninas aminotransferasas (KATs),⁵ cuatro isoenzimas KAT (KAT I, II, III, IV) están involucradas en la síntesis de KYNA en el sistema nervioso central de mamíferos,⁶ catalizando la transaminación irreversible de KYN a KYNA.⁴³ Dentro del cerebro, KAT II es el mayor responsable de la producción de KYNA, siendo el recurso primario de la producción de KYNA en el cerebro, debido a la poquísima habilidad de KYNA para cruzar la barrera hematoencefálica (BBB).⁵

KYN es un metabolito central de la KP, sintetizado en un punto clave de esta.⁶ En mamíferos, la KP es iniciada por la escisión oxidativa del anillo-indol del L-triptófano (L-TRP), por las enzimas IDO1 y IDO2 o TDO2 para producir N-formilquinurenina. Esto es seguido por la síntesis de la primera molécula estable de la vía, L-KYN. El metabolismo subsecuente de L-KYN ocurre mediante uno de estos tres mecanismos: 1) la desaminación de L-KYN por la familia de enzimas quinurenina aminotransferasa (KAT) resulta en la producción de KYNA, 2) la degradación de L-KYN por quinureninasa (KYNU) resulta en la producción de ácido antranílico (AA), o 3) la hidroxilación de L-KYN por quinurenina monooxigenasa (KMO) produce ácido 3-hidroxiantranílico (3-HK). 3-HK es subsecuentemente convertido en 3-HANA por quinureninasa (KYNU) y luego oxidado por 3-HAO en ACMS. Bajo concentraciones fisiológicas, este intermediario espontáneamente se reensambla hacia la forma de QUIN, la cual es subsecuentemente transaminado por QPRT para generar ácido nicotínico y últimamente NAD^{+53} , como se muestra en la figura 2.2, tomada de Fujigaki⁶.

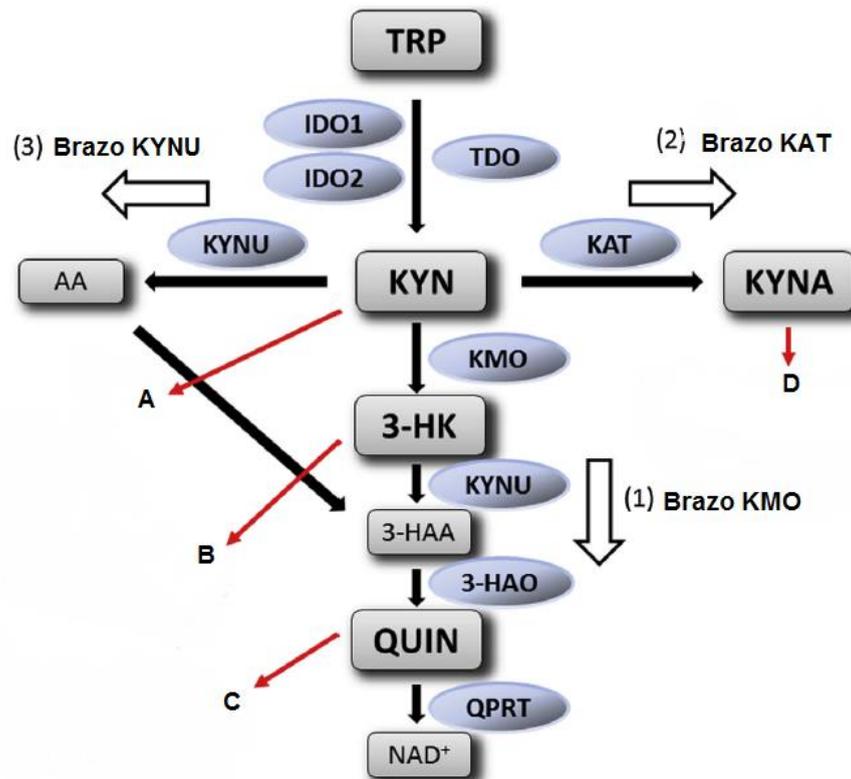


Figura 2.2: La vía de la Quinurenina. A) Un ligando endógeno del receptor hidrocarburo arilo. Acumulado en muchas enfermedades neurológicas. B) Un metabolito tóxico capaz de inducir daño oxidativo y muerte celular. C) Un metabolito neurotóxico capaz de activar a receptores NMDA. D) Un antagonista de amplio espectro del glutamato, NMDA, AMPA y receptores $\alpha 7$ nAChRs.

Además, ha sido reportado que KYN por si solo tiene roles fisiológicos en el sistema nervioso central; incluyendo propiedades pro y anti-inflamatorias. Además de sus propiedades neuroactivas, un incremento de la concentración de KYN en la sangre y en el sistema nervioso central refleja un incremento del metabolismo de triptófano (TRP) a lo largo de la KP; además, KYN ha sido utilizado como un biomarcador de varias enfermedades neuronales.⁶

Las elevaciones en KYN y KYNA observadas en la esquizofrenia pueden resultar de alteraciones en la actividad de la degradación de KYN por la enzima KMO. Una reducción en KMO puede resultar en un incremento de la producción de KYN y potenciar el metabolismo hacia la formación de KYNA.⁵⁶

La producción de KYNA puede tener un rol neuroprotector.⁶ KYNA es capaz de contraatacar la neurotoxicidad expresada por QUIN, 3-HK y 3-HANA. Durante condiciones fisiológicas normales, el flujo relativo a través de dos brazos del metabolismo de L-KYN debe estar estrictamente regulado para garantizar el promedio de los metabolitos, manteniendo un nivel óptimo para prevenir la toxicidad celular.⁵³

Además, hallazgos confirman la participación de KYNA en el desarrollo de la esquizofrenia. Estudios *in vivo* han mostrado que niveles incrementados de KYNA reducen significativamente la función del glutamato en varias regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo. Por otra parte, un reporte reciente ha revelado que la actividad sináptica GABAérgica en neuronas piramidales CA1 está mantenida en parte por la actividad del receptor $\alpha 7$ nACh y es suprimida por la actuación de KYNA.⁵⁵ Y en modelos animales, se ha reportado que niveles incrementados de KYNA producen efectos relacionados a los de la esquizofrenia, incluyendo déficits en la memoria espacial y la de trabajo, y en la reducción de la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica.⁶ Por otra parte, otro estudio muestra que niveles cerebrales de KYNA son los mayores durante los días finales de gestación y disminuyen dramáticamente inmediatamente después del nacimiento.⁵¹

Concluyendo, concentraciones incrementadas de KYNA están relacionadas con deficiencias cognitivas en pacientes con esquizofrenia, avalando así la noción de que apuntar hacia la formación de KYNA puede presentar beneficios clínicos.⁵⁶

2.4. Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I)

2.4.1. Quinurenina Aminotransferasa (KAT)

La quinurenina aminotransferasa (KAT), es la enzima responsable de la formación de KYNA. Las quinureninas aminotransferasas (KATs) humanas son miembros de la familia de las aminotransferasas,⁵⁷ estas proteínas homodiméricas catalizan la transaminación de KYN en KYNA, utilizando a piridoxal 5-fosfato (PLP) como cofactor, y pueden usar diferentes α -ketoácidos como aceptores del grupo amino. Cuatro diferentes KAT ortólogos (KAT I-IV) son expresados en el cerebro de mamíferos y su importancia relativa parece variar de acuerdo a la especie, tejido y etapa de desarrollo.⁷

El cerebro de mamíferos expresa cuatro isoformas, KAT I (glutamina transaminasa K, GTK, EC 2.6.1.64), KAT II (2-aminoadipato aminotransferasa, ADA, EC 2.6.1.7), KAT III (conjugado de cisteína β -liasa 2, CCBL2; EC4.4.1.13) y KAT IV (aspartato aminotransferasa mitocondrial, ASAT, EC 2.6.1.1).⁵⁸ Siendo KAT I y KAT II las más estudiadas.⁵⁷

Un estudio previo determinó las contribuciones relativas de KAT I, II y IV a la

actividad total de KAT y encontró que el cerebro de ratas y humanos contiene la mayor proporción de KAT II (aproximadamente 60 %, con aproximadamente 10 y 30 % de KAT I y IV respectivamente), lo que sugiere un papel crítico de KAT II en la síntesis de KYNA en los cerebros de rata y humano. La contribución de KAT III a la síntesis de KYNA en el cerebro quedó por determinar.⁵⁸

Además otro estudio reveló que la expresión compensatoria de sobrerregulación de KAT-I y KAT-III ocurre en ratones transgénicos *kat2* *-/-*, demostrando la importancia de estos dos homólogos.⁷

KAT ha sido localizada inmunohistoquímicamente en astrocitos en una inclusión cercana a la sinapsis glutamatérgica.⁵⁹ Además se sabe que los astrocitos, no las neuronas, son el sitio donde la mayor parte del KAT se encuentra en el cerebro *in situ*.⁶⁰ KAT preferentemente se localiza en las células gliales, pero también está presente en pocas neuronas en el hipocampo y en el estriado, como también en la mayoría de neuronas en la médula y columna vertebral.⁶¹ Por otra parte, KATs se encontraron en las retinas de aves, roedores y humanos, específicamente en los extremos de las células Muller (KAT I) y en las células ganglionares de la retina (KAT II).⁶²

La homeostasis de KYNA en el cerebro de mamífero se atribuye principalmente a la acción de KAT I y II.⁶³ KAT tienen una amplia especificidad de sustrato para aminoácidos y varios aminoácidos inhiben competitivamente KATs para la producción de KYNA. La captación cerebral de KYN, el precursor inmediato de KYNA, se da a través de grandes transportadores de aminoácidos neutros (LAT). Y resultados sugieren que cinco aminoácidos que funcionan como sustratos LAT (leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina y tirosina) inhiben la formación de KYNA a través del bloqueo del transporte de KYN. Por otro lado también se sabe que otros aminoácidos (leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, tirosina, alanina, cisteína, glutamina, glutamato y aspartato) inhiben la formación de KYNA a través del bloqueo de la reacción de síntesis de KYNA en el cerebro.⁵⁸

2.4.2. Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I)

La síntesis cerebral de KYNA a partir de su bioprecursor KYN es catalizada principalmente por las quinureninas aminotransferasas (KAT I y KAT II) preferentemente dentro de astrocitos.⁶⁴ KAT I (idéntica a la glutamina transaminasa K, EC 2.6.1.64) junto a KAT II (idéntica a α -aminoadipato aminotransferasa, EC 2.6.1.7) son las dos quinureninas aminotransferasas que han sido ampliamente estudiadas en el cerebro

de humanos y roedores.⁶³

KAT I fue inicialmente identificada como glutamina transaminasa K (GTK) y luego se identificó que era idéntica a la cisteína-s-conjugada- β -liasa (CCBL1). KAT I exhibe su mayor actividad a pH 9,5 y el buffer Tris interfiere con su actividad. Además KAT I presenta la habilidad de transaminar L-fenilalanina (L-Phe) a fenil-piruvato, que absorbe luz (322nm, $\epsilon = 2,4 \times 10^4$ en 3M NaOH). Su cofactor es PLP y el Na piruvato, es un oxoácido requerido para la regeneración de este (PLP).⁵⁷ Se sabe también que KAT-I prefiere a piruvato como un co-sustrato, y esta es inhibida por glutamina.⁶¹

KAT I desempeña un papel en la regulación de la muerte celular programada. Siendo concebible que KAT y KYNA puede controlar la apoptosis en la retina durante el desarrollo temprano. Un estudio sugiere que la actividad enzimática de KAT I es alta en estadios embrionarios tardíos, y que puede desempeñar un papel neuromodulador en la retina de pollo durante la fase tardía de la embriogénesis.⁶² Además, un estudio reciente también mostró cambios ontogénicos de la actividad enzimática KAT I en la retina de pollo. Los resultados de ambos estudios sugirieron un papel neuromodulador de KYNA en la ontogenia retiniana.⁶⁵

Por otra parte, se sabe que células microgliales, astrocitos, *perikarya* de células nerviosas, neuronas dopaminérgicas del SNPC⁶¹ y extremos de las células Muller expresan a KAT-I.⁶² Además se sabe también que KAT I está presente en células astrogliales bajo condiciones normales,⁶¹ en neuronas corticales cerebrales,⁶⁰ en la retina,⁶² entre otros.

2.4.3. Formación de KYNA mediada por KAT

KAT es una enzima piridoxal que contiene dos enlaces covalentes (enlaces de base de Schiff).⁹ El PLP, está unido covalentemente a un residuo de lisina en KAT, y este acepta a un grupo amino de KYN que da como resultado la formación de fosfato de piridoxamina (PMP). Posteriormente, el PMP dona un grupo amino al ácido α -cetoglutárico, permitiendo así la conversión catalítica de KYN a KYNA.⁹

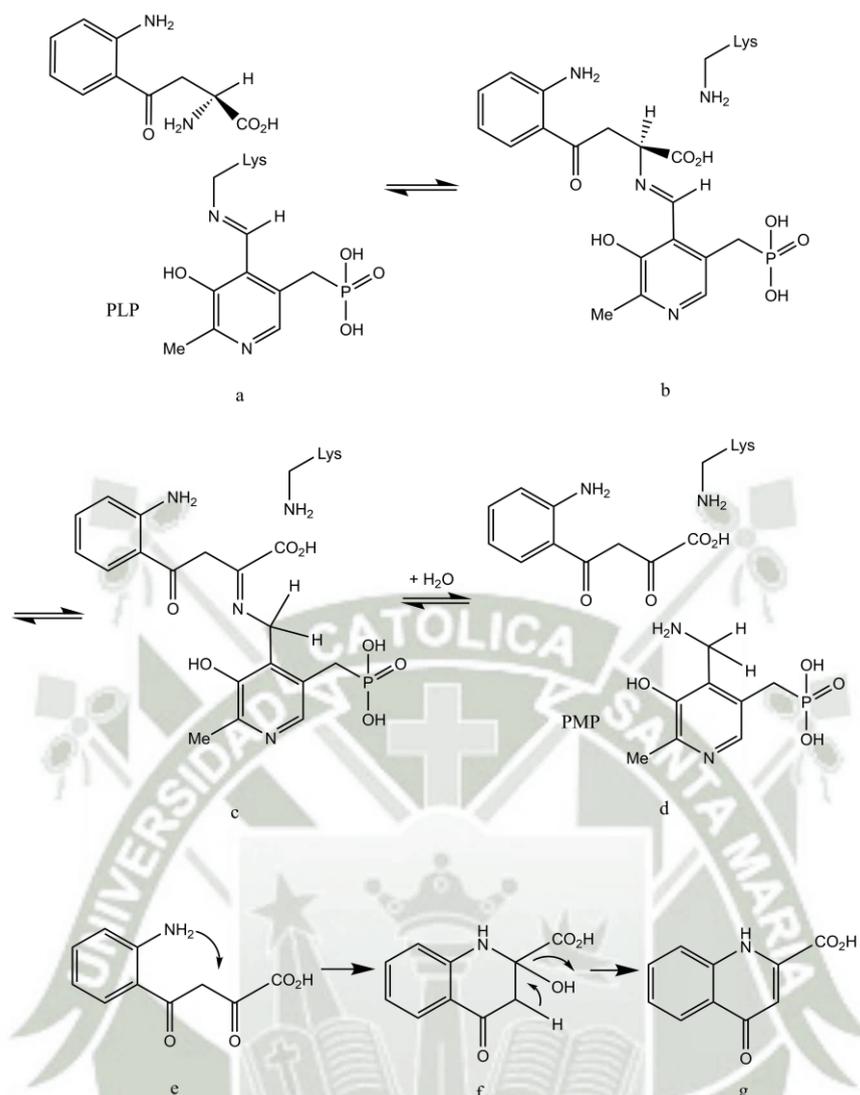


Figura 2.3: Formación de KYNA, mediada por KAT.⁶⁶ a) Complejo Michaelis L-KYN/PLP. b) Aldimina Externa. c) Ketamina. d) Complejo Michaelis Ketoácido/PMP. e) Ketoácido Intermediario. f) Ketoácido Intermediario. g) KYNA.

Por otra parte, se conoce acerca del fenómeno de la reacción de transaminación no-enzimática en presencia de PLP y oxoácidos, en el cual se observó un paso de formación de KYNA dependiente de la concentración de PLP a pH 7,5; pH al cual las KAT's están en muestras biológicas.⁵⁷

Los estudios cristalográficos de las KATs de diferentes organismos, incluyendo humanos, han revelado rasgos estructurales distintivos de las quinureninas aminotransferasas de tipo I y tipo II. Una diferencia sorprendente se refiere al intercambio de dominio de las regiones N-terminales, que desempeñan roles funcionales clave equivalentes tanto en una estructura no intercambiada como en una estructura intercambiada en isoenzimas tipo I y tipo II. Los diferentes cambios conformacionales

durante la catálisis crean sitios activos divergentes en las dos isoformas y afectan la especificidad del sustrato.⁶³

KAT I muestra especificidad al sustrato suelto, y a su vez cuenta con la inhibición de KAT I por la transaminación de KYN fisiológicamente abundante y por la competencia de aminoácidos.⁶³

Una notable diferencia estructural entre KAT I y KAT II consiste en el intercambio de la región N-terminal catalíticamente esencial, que se observa solamente en KAT II. Por el contrario, la región N-terminal de los ortólogos KAT I participa en la construcción del pequeño dominio y la estructuración del sitio activo de la misma subunidad, es decir, no muestra el intercambio observado en KAT II.⁶³

En las aminotransferasas, la región N-terminal es un componente estructural clave, que está involucrado en el montaje adecuado de las enzimas y destino subcelular⁴¹ y también desempeña un papel en la catálisis mediante la participación en el sustrato vinculante y la estructuración del sitio activo. Varios elementos de evidencia destacan la relevancia estructural y funcional de la región N-terminal en KATs. Por ejemplo, única mutación conocida naturalmente de la KAT I en la rata (Glu64 Gly64) da como resultado una síntesis de KYNA dramáticamente alterada y en un fenotipo espontáneo hipertensivo asociado. Esta mutación en KAT I humana afecta a un residuo que desempeña un papel clave en el cambio conformacional catalíticamente esencial que implica la región N-terminal.⁶³

Se observa un alto grado de conservación de la secuencia (aproximadamente 40 % de identidad de secuencia) entre los diferentes ortólogos de KAT I, mientras que existe una divergencia significativa de secuencia entre KAT I y II (las enzimas humanas, por ejemplo, comparten solamente el 18 % de identidad de secuencia). Una comparación estructural profunda revela características únicas y distintivas para cada isoforma, es así que los respectivos sitios activos se conforman de una manera significativamente diferente. Pero se observó una conservación estricta de un subconjunto mínimo de residuos requerido para una unión óptima de PLP: (i) la lisina catalítica (ii) el residuo de aspartato que está implicado críticamente en el mantenimiento de la eficiencia del cofactor electrón-sumidero, (iii) el residuo de tirosina implicado en el enlace de hidrógeno de PLP-fenolato y (iv) Un residuo aromático p apilado sobre el anillo cofactor desde su lado expuesto al disolvente.⁶³

Además, las dos isoformas comparten una copa de unión de PLP-fosfato estructuralmente altamente conservada. Y sólo se producen cambios conformacionales limitados durante la catálisis en KAT I humano, que se caracteriza por un sitio activo en

gran parte preformado que permite el reconocimiento de un conjunto más amplio de aminoácidos.⁶³ Por otra parte, el bolsillo hidrofóbico está definido por varios residuos incluyendo Tyr63, His279, Phe278, Tyr101 y Phe125.⁷

Y el grupo carboxi en el resto de acilalanina de KYN es necesaria para la actividad catalítica, y el orto amino en el anillo aromático también es obligatorio para la actividad.⁵⁹

2.4.4. Inhibición de KAT I

KAT-I es inhibida por sustratos competitivos como triptófano y fenilalanina los cuales están presentes en el cuerpo humano bajo condiciones fisiológicas. Las observaciones sugieren que las fracciones funcionales principales que facilitan la unión de inhibidores competitivos son el anillo aromático hidrofóbico y el ácido carboxílico.⁷

El suero y el fluido cerebro espinal tienen la habilidad de bloquear significativamente y dependientemente de la dosis, las actividades de KAT I, II y III, y modular la síntesis de KYNA y probablemente actuar como compuestos terapéuticos.⁶⁷

Además, se hicieron modificaciones a la molécula de KYN para examinar la especificidad de sustrato de KAT, y posiblemente desarrollar compuestos inhibidores. Así se reveló que la modificación de la cadena KYN (reducción o eliminación del grupo ceto o descarboxilación del resto aminoácido) dio como resultado compuestos que no podían interferir con la producción de KYNA. Similarmente, la eliminación o metilación parcial y completa del grupo amino aromático produjo compuestos con bajos efectos inhibidores. Pero la variación del patrón de sustitución en el anillo aromático de KYN muestra que la meta de sustitución a la cadena lateral de acilalanina (posición 5 de anillo) produce compuestos con buena actividad inhibidora frente a KAT.⁵⁹

Los aminoácidos pueden regular parcialmente la producción de KYNA a concentraciones fisiológicas, y que algunos modulan la captación de KYN, mientras que otros la reacción de síntesis de KYNA, es decir pueden suprimir la producción de KYNA mediante la inhibición de KAT en el cerebro. Los aminoácidos glutamato, aspartato, cisteína, glutamina y alanina suprimieron la producción de KYNA pero no la captación de KYN, lo que sugiere que estos aminoácidos inhiben la reacción de síntesis de KYNA. El glutamato y el aspartato inhiben fuertemente KAT II y IV, mientras que la glutamina y la cisteína muestran efectos inhibitorios sobre la actividad de KAT I y III.⁵⁸

Respecto a los fármacos, KAT-I es uno de los blancos de la toxicidad de MPTP, una semana después de la discontinuación del tratamiento con MPTP, la expresión de KAT-I disminuye remarcablemente en las células nerviosas.⁶¹ Además, la actividad de KAT I fue inhibida por irbesartán a la concentración de 0,1, 0,5 y 1 mM a 76 % ($p < 0,05$); 58 % ($p < 0,05$); 44 % ($p < 0,01$), respectivamente.⁶⁴ Por otra parte, se estudió al ácido fenilhidrazona hexanoico y compuestos basados en indol, como una nueva clase potencial de inhibidores de KAT-I.⁷ Por otra parte, es importante recordar que el compuesto debe pasar la membrana celular e inhibir a KAT I.⁵⁷

2.5. Tratamiento de la Esquizofrenia

La calidad de vida de los pacientes con esquizofrenia es compleja e influenciada por muchos factores sociales, psicológicos y clínicos.⁶⁸ Haciendo que el hecho de que un paciente llegue a la remisión sintomática (mejora) implique un tratamiento de mantenimiento y un buen cumplimiento de la medicación.⁶⁹

Respecto al tratamiento de mantenimiento, se dan intervenciones psicosociales, como terapia cognitivo-conductual, terapia de rehabilitación cognitiva, programas de psicoeducación, intervención familiar, programas de habilidades sociales, entre otros. Reduciendo así los síntomas psicóticos y el riesgo de recaída, y mejorando los resultados a largo plazo de los pacientes. Particularmente, la evaluación neuropsicológica y la rehabilitación han ganado mucho interés en los últimos años, pero muy pocos pacientes tienen acceso a una evaluación neuropsicológica integral. Además, se requiere la gestión de la dieta y la actividad física, con el fin de mejorar el pronóstico global.⁷⁰

El tratamiento farmacológico es fundamental para la mejoría del paciente. Sin embargo, muchos pacientes no responden adecuadamente a la terapia farmacológica, ya sea debido a una mayor actividad metabólica o debido al mal cumplimiento (pseudo resistencia a los fármacos).⁷¹, que puede deberse a varias razones, como la menor tolerabilidad del tratamiento, la complejidad del horario de la medicación, la comorbilidad con el consumo de alcohol, factores demográficos (por ejemplo, apoyo social deficiente), la mala relación con el terapeuta, la presencia de ilusión de persecución, entre otros.⁷²

Además, existen diferencias farmacocinéticas interindividuales causadas por la edad, las enfermedades concurrentes, la medicación concomitante o la variabilidad genética. Sin olvidar la variabilidad intraindividual, debida a las características del estilo de vida, como el tabaquismo o el consumo de cafeína.⁷¹ Es así que la medicina

personalizada basada en datos individuales, para determinar las opciones de tratamiento, incluidos los agentes farmacológicos, estrategias psicosociales y medidas de estilo de vida, constituyen una forma de mejorar los resultados de los pacientes y la experiencia de los servicios.⁷³

Pero a pesar de la variedad de medicamentos disponibles para los pacientes con esquizofrenia, los resultados óptimos del tratamiento no siempre se logran. Con frecuencia, la mala adherencia a la medicación es uno de los mejores predictores de recaída, re-hospitalización y suicidio. En estos pacientes, las tasas de interrupción de la medicación son altas, lo que refleja problemas de tolerabilidad debido a los eventos adversos o la mala eficacia.⁷⁴

Además, algunos pacientes muestran resistencia al tratamiento y algunos pacientes muestran deterioro cognitivo a pesar del tratamiento.⁷⁵ Aproximadamente el 30 % de las personas con esquizofrenia manifiestan una respuesta mínima a los medicamentos antipsicóticos convencionales y atípicos, y manifiestan síntomas continuos de psicosis, presentando la condición conocida como Esquizofrenia Resistente al Tratamiento (TRS).⁷⁶ Y el inconveniente de la terapia actual con los antipsicóticos es que no corrigen adecuadamente ni previenen el deterioro cognitivo en pacientes con esquizofrenia. Por lo tanto, nuevos y efectivos fármacos serían útiles para el tratamiento de este trastorno.⁷⁵

Mas no todo es negativo, puesto que la intervención temprana con medicamentos antipsicóticos lleva a mejores resultados a largo plazo, incluyendo la reducción de la gravedad de los síntomas psicóticos, del tiempo transcurrido como paciente hospitalizado y del tiempo total durante la vida que experimentó síntomas psicóticos.⁷⁶ Y como ya se mencionó, la combinación de antipsicóticos con intervenciones psicosociales, promueve un menor riesgo de tasas de recaída, un mejor cumplimiento y dosis más bajas de medicamentos antipsicóticos.⁷⁷

Los medicamentos antipsicóticos han sido la primera línea de tratamiento para la psicosis por cerca de medio siglo.⁷⁸

Los fármacos actualmente disponibles, conocidos como antipsicóticos típicos (por ejemplo, thiorazina, clorpromazina y haloperidol) y antipsicóticos atípicos (por ejemplo, clozapina, olanzapina y risperidona), presentan una eficacia moderada para los síntomas positivos, pero tienen capacidad limitada para mejorar los síntomas negativos y muchos de estos agentes inducen efectos secundarios graves, como sedación, síntomas extrapiramidales, hiperprolactinemia y aumento de peso severo. Por lo tanto, los fármacos que mejor sirven a la población de pacientes mediante el tratamiento

eficaz de todos los subdominios de los síntomas con mayor seguridad y la tolerabilidad siguen siendo una necesidad crítica no satisfecha.⁴⁹

Los antipsicóticos disponibles se dividen en antipsicóticos de primera generación (AGP) y antipsicóticos de segunda generación (ASG). Los antipsicóticos de primera generación incluyen derivados de baja potencia (clorpromazina, mesoridazina, levomepromazina, sulpirida) y de alta potencia (haloperidol, flufenazina, flupentixol, pimozida). Los fármacos ASG comprenden un grupo variado de compuestos que incluyen (según el año en que fueron comercializados) clozapina (1989), risperidona (1993), olanzapina (1996), quetiapina (1997), ziprasidona (2001), aripiprazol (2002), paliperidona (2006), asenapina (2009), iloperidona (2009) y lurasidona (2010).⁷⁹

Inicialmente, se propuso que los SGAs eran más eficaces en comparación con los AGPs para el tratamiento de los síntomas positivos, negativos y cognitivos en pacientes con esquizofrenia. Además se han encontrado diferencias marcadas entre los AGP y los ASG con respecto a los factores de riesgo y la ocurrencia de eventos adversos. La administración de AGP a menudo produce efectos secundarios extrapiramidales y discinesia tardía, mientras que el uso de ASG puede estar asociado con aumento de peso, dislipidemia y regulación anormal de la glucosa.⁷⁹

Los AGPs y SGAs se unen a una amplia variedad de receptores del sistema nervioso central (SNC). Con una excepción, todos los SGA aprobados para uso clínico por las agencias gubernamentales son antagonistas del receptor D2. La única excepción actual es el aripiprazol, que es un agonista parcial de los receptores D2.⁷⁹

Nuevos fármacos pretenden proporcionar tratamientos más efectivos, tolerables y más seguros. Los tres fármacos antipsicóticos aprobados recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) fueron asenapina (2009), iloperidona (2009) y lurasidona (2010). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) también ha aprobado asenapina (2010) y lurasidona (2014), con la iloperidona todavía bajo evaluación. Japón (2008) y Corea (2009) aprobaron la blonanserina, que aún no ha sido aprobada en ninguna otra parte.⁷⁴

Los antipsicóticos disponibles reducen la gravedad de los síntomas positivos; sin embargo existe todavía una gran necesidad de agentes farmacológicos que mejoren los síntomas negativos y los déficits cognitivos. La aparición de la hipótesis de glutamato ha llevado al descubrimiento de varios nuevos objetivos que tienen el potencial de mejorar la sintomatología completa de la esquizofrenia.⁴⁹

El proyecto de Medición y Tratamiento para Mejorar la Conciencia en la Esqui-

zofrenia (MATRICS), diseñado para facilitar el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de los trastornos cognitivos en personas con esquizofrenia, identificó tres mecanismos de drogas de particular interés: dopaminérgico, colinérgico y glutamatérgico.⁸

Además, como ya se sabe, existe una creciente evidencia de que la hipofunción del receptor de NMDA está relacionada a la expresión de esquizofrenia, y numerosos programas de descubrimiento de fármacos han desarrollado agentes que directa o indirectamente potencian la neurotransmisión mediada por receptor NMDA.⁴⁹

Dirigir fármacos a genes relacionados a la esquizofrenia o a sus vías anatómicas y funcionales asociadas podría producir nuevos tratamientos y más eficaces. Algunos genes de susceptibilidad en la esquizofrenia son *disbindina*, *neuregulina 1*, *COMT* y *DISC1*. Y curiosamente, muchos de estos genes parecen estar relacionados con el control de la plasticidad sináptica y la transmisión de glutamato, en particular con la función del receptor NMDA.⁸⁰ Además se sabe que varios fármacos psicotrópicos actualmente utilizados, incluyendo antipsicóticos, ejercen efectos sobre mecanismos epigenéticos.⁷⁵

Por otro lado, KYNA se ha convertido en un candidato valioso en el descubrimiento de nuevos fármacos.⁸ Haciendo así que KAT sea un objetivo enzimático clave en el tratamiento de la esquizofrenia.⁹ Sin embargo, no hay que dejar de considerar que la eliminación total de KYNA endógeno responsable de la sinapsis excitatoria en el cerebro, da como resultado una sobreexcitación con consecuencias neuropatológicas.⁵⁹

2.6. Fármaco (3S) - amino - 1 - hidroxí - 3,4 - dihidroquinolin - 2(1H) - ona

La reducción de los niveles de KYNA mediante la administración de inhibidores de algunas enzimas de la vía de la Quinurenina, en particular la KAT II, ha sido propuesta como un tratamiento para alteraciones cognitivas.¹⁰ Ya que la síntesis de KYNA en el cerebro es catalizada principalmente por KAT I y KAT II (KATs astrocíticas).⁸¹

Sin embargo, la identificación de inhibidores de KAT II, que sean penetrantes en el cerebro y con propiedades similares a las drogas disponibles, sigue siendo un desafío. Adicionalmente, informes recientes han establecido que las variantes de secuencia de KAT II humana y de rata causan cambios significativos en la potencia enzimática

entre especies, repercutiendo en la búsqueda de inhibidores.⁸¹ Además, desafortunadamente los inhibidores sistémicos de KAT II han permanecido escasos. Pero el fármaco (3S)-amino-1- hidroxí- 3,4-dihidroquinolin-2(1H) -ona (PF-04859989) es un potente inhibidor sistémico de KAT II con penetración en el cerebro. Cuando este se administra sistémicamente restablece la actividad glutamatérgica en el cerebro de animales que exhiben niveles elevados de KYNA.¹⁰ Es decir, este nuevo fármaco es una alternativa muy prometedora.

Un estudio mostró que el inhibidor PF-04859989 restaura eventos de liberación de glutamato dentro de la corteza prefrontal de ratas que presentaban niveles elevados de KYNA. Además mostró también, que la administración sistemática de PF-04859989, 30 minutos antes de la administración de KYN (precursor de KYNA), restablece los eventos de liberación de glutamato 75 minutos después de la administración de PF-04859989, lo que no sucedió al administrar PF-04859989 30 minutos después de la administración de KYN. Lo que muestra que PF-04859989 revirtió significativamente los niveles de KYNA cerebral inducidos por KYN. Además PF-04859989 no afectó, ni restauró los eventos de liberación de glutamato en ratas que no fueron tratadas previamente con KYN. Confirmando así, que PF-04859989 inhibe la síntesis de KYNA mediante el bloqueo de KAT. Por otra parte se demostró también que los niveles de KYNA no fueron completamente suprimidos en presencia de PF-04859989.¹⁰

Los estudios farmacocinéticos y de eficacia in vivo en ratas muestran que PF-04859989 es un inhibidor irreversible penetrante del cerebro y es capaz de reducir KYNA cerebral en un 50 % a una dosis de 10 mg / kg (sc). Además, las ventajas potenciales de los inhibidores irreversibles incluyen la administración de dosis bajas del fármaco y baja toxicidad. Por otra parte, este inhibidor irreversible no se une covalentemente a la proteína, lo que reduce significativamente el potencial de una respuesta inmune.⁸¹

Una estructura de cristal de rayos X revela varias interacciones clave que explican la notable potencia y selectividad de este inhibidor. En primer lugar, la estructura de rayos X indica que el fármaco se une covalentemente a PLP en el sitio activo de KAT II, a través de un enlace entre la amina primaria del fármaco y el aldehído de PLP (aducto covalente). La formación de este aducto covalente entre el fármaco y PLP es crucial para la potencia observada de este inhibidor. La porción de PLP del aducto, aunque no está unida covalentemente a KAT II, mantiene numerosas interacciones donador-aceptor de puentes de H con la enzima. En segundo lugar, el oxígeno de carbonilo de fármaco sirve como aceptor de puentes de hidrógeno en una interacción con la cadena lateral de Asn-202. Y en tercer lugar, el otro átomo de oxígeno del

ácido hidroxámico del fármaco acepta un enlace de hidrógeno de Arg-399. Además, el grupo fenilo condensado del fármaco contribuye a las interacciones de van der Waals con la bolsa hidrofóbica formada por Leu-40, Tyr-74 y Leu-293.⁸¹

Por otro lado, se sabe también que PF- 04859989 es un componente activo debido a su alta potencia y bajo peso molecular (178 Da). Y que es penetrante en el cerebro, y es selectivo para KAT II sobre KAT I, KAT III y KAT IV.⁸¹

2.7. La Bioinformática

2.7.1. Definición

La bioinformática, también conocida como biología computacional, permite la comprensión científica de los sistemas vivos a través de la computación, facilitando el manejo de datos y el descubrimiento del conocimiento. Basándose en las aplicaciones de la informática a la biología, la bioinformática ha establecido vínculos con las matemáticas, la estadística, la física, la química, la medicina y la farmacología. Por lo tanto, la investigación en el campo de la bioinformática implica aportaciones de diversas disciplinas.⁸²

En esta tecnología es clave la investigación en biotecnología y el genoma.⁸² Algunos definen que la bioinformática sólo se centra en el desarrollo de bases de datos para la manipulación de la información genómica y estructural, sin embargo, otros consideran que abarca el estudio del ADN transcrito a ARN mensajero y este traducido en una proteína, que al adquirir su estructura tridimensional, cumple su rol en el funcionamiento del organismo. Es decir, estudia la organización y la regulación de los genes en la secuencia de ADN, la identificación de las zonas de transcripción del ADN, la predicción de la estructura de las proteínas a partir de su secuencia y el análisis de la función molecular de las biomacromoléculas.⁸³

2.7.2. Bioinformática Estructural

El gran número de estructuras 3D de biomacromoléculas que se han determinado en las últimas décadas y su colocación en bases de datos como el “*Protein Data Bank*” (www.pdb.org), ha generado el desarrollo de una sub-disciplina, conocida como bioinformática estructural. Esta sub-disciplina se ocupa de la visualización, caracterización

y análisis de estructuras biomacromoleculares (como proteínas, ADN y ARN), y sus interacciones. A inicio del siglo XXI, inició el uso de estructuras tridimensionales de proteínas en la búsqueda de fármacos, haciendo así que la bioinformática estructural tenga como rol principal; usar la información estructural para identificar, diseñar y optimizar nuevos fármacos, que sean específicos y potentes.⁸³

La bioinformática estructural presenta dos objetivos generales:⁸³

- La elaboración de nuevos métodos computacionales para manipular, ordenar y analizar la información generada a través de experimentos húmedos.⁸³
- La aplicación de los métodos antes mencionados, para resolver problemas de índole biológico y de esta manera generar nuevos conocimientos.⁸³

Estos dos objetivos están relacionados, ya que la validación de la nueva metodología implica la resolución exitosa de los problemas. Además, la bioinformática estructural ha generado diversos aportes, como el desarrollo de algoritmos a partir de características fisicoquímicas de los componentes de las biomacromoléculas (aminoácidos y ácidos nucleicos), los cuales permiten generar modelos estructurales a partir de la información obtenida por técnicas de Rayos X y RMN (Resonancia Magnética Nuclear).⁸³

Por lo que ahora la integración de los enfoques computacionales con las ciencias biológicas experimentales y la investigación biomédica, generan hipótesis teóricas basadas en el análisis, que luego guían el diseño experimental.⁸² Además se sabe que podría tomar 13 años y un costo de US \$1778 millones el descubrimiento de un nuevo medicamento. Por eso, la reducción de los costos o el tiempo de lanzamiento en las diferentes etapas del descubrimiento y desarrollo de fármacos son una prioridad.¹¹

Una de las principales razones o fallas en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos probablemente sea el uso de modelos animales para predecir la eficacia y la seguridad en seres humanos. De hecho, la mala traducción de los hallazgos preclínicos de los animales a los pacientes es un tema importante en las áreas terapéuticas, como las neurociencias. Por lo tanto, la aplicación de la investigación bioinformática tiene el potencial de dar lugar a un cambio de paradigma fundamental mediante el aprovechamiento de los datos de origen humano para superar algunas de las limitaciones inherentes asociadas con el uso de modelos animales.¹¹ Otra tendencia es la cantidad cada vez mayor de información diversa generada durante todas las fases involucradas en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. La obtención de esta infor-

mación tiene un costo y es esencial que los datos sean utilizados y analizados de la manera más eficaz posible.¹¹

En el futuro, esperamos ver una cantidad creciente de información que se pondrá a disposición para el análisis computacional y, por lo tanto, un número creciente de oportunidades para influir en todas las fases de descubrimiento de fármacos a través de la bioinformática para descubrir y desarrollar fármacos seguros y eficaces del futuro.¹¹

Bases de la Bioinformática Estructural

Para poder generar modelos que permitan simular in-silico (simulación por computadora) lo que ocurre in-vivo. Inicialmente se deben entender las estructuras de las biomacromoléculas y sus posibles interacciones (a partir de bases fisicoquímicas que determinan las interacciones moleculares).⁸³

Y en el procedimiento de modelado de un sistema, debemos tener en cuenta al menos uno de los siguientes criterios para hacer el modelo cercano al sistema natural.⁸⁴

Un aumento de la estabilidad: La estabilidad es un término muy amplio que incluye estabilidad estructural, estabilidad energética, estabilidad potencial, etc. Durante el modelado, la significación termodinámica (energética) de la estabilidad, pretende que la energía del sistema sea lo más baja posible.⁸⁴

Simetría: A la naturaleza le gusta la simetría y le disgusta la identidad. Para ser más precisos, podemos decir que en la naturaleza no hay dos materiales idénticos, pero pueden ser simétricos.⁸⁴

Cuantización: Este término se refiere a la fijación. Para un sistema estable, todo se cuantifica. Se cuantifican las propiedades, cualidades, cantidades, influencias, etc.⁸⁴

Homogeneidad: Existen una serie de procesos naturales tales como difusión, disolución, etc., que están asociados con la reasignación de partículas de una manera homogénea.⁸⁴

Las simulaciones teóricas reproducen un fenómeno o un evento atómico-molecular que sucede en la naturaleza, por medio de ecuaciones de movimiento del sistema, solucionadas por computadora. Además, cabe recalcar que la incapacidad de recoger evidencia experimental directa de un sistema atómico-molecular, en ciertos casos, se puede compensar por medio de simulaciones teóricas.⁸⁵

El modelamiento de sistemas atómico-moleculares se realiza a nivel atómico, usando herramientas de mecánica molecular, o a nivel electrónico, usando herramientas de mecánica cuántica. En los últimos años, las simulaciones mediante mecánica molecular y mecánica cuántica han colaborado notoriamente en el desarrollo de la química y la bioquímica. La predicción de estructuras moleculares, interacciones moleculares y la predicción de la función, son unos de los mayores logros de las simulaciones.⁸⁵

El desarrollo de computadoras cada vez más eficientes contribuyó al desarrollo de algoritmos computacionales basados en la mecánica cuántica. Estos algoritmos permiten el estudio detallado de las propiedades de pequeñas moléculas, pero por su alto costo computacional su aplicación se limita a moléculas de menos de 100 átomos y de unas pocas conformaciones. Mientras que la molécula crece, como las proteínas, que van desde unos pocos miles a cientos de miles de átomos, el número de conformaciones crece de manera abrupta. Es así que para poder trabajar de manera eficiente con biomacromoléculas se desarrollaron diferentes potenciales, denominados clásicos, que modelan las interacciones de manera simplificada, pero que se ajustan bien a los resultados experimentales y a lo esperado por la mecánica cuántica.⁸³

La simulación por computadora de sistemas tales como biomoléculas, polímeros, fármacos, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, entre otros; puede ser muy eficazmente utilizada para resolver complejos problemas químicos y biológicos, como:⁸⁴

- Energías y estructuras moleculares.
- Optimización de la geometría.
- Cargas atómicas y potencial electrostático.
- Vías de reacción.
- Modelamiento de las propiedades superficiales, entre otros.⁸⁴

Con la bioinformática estructural no sólo se puede obtener un modelado molecular, sino que verifica la cooperación entre la investigación teórica y la experimental. Por otro lado, el rápido desarrollo de las computadoras y los costos cada vez más bajos, hacen que el uso de estos métodos sea muy atractivo y prometedor.⁸⁵

2.8. Mecánica Cuántica

Muchos eventos a escalas subatómicas no pueden ser explicados por la mecánica clásica, especialmente si están relacionados a perturbaciones de la densidad electrónica, a la formación o a la ruptura de enlaces covalentes, haciendo necesario que la mecánica cuántica describa el sistema.⁸⁵

El punto de inicio para cualquier problema de mecánica cuántica, es la ecuación de Schrodinger,⁸⁶ que fue desarrollada en 1925 por Erwin Schrodinger⁸⁴. La forma de esta ecuación dependiente del tiempo, se refiere a una partícula (como un electrón), que posee una masa, y que se mueve a través del espacio y en el tiempo, bajo la influencia de un campo externo (que puede ser el potencial electrostático debido al núcleo de la molécula). La función de onda, es una parte de la ecuación, esta caracteriza el movimiento de la partícula, y a partir de esta se pueden derivar varias propiedades de las partículas.⁸⁶

La ecuación de Schrodinger es muy complicada de resolver, pero es exacta, sin embargo sólo se pueden resolver problemas de átomos como el hidrógeno, es así que se desarrollaron otros cálculos, que son aproximaciones que se basan en ella, pero pueden conducir a predicciones de casi todos los fenómenos químicos.⁸⁷

Es así que a partir de la ecuación de Schrodinger es posible modelar aspectos funcionales a nivel electrónico, como una reacción de hidrólisis, una reacción de óxido/reducción, reacciones químicas, reacciones bioquímicas, entre otros. Pero su uso se limita debido a que las simulaciones por mecánica cuántica requieren un mayor costo computacional por el mayor número de grados de libertad asociado.⁸⁵ Es decir, la resolución es muy difícil.

2.8.1. Cálculos de Mecánica Cuántica

Cálculos Ab Initio

El término *Ab initio* es el término latino que significa "desde el principio", y es el nombre que se da a cálculos que se derivan directamente de principios teóricos (la ecuación de Schrödinger), sin incluir datos experimentales. Este método, de hecho, puede ser visto como un método mecánico cuántico aproximado. Las aproximaciones hechas en este método son generalmente aproximaciones matemáticas, tales como usar una forma funcional más simple para una función, o conseguir una solución

aproximada a una ecuación diferencial. El aspecto favorable de los métodos *ab initio* es que finalmente convergen a la solución exacta, una vez que todas las aproximaciones se hacen suficientemente pequeñas en magnitud. Y el aspecto desfavorable es que son costosos, estos métodos a menudo toman enormes cantidades de tiempo de CPU de la computadora, memoria y espacio en disco. El tipo más común de cálculo *ab initio* se denomina cálculo Hartree Fock (HF). Y un método *ab initio* alternativo es la Teoría Funcional de Densidad (DFT), en la que la energía total se expresa en términos de la densidad electrónica total, en lugar de la función de onda.⁸⁴

Cálculos Semiempíricos

Los métodos semiempíricos usan un cierto número de datos experimentales para el cálculo, lo que hace que su velocidad se acelere dramáticamente. Y son usados para sistemas grandes ya que puede manejar grandes cantidades de cálculos.⁸⁸ El mérito de los cálculos semi-empíricos es que son mucho más rápidos que los cálculos *ab initio*. Sin embargo, los resultados de los cálculos semi-empíricos pueden ser ligeramente defectuosos.⁸⁴ Algunas diferencias entre los cálculos *Ab initio* y Semiempíricos, son las que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2.1: Comparación de los Cálculos *Ab Inito* y Semiempíricos

| <i>Ab Inito</i> | Semiempíricos |
|--|---|
| Cuenta todos los electrones. | Ignora algunos electrones (simplificación). |
| Limitado a decenas de átomos y con un mejor desenvolvimiento usando una supercomputadora. | Limitado a centenas de átomos. |
| Pueden ser aplicados a compontes inorgánicos, orgánicos, órgano-metálicos y fragmentos moleculares (los componentes catalíticos de los componentes de una enzima). | Puede ser aplicado a compuestos inorgánicos, orgánicos, órgano-metálicos y pequeños oligómeros (péptidos, nucleótidos). |
| Aplicable a estados basales, de transición y excitados. | Aplicable a estados basales, de transición y excitados. |

2.8.2. La Teoría del Funcional de la Densidad

Los cálculos convencionales de las propiedades moleculares están basados en la descripción del movimiento individual de los electrones, por lo que los métodos son

matemáticamente complicados.⁸⁷

Respecto a la ecuación de Schrodinger, W. Kohn demostró que no es necesario considerar el movimiento individual de cada electrón, sino que es suficiente conocer el número promedio de los electrones localizados en cualquier punto del espacio, lo que dio lugar a un método computacionalmente más sencillo, la Teoría del Funcional de Densidad (DFT). Es así que, la simplicidad del método ha hecho posible estudiar moléculas complejas como las proteínas o estudiar reacciones enzimáticas.⁸⁷

La Teoría Funcional de la Densidad (DFT) nos permite calcular todas las propiedades de los sistemas a partir de la densidad electrónica. Y se denomina así, dado que la densidad es la función de la función de onda y una funcional es una función de otra función. Además el cuadrado de la función de onda, de hecho, es una medida directa de la densidad electrónica. Y la densidad de electrones es más atractiva y eficaz en la explicación de propiedades, ya que es mensurable y sólo depende de los ejes cartesianos, x , y , z . (Es decir, para un sistema con N electrones, la densidad electrónica depende de $3N$ variables o $4N$ si cuenta en spin).⁸⁴

La DFT, similar a los métodos *ab initio*, es no paramétrica, es decir, es aplicable a cualquier molécula. Pero, las demandas computacionales con métodos DFT son mucho menores que con métodos *ab initio* de calidad similar.⁸⁴

2.8.3. Aplicaciones

Para las aplicaciones se requiere un programa de cálculo como Gaussian, Gamess u otro; implementado en una computadora con una velocidad de proceso superior a 1MHz y RAM 256 MB.⁸⁷

Inicialmente se dibuja la molécula en estudio, una molécula inexacta en su geometría. Esta etapa puede considerarse como el Diseño Molecular.⁸⁷

Posteriormente se elige un método de cálculo (HF, DFT, etc.) y se programa a la computadora para que determine la geometría de la molécula y se genera el cálculo químico-cuántico. El tiempo de cálculo dependerá del tamaño molecular, el método elegido (modelo teórico), el conjunto de funciones de base (set de bases) y la exactitud que se requiera.⁸⁷

Con los resultados calculados, la imagen inexacta inicial se reformula a una estructura correcta, para la cual existe una función de onda resuelta. Los valores obtenidos

se conocen como parámetros optimizados a la geometría de equilibrio en el estado fundamental, si se estudia la molécula aislada. Además, la energía electrónica corresponderá también al estado fundamental.⁸⁷

Finalmente, con los valores geométricos optimizados, se programa a la computadora para calcular las diferentes propiedades electrónicas deseadas, como:⁸⁷

- Los parámetros geométricos.
- La densidad electrónica.
- Parámetros espectroscópicos.
- Energía electrónica.
- Propiedades termoquímicas y termodinámicas.
- Etc.

Además también se pueden calcular las cargas, con el método de análisis poblacional, que estima las cargas atómicas parciales o la densidad electrónica orbital a partir de cálculos basados en la combinación lineal del método orbital molecular de los orbitales atómicos. El análisis de la población de Mulliken es el tipo más común de este cálculo,⁸⁴ pero existen otros como el de Hirshfeld.

Set de Bases

El set de bases es un conjunto de funciones matemáticas (funciones base), cuyas combinaciones lineales producen orbitales moleculares.⁸⁹ Las funciones base se utilizan para representar la función de onda electrónica en el método Hartree-Fock, o en la DFT para convertir las ecuaciones diferenciales parciales del modelo en ecuaciones algebraicas adecuadas para una implementación eficiente en un ordenador.⁹⁰

Existen dos tipos de funciones base comúnmente utilizadas en cálculos de estructuras electrónicas: orbitales de tipo Slater (STO) y orbitales de tipo gaussiano (GTO).⁹¹ Ambas funciones son matemáticamente las más simples, y se utilizan actualmente como funciones base en cálculos moleculares.⁸⁹ Sin embargo, en términos de eficiencia computacional, las GTO son preferidas y se usan casi universalmente como funciones de base en los cálculos de la estructura electrónica.⁹¹

Al realizar un cálculo, primero se elige el tipo de función (STO / GTO) y posteriormente se elige el número de funciones que se van a utilizar. El número más pequeño posible de funciones es el set de base mínimo, luego siguen los sets de bases con duplicación de todas las funciones de base, llamados set de base tipo Doble Zeta (DZ), luego, los siguientes pasos en el tamaño del conjunto de base son Triple Zeta (TZ), Cuádruple Zeta (QZ) y Quintuple o Pentuple Zeta (PZ o 5Z, pero no QZ). Duplicar el número de funciones de base permite una descripción mucho mejor del hecho de que la distribución del electrón es diferente en diferentes direcciones.⁹¹ Es decir, al ir subiendo los niveles, se obtiene una mejor descripción.

Modelo teórico

El modelo teórico o método, es el camino para modelar un sistema usando un conjunto de aproximaciones específicas. Estas aproximaciones son combinadas con un algoritmo de cálculo y son aplicados a orbitales atómicos, definidos por el set de bases.⁸⁸

En Gaussian, los métodos pueden ser separados en cuatro categorías principales: semiempíricos, *ab initio*, funcionales de la densidad (DFT) y mecánica molecular. La selección del modelo teórico depende del tamaño del sistema y el nivel de aproximación.⁸⁸

Los métodos DFT son cada vez más populares porque los resultados obtenidos son comparables a los métodos *ab initio*, pero el tiempo de CPU es drásticamente reducido. Algunos ejemplos de métodos son: VWN, PW91, B3LYP, CAMB3LYP.⁸⁸

Análisis Poblacional de Hirshfeld

El análisis poblacional de Hirshfeld (HPA) es un tipo de análisis para calcular cargas, que generalmente produce Funciones Fukui (FF) condensadas no negativas (es decir es físicamente más realista).⁹²

Y estudios computacionales sugieren que el HPA, es mucho mejor que el análisis poblacional de Mulliken (MPA) y el análisis poblacional de Lowdin. Argumentando que sólo el HPA produce índices de función de Fukui (FF) condensados no negativos en todos los sistemas químicos estudiados hasta la fecha, mientras que los otros esquemas de análisis de población generan índices de FF condensados negativos en algunos casos.⁹²

2.9. Mecánica Molecular

Los métodos, denominados mecánica molecular, establecen una expresión algebraica simple para la energía total de un compuesto, sin necesidad de calcular una función de onda o densidad electrónica total. Es decir, la expresión de la energía consiste en ecuaciones clásicas simples.⁸⁴

Todas las constantes de estas ecuaciones deben obtenerse a partir de datos experimentales o de un cálculo *ab initio*. En un método de mecánica molecular, la base de datos de los compuestos utilizados para parametrizar el método (un conjunto de parámetros y funciones que se denomina campo de fuerza) es crucial para su éxito. Además, los métodos de la mecánica molecular son parametrizados de acuerdo a la clase específica de moléculas, tales como proteínas, moléculas orgánicas, organometálicas, etc.⁸⁴

La ventaja de la mecánica molecular radica en la simplicidad de las ecuaciones y de sus métodos numéricos requeridos para la solución de problemas. Su mayor limitación es que la mecánica molecular aplica las leyes de la física clásica; por lo tanto, solo es capaz de describir fenómenos de escala atómica/molecular o mayor, sin que intervengan perturbaciones considerables de densidad electrónica, usualmente, asociadas a la formación o ruptura de enlaces covalentes.⁸⁵

La mecánica molecular calcula la estructura y la energía de las moléculas basadas en movimientos nucleares. Donde, los electrones no se consideran explícitamente, sino que se asume que encontrarán su distribución óptima una vez que se conocen las posiciones de los núcleos. Se supone que los electrones se mueven lo suficientemente rápido para adaptarse a cualquier movimiento de los núcleos.⁸⁴ Además, algunas ideas que se asumen en la mecánica molecular son las siguientes:

- Los núcleos y electrones se agrupan y se tratan como partículas atómicas unificadas.
- Las partículas de tipo átomo se tratan como bolas esféricas.
- Los enlaces entre partículas se ven como resortes.
- Las funciones potenciales y los parámetros utilizados para evaluar las interacciones se denominan campos de fuerza.
- La suma de interacciones determina la conformación de partículas atómicas.⁸⁴

La mecánica molecular permite el modelado de moléculas muy grandes, como las proteínas y segmentos de ADN, por lo que es la herramienta principal de los bioquímicos computacionales. El defecto de este método es que hay muchas propiedades químicas que ni siquiera se definen dentro del método, tales como estados excitados electrónicos. Para trabajar con sistemas extremadamente grandes y complicados, a menudo la mayoría de los paquetes de software de mecánica molecular tienen interfaces gráficas muy potentes y fáciles de usar.⁸⁴

Podríamos resumir las consideraciones mínimas para trabajar en mecánica molecular como:

- Ignora todos los electrones.
- Sólo los núcleos son tomados en consideración.
- Las moléculas contienen miles de átomos.
- Puede ser aplicado a compuestos inorgánicos, orgánicos, oligonucleótidos, péptidos, metalo-orgánicos e inorgánicos.
- Aplicable sólo al estado basal.
- Propiedades termodinámicas y cinéticas vía dinámica molecular.

2.9.1. Campos de Fuerza

Todos los métodos clásicos de simulación se basan en aproximaciones más o menos empíricas llamadas campos de fuerza, para calcular las interacciones y evaluar la energía potencial del sistema en función de coordenadas atómicas puntuales. Un campo de fuerza consiste en el conjunto de ecuaciones utilizadas para calcular la energía potencial y las fuerzas de las coordenadas de las partículas, así como una colección de parámetros utilizados en las ecuaciones. Para la mayoría de los propósitos, estas aproximaciones funcionan bien, pero no pueden reproducir efectos cuánticos tales como formación o ruptura de enlaces.⁹³

Así mismo, cabe mencionar que un campo de fuerza incluye los siguientes parámetros.

- Masa atómica.
- Carga parcial para átomos individuales.

- Longitud del enlace.
- Ángulo de enlace.
- Ángulos diedros para pares, trillizos y cuadruplicados de átomos unidos.
- Etc. ⁸⁴

Los siguientes son algunos campos de fuerza de mecánica molecular comúnmente usados. ⁹⁴

- **AMBER**: Es un campo de fuerza que fue parametrizado específicamente para proteínas y ácidos nucleicos. Este presenta resultados muy buenos para proteínas y ácidos nucleicos, pero algo erráticos para otros sistemas. ⁹⁴
- **CHARMM**: Es un campo de fuerza que originalmente fue ideado para proteínas y ácidos nucleicos, pero es aplicado a biomoléculas, dinámica molecular, solvatación, embalaje de cristal, análisis vibratorio y estudios de QM / MM. ⁹⁴
- **GROMOS**: El campo de fuerza GROMOS es popular para predecir el movimiento dinámico de moléculas y líquidos, y también se utiliza para modelar biomoléculas. ⁹⁴
- **MMFF**: El campo de fuerza Molecular de Merck es un campo de fuerza de uso general, particularmente popular para las moléculas orgánicas. MMFF94 fue originalmente pensado para simulaciones de dinámica molecular, pero también ha usado mucho para la optimización de la geometría. ⁹⁴
- **OPLS**: Potenciales optimizados para la simulación de líquidos (OPLS) es un campo de fuerza diseñado para modelar líquidos. Pero también se ha usado significativamente en el modelado de la dinámica molecular de las biomoléculas. ⁹⁴

2.9.2. Simulación Molecular

La simulación molecular es un experimento computacional, ⁸⁴ muy potente en el modelado molecular moderno, y permite entender la estructura y la dinámica con un alto detalle, donde el movimiento de átomos individuales puede ser rastreado. ⁹³

Los dos métodos más utilizados son la minimización de la energía y la dinámica molecular, que respectivamente se refieren a optimizar la estructura y simular el movimiento natural de las macromoléculas biológicas. ⁹³ Las minimizaciones de energía se

utilizan regularmente para mejorar las estructuras de proteínas tanto experimentales como predichas. Por otra parte, la primera simulación de la dinámica molecular se llevó a cabo en 1957, aunque no fue hasta la década de 1970 que fue posible simular el agua y las biomoléculas.⁹³

Para realizar la simulación de dinámica molecular hay que; 1) elegir y obtener una estructura inicial, 2) prepararla para una simulación, 3) crear una caja de simulación, 4) añadir agua disolvente, 5) realizar minimización de energía, 6) realizar la simulación de producción, y 7) analizar los datos de la trayectoria. Para lo cual, se necesita tener acceso a una máquina Unix/Linux con un paquete de dinámica molecular instalado, como GROMACS.⁹³

Minimización

Habitualmente las estructuras iniciales que se construyen en los simuladores presentan energías mayores a las que tendría un objeto real, por lo que se utilizan algoritmos para calcular las posiciones y fuerzas originales, con el objetivo de minimizarlas y que sean más realistas.⁹⁰

La minimización de la energía de pequeñas moléculas o de sistemas macromoleculares se lleva a cabo por cálculos repetidos sucesivos, con los que se optimiza geoméricamente la conformación inicial del sistema de manera parcial o completa. Los parámetros que definen la geometría del sistema, se modifican en pequeños incrementos hasta que la estructura alcanza un mínimo energético local. Aunque no se puede garantizar que se encuentre la estructura de energía más baja posible, llamada mínimo global. La minimización puede realizarse en base de coordenadas internas (enlaces y ángulos) o en coordenadas Cartesianas (cada átomo está caracterizado por unas coordenadas x, y y z; donde se mueven con pequeños incrementos a lo largo de estos ejes). Una de las ventajas de minimizar en coordenadas internas es que se pueden simular bien los movimientos cooperativos de varios átomos o grupos de átomos y se reduce el riesgo de que las moléculas queden atrapadas en falsos mínimos.⁹⁵

Dinámica

Respecto a la dinámica molecular, cada átomo puede ser considerado como una partícula, cuyo movimiento está determinado por las fuerzas que sobre ella ejercen todos los otros átomos de su entorno. Dadas las posiciones y velocidades de las partículas, así como la magnitud y dirección de las fuerzas que actúan sobre cada una de

ellas en un instante determinado, por integración de las ecuaciones del movimiento de la mecánica clásica se pueden obtener la posición y la velocidad en un instante ligeramente posterior. Y tomando pasos de tiempo sucesivos se puede construir una trayectoria dependiente del tiempo para todos los átomos, que representa el movimiento de los mismos.⁹⁵

Hoy día, los cálculos de DM incluyen moléculas de disolvente (generalmente agua) e iones, con el propósito de modelar las moléculas en disolución lo más real posible. La omisión del agua en el modelo puede conllevar a fenómenos que no es probable que ocurran en una disolución real. Los sistemas modelados contienen normalmente unos pocos miles de átomos como máximo, pero los sistemas que se pretenden representar poseen dimensiones prácticamente infinitas, por lo que se crean copias del modelo (generalmente un paralelepípedo rectangular), donde se repiten periódicamente en todas las direcciones. De esta forma, cada paralelepípedo es una imagen del sistema, que se encuentra en condiciones de límite periódico. Lo que garantiza que todos los átomos se encuentren rodeados de átomos vecinos, ya sean los del modelo original o imágenes de los mismos, que se encuentran más allá de los límites, y cuando una molécula abandona la caja por una cara, se introduzca de nuevo en ella por la cara opuesta, de modo que el número total de partículas se mantiene constante.⁹⁵

La forma más simple de dinámica molecular ocurre en el ensamble microcanónico, en el que la energía total del sistema se conserva, así como el volumen y el número de partículas. El ensamble microcanónico (NVE) es difícil de realizar experimentalmente. Por lo que generalmente los sistemas se suelen simular en condiciones de temperatura y volumen constantes (ensamble canónico o NVT) o de temperatura y presión constantes (ensamble NPT), ya que éstas son las condiciones en las que se realizan la mayor parte de los experimentos.⁹⁵

La dinámica molecular permite la visualización del movimiento de partículas, las cuales presentan una trayectoria discreta en el tiempo y para cada paso de tiempo se integra la posición y la velocidad con un método como la integración de Verlet.

Análisis de Trayectoria - RMSD

Una de las propiedades fundamentales más importantes a analizar es si la proteína es estable y cercana a la estructura experimental. La forma estándar de medir esto es el desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de todos los átomos pesados con respecto a la estructura de rayos X.⁹³

Es decir, la desviación cuadrática media o Root Mean Square Deviation, (RMSD) permite determinar la cantidad en la que una selección de átomos o moléculas se desvía de una posición definida en el espacio con respecto a su posición inicial, relacionando la medición numérica de la diferencia posicional entre dos estructuras.⁹⁶ Y para obtener una mejor medida se crea primero una estructura promedio.⁹³

2.9.3. *Docking* Molecular

El *docking* o acoplamiento molecular es una herramienta clave en la bioinformática estructural y en el diseño de fármacos asistidos por ordenador. El objetivo del software de acoplamiento molecular automatizado es entender y predecir el reconocimiento molecular estructural, encontrar modos de unión probables energéticamente (el modo de unión con la energía de interacción más baja posible para un ligando dado), y predecir la afinidad de unión. El acoplamiento molecular se realiza generalmente entre una molécula pequeña y una macromolécula objetivo.⁹³

A medida que se fueron cristalizando y analizando complejos macromolécula-ligando, se fueron estableciendo las características generales de su unión, y se descubrió que el ligando se une en una posición por muchas interacciones con diferentes grupos del receptor, grupos que en el caso de las proteínas pueden estar ampliamente dispersos en la secuencia de aminoácidos. Las contribuciones individuales de cada grupo a la energía total de unión pueden ser débiles pero la suma de todas ellas puede hacer que el ligando se una muy firmemente.⁹⁵

Además, una vez modelados los complejos, es necesario minimizar su energía, permitiendo la relajación de todos los átomos, lo que proporciona una mayor verosimilitud.⁹⁵ Por otra parte, cuando el acoplamiento molecular se utiliza como etapa final en la exploración virtual, ayuda a proporcionar una hipótesis estructural tridimensional (3D), de cómo interactúa un ligando con su objetivo.⁹³

El éxito de este método se mide a menudo en términos de la desviación cuadrática media (RMSD) de las coordenadas cartesianas de los átomos del ligando en las conformaciones acoplada y cristalográfica. Un acoplamiento generalmente se considera como acertado si esto es menos que el umbral algo arbitrario de 2Å .⁹³

Las etapas clave en el acoplamiento son: 1) selección y preparación de objetivos, 2) selección y preparación de ligandos, 3) configuración de acoplamiento y 4) evaluación de resultados de acoplamiento. Y las metodologías más citadas son: AutoDock, DOCK, FlexX, GOLD, y ICM.⁹³

Capítulo 3

Metodología

3.1. Materiales

3.1.1. Equipos

Un Workstation que contiene un procesador E7 de 3.0 GH, una memoria RAM de 64Gb, tres discos duros de 1 Gb, 4 Gb y 6 Gb, cuatro tarjetas aceleradoras de video NVidia GTX 980. Además, el Workstation tiene instalado el sistema operativo Linux.

3.1.2. Software Computacionales

- **Gauss View:** Es una interfaz gráfica de visualización perteneciente a Gaussian. Esta interfaz permite construir moléculas, elaborar archivos de entrada de Gaussian, subir los archivos de entrada de Gaussian, ejecutar cálculos de Gaussian desde la interfaz gráfica sin la necesidad de utilizar los comandos, y examinar gráficamente los resultados obtenidos en Gaussian (como animar vibraciones, plotear propiedades, etc.).⁸⁸
- **Gaussian 09:** Es un software que realiza cálculos de una estructura electrónica, este es capaz de predecir muchas propiedades de átomos, moléculas y sistemas reactivos; como su energía, sus estructuras (optimización de la geometría), las frecuencias vibracionales, etc. Para realizar los cálculos utiliza métodos *ab initio*, teoría funcional de la densidad, semi-empíricos, de mecánica molecular e híbridos. Recalcando que mientras los cálculos son más precisos, el costo

computacional es mucho mayor.⁸⁸

- **Chimera:** Es un programa de visualización interactiva y de análisis de estructuras moleculares y datos relacionados. Este programa incluye mapas de densidad, alineamientos de secuencia, resultados de acoplamientos, trayectorias y unidades conformacionales. Además con él se pueden generar imágenes y animaciones de alta calidad.⁹⁷⁻¹⁰⁷
- **Gromacs:** Es un programa que realiza dinámicas moleculares, es decir, simula las ecuaciones newtonianas de movimiento para sistemas con cientos o millones de partículas. Este software está diseñado principalmente para moléculas bioquímicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que tienen una gran cantidad de complicadas interacciones enlazadas. Además proporciona un rendimiento extremadamente alto en comparación con todos los demás programas.¹⁰⁸⁻¹¹⁴
- **Autodock:** Es un programa diseñado para predecir como pequeñas moléculas (como sustratos o fármacos) se unen a un receptor de estructura 3D conocida. Además es muy rápido, proporciona predicciones de alta calidad de las conformaciones de ligandos y buenas correlaciones entre las constantes de inhibición previstas y las experimentales. AutoDock también ha demostrado ser útil en acoplamiento ciego, donde la ubicación del sitio de unión no se conoce.¹¹⁵

3.1.3. Servidores en Internet

- **APBS:** Este servidor permite realizar cálculos electrostáticos, y muestra como resultado un mapa de potencial electrostático, el cual puede ser coloreado, mostrando las superficies moleculares de distinto color según el potencial electrostático que presentan.⁹⁷⁻¹⁰⁷
- **Rampage:** Es un servidor que permite visualizar el gráfico de Ramachandran, en el cual se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos Ψ contra ϕ en los aminoácidos de un polipéptido, los que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas, por lo tanto, también permite aproximar cuál sería la estructura secundaria del péptido.^{116,117}

3.2. Metodología

3.2.1. Optimización del Fármaco

Se construyó el fármaco (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona (PF-04859989) en el programa Gauss View, respetando la estructura encontrada en bibliografía, y así se generó un archivo .gjf. Con el archivo (.gjf) obtenido se procedió a optimizar la estructura del fármaco, para lo cual se usó el programa Gaussian, ya que se priorizó una optimización geométrica y energética se usó la funcional CAM-B3LYP, que presenta errores más pequeños para las energías y se usó el set de bases TZVP para obtener un mejor resultado. Obteniendo un archivo .log, que posteriormente fue convertido a .pdb. Además, la funcional CAM-B3LYP, combina las cualidades híbridas de B3LYP y la corrección de largo alcance (LC) a través del método de atenuación de Coulomb (CAM), la corrección es importante ya que la utilización de funcionales DFT convencionales acarrea una representación errónea de la polarización. TZVP significa triple zeta; donde zeta es el exponente de la función gaussiana y solo cambia el tamaño del orbital pero no cambia la forma del orbital, además TZVP presenta una función de onda más precisa que en otros set de bases, sin embargo hay que tener en cuenta que el tiempo de computación también es más alto.

Paralelamente se calcularon las cargas de Hirshfeld del fármaco PF-04859989, en el programa Gaussian, a partir del archivo .gjf, es decir a partir de la construcción inicial del fármaco, pero para obtenerlas se adicionó un parámetro (CAM-B3LYP/TZVP Sp Pop=Hirshfeld), ya que sin este el programa brinda un archivo .log con las cargas de Mulliken por defecto. Y como se mencionó anteriormente, el análisis poblacional de Hirshfeld es mucho mejor que el análisis poblacional de Mulliken (es decir es físicamente más realista).

Con las características del fármaco PF-04859989, obtenidas a partir del archivo .pdb (distancias de enlaces, ángulos) y del segundo archivo .log (cargas de Hirshfeld de los átomos) se declaró el campo de fuerza del fármaco, completando los archivos atomtypes.atp, aminoacids.rtp, ffbonded.itp y ffnonbonded.itp del programa Gromacs. Cabe resaltar que para completar los archivos de manera rápida se usó la hoja de cálculo Xmark, que permite obtener la mayoría de los valores completando sólo algunos iniciales (como nombres, enlaces, distancias de enlaces y ángulos). Luego de declarar los campos de fuerza, se realizó una minimización de 500 ns en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito (que considera detalles de cada molécula del disolvente) y utilizando la Integración Verlet, obteniendo

un archivo .gro, al cual se le realizó una simulación de dinámica molecular de 500 ns, en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito, utilizando la Integración Verlet y el termostato de Nose-Hoover. Obteniendo un segundo archivo .gro, que fue convertido a .pdb. Es importante considerar, que se usó una caja de 3x3x3 y se usó como solvente el agua modelo spc especificando -cs spc216.gro.

Además, también debemos considerar que el ensamble canónico ofrece una representación más próxima a las situaciones físicas reales, y que presenta el volumen, el número de partículas y la temperatura constantes. Adicionalmente el sistema está en contacto con el termostato de Nose-Hoover (que en realidad es un algoritmo) para mantener la temperatura constante, y se utilizó la integración de Verlet (que es un método usado para integrar las ecuaciones de Newton de movimiento), ya que proporciona una buena estabilidad numérica, reversibilidad en el tiempo, la preservación de la forma simpléctica en el espacio de fase y no presenta un mayor costo computacional. Para confirmar la calidad del cálculo se realizó una evaluación RMSD con la estructura promedio, dentro del programa Gromacs. Resaltando que el RMSD no sólo se utiliza para proteínas sino también para moléculas orgánicas pequeñas (como nuestro fármaco).

3.2.2. Modelamiento Estructural de KAT I

Se realizó la búsqueda de la estructura 3D de la enzima KAT I unida al co-factor PLP, en las bases de datos RCSB PDB (Protein Data Bank) disponible en <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, y NCBI (National Center of Biotechnology Information) disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, con el fin de obtener los mejores archivos .fasta y .pdb de dicha enzima.

A partir del .pdb, se completaron los aminoácidos faltantes de la enzima en el programa Chimera y se obtuvo un nuevo archivo .pdb. Paralelamente se construyó en GaussView una lisina unida al PLP, como se apreciaba en el archivo .pdb que se encontró. Además a la lisina unida al PLP se le nombró como LMP. Y con el archivo .gjf que se construyó en GaussView, se optimizó la geometría y se obtuvieron las cargas de Hirshfeld del LMP, en el programa Gaussian, utilizando los mismos parámetros que se usaron para optimizar la estructura y obtener las cargas del fármaco.

El archivo .log de la optimización se convirtió a .pdb, y a partir de este se obtuvieron los datos de los ángulos y las distancias de los enlaces. A partir del .log de las cargas de Hirshfeld, se obtuvieron las cargas de los átomos del LMP. Con

los datos obtenidos se declaró el campo de fuerza del LMP, completando los archivos `atomtypes.atp`, `aminoacids.rtp`, `ffbonded.itp` y `ffnonbonded.itp` del sistema OPLS-AA del programa Gromacs. Luego se realizó una minimización de 200 ns en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito y utilizando la Integración Verlet, obteniendo un archivo `.gro`, al cual se le realizó una simulación de dinámica molecular de 50 ns, en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito, utilizando la Integración Verlet y el termostato de Nose-Hoover. Obteniendo un segundo archivo `.gro`, que fue convertido a `.pdb`.

Además, para este proceso se usó una caja de $15 \times 15 \times 15$ y se usó como solvente el agua modelo `spc` especificando `-cs spc216.gro`. Por otra parte, para confirmar la calidad del cálculo se realizó una evaluación RMSD con la estructura promedio. Ya que la evaluación RMSD se usa como una medida cuantitativa de la similitud entre dos o más estructuras moleculares, como nuestra enzima, para valorar cuán bien la estructura presentada coincide con la estructura objetivo conocida. Por lo tanto, cuanto menor es la RMSD, mejor es el modelo en comparación con la estructura objetivo.

También se realizó una evaluación RMSF para evaluar la fluctuación de cada aminoácido. La raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) es una medida de la desviación entre la posición de una partícula y alguna referencia previa de dicha posición. Es decir este análisis resaltarán las porciones de estructura que están fluctuando (más o menos) con referencia a la estructura media. Además, la diferencia entre el RMSD y el RMSF, es que en este último se promedia tiempo, dando un valor para cada partícula; y en el RMSD el promedio es tomado sobre las partículas, dando valores específicos de tiempo.

Adicionalmente se realizó una evaluación DSSP para apreciar la estructura secundaria de la enzima. DSSP significa Definir la Estructura Secundaria de las Proteínas, y es un método para atribuir una estructura secundaria a los aminoácidos de la proteína en estudio, en nuestro caso, la enzima KAT I. El DSSP comienza identificando los enlaces de hidrógeno dentro de la cadena principal de la proteína y en base a esto, se asignan ocho tipos de estructuras secundarias: α hélice, hélice π , 3₁₀ hélice, puentes beta, láminas beta, coil (bucles), giros, bend (para regiones de alta curvatura).

Y para confirmar la calidad de la estructura de la enzima se realizó una evaluación Ramachandrán. El gráfico de Ramachandrán es una forma de visualizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos diedros Ψ de la estructura contra los ángulos diedros ϕ , de los aminoácidos en la estructura de la proteína, en nuestro

caso la enzima KAT-I. Además, tomamos en consideración, que el área permitida para la Gly (glicina) es considerablemente más grande y que para la Pro (prolina), el gráfico muestra un número limitado de combinaciones posibles de los ángulos Ψ y ϕ . En esta evaluación se tomó en consideración que, el sitio de unión al sustrato de KAT-I consiste en una región de residuos aromáticos que son Trp18, Tyr101 y Phe125 de un monómero, y Tyr63, Phe278 e His279 del segundo monómero en el que se inserta la cadena lateral del sustrato. Además, otro aminoácido muy importante es la lisina catalítica (del centro activo) que es el aminoácido 247 (Lys 247), el cual como estaba unido al cofactor PLP, lo nombramos LMP. Todas estas consideraciones fueron tomadas para verificar posteriormente si estos se encontraban las regiones favorecidas o permitidas, ya que son de suma importancia.

3.2.3. Acoplamiento del Fármaco con el Receptor

Se realizó un acoplamiento o docking, a partir del archivo promedio .pdb del fármaco y el archivo promedio .pdb de la enzima, en el programa Autodock. Para lo cual se generaron dos archivos .pdbqt a partir de los archivos .pdb antes mencionados. Y se tomó en consideración en la opción Dash Board, que el centro activo de dicha enzima se encuentra en la lisina 247, que está unida covalentemente con un enlace de base Schiff al cofactor PLP. Además, por la presencia de dicho cofactor, se modificaron los parámetros del archivo de grid .gpf de Autodock, incorporando la frase *for every atom involved* para que el programa pueda reconocer al fósforo; adicionalmente en la interface del programa se adicionó al fósforo, yendo inicialmente a la opción Grid, luego Set, luego Map Types y finalmente Direct. Adicionalmente, cabe resaltar que se escogieron las opciones Run- Run Autogrid y Run- Autodock, para generar un archivo .dlg que contenga los acoplamientos. A partir de este archivo final .dlg generado en el proceso del docking (no del grid), se escogió el acoplamiento con menor energía de los 50 acoplamientos obtenidos.

A partir del acoplamiento escogido, se generó un archivo .pdb (enzima-fármaco), que se estabilizó con una minimización de 200 ns, en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito y utilizando la Integración Verlet, obteniendo un archivo .gro. Con el archivo .gro se realizó una simulación de dinámica molecular de 10 ns, en el programa Gromacs, dentro del ensamble canónico, con solvente explícito, utilizando la Integración Verlet y el termostato de Nose-Hoover. Obteniendo un segundo archivo .gro, que fue convertido a .pdb.

Cabe recalcar, que en este proceso también se usó una caja de 15x15x15 y se usó

como solvente el agua modelo spc especificando -cs spc216.gro. Además, para confirmar la calidad del acoplamiento se realizó una evaluación RMSD tras la simulación de dinámica molecular, dentro del programa Gromacs. Recordando que el criterio de aceptación, es un RMSD menor 2Å

3.2.4. Evaluación de las Propiedades

A partir del archivo final .pdb del acoplamiento ya estabilizado, se evaluó el potencial electrostático, utilizando el software APBS. El mapa obtenido se coloreó de azul, blanco y rojo (positivo, neutro y negativo); para distinguir los diferentes potenciales electrostáticos en el acoplamiento. Es importante evaluar el potencial electrostático para describir o validar el posible comportamiento de la macromolécula (en nuestro caso el del acoplamiento), siempre tomando en cuenta ciertos conceptos de la electrostática clásica y la electrostática de macromoléculas, como que sobre la superficie de las macromoléculas se generan potenciales eléctricos, por los residuos cargados, que influyen en su conformación y propiedades.

Además, se reconocieron los puentes de hidrógeno del acoplamiento. Ya que los puentes de hidrógeno son enlaces que se dan entre moléculas (fármaco-enzima), y como se desea evaluar la interacción entre el fármaco y la enzima, evaluar la comunicación entre ambos que apoye la estabilidad de la interacción es importante.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1. Optimización del Fármaco

Mediante el uso del software GaussView en coordenadas cartesianas, se procedió a construir la estructura tridimensional del fármaco de prueba denominado (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona, la cual presentamos en la figura 4.1(a). Con la estructura inicial, iniciamos la búsqueda de la estructura en su estado estacionario o fundamental, normalmente este se halla relacionada a un mínimo en la hipersuperficie de potencial. Para ello se trabajó en el marco de la teoría de funcionales de la densidad, he hicimos uso de la funcional de intercambio de Becke (B3), la correlación de Lee, Yang y Parr (LYP), con una corrección de atenuación coulombica (CAM), y una función de base TZVP.

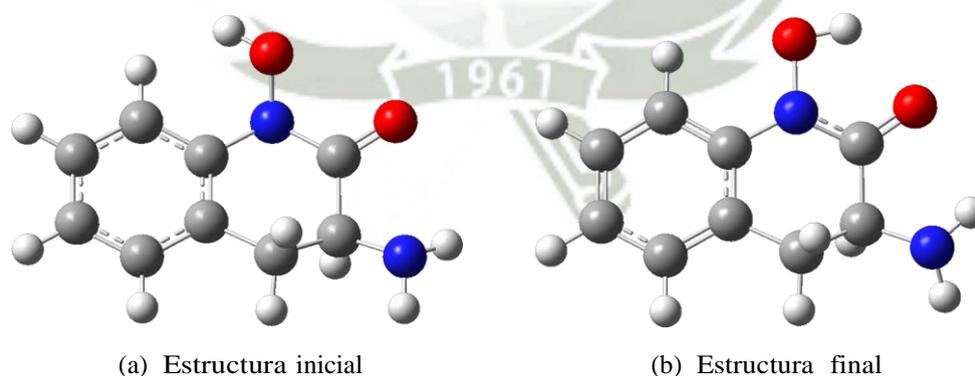


Figura 4.1: Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona visualizado en GaussView.

La optimización de la estructura se realizó en coordenadas cartesianas y no en coordenadas internas, la estructura final obtenida se muestra en la figura 4.1(b).

Tabla 4.1: Cargas de Hirshfeld del Fármaco

| Num. | Átomo | Cargas Hirshfeld |
|-------|-------|------------------|
| 1 | C | 0.045676 |
| 2 | C | -0.012407 |
| 3 | C | -0.048040 |
| 4 | C | -0.055092 |
| 5 | C | -0.044764 |
| 6 | C | -0.054280 |
| 7 | H | 0.050524 |
| 8 | H | 0.050054 |
| 9 | H | 0.052885 |
| 10 | H | 0.052054 |
| 11 | N | 0.006965 |
| 12 | C | -0.061090 |
| 13 | H | 0.046374 |
| 14 | H | 0.046832 |
| 15 | C | 0.025485 |
| 16 | H | 0.040980 |
| 17 | C | 0.187290 |
| 18 | O | -0.163869 |
| 19 | H | 0.161700 |
| 20 | O | -0.299779 |
| 21 | N | -0.244888 |
| 22 | H | 0.113018 |
| 23 | H | 0.104372 |
| Total | | 0.000000 |

Con la estructura optimizada, realizamos un cálculo de frecuencias, para determinar en forma matemática si nos hallábamos en el estado fundamental, en el caso de que algún elemento de la matriz de los Hessianos fuera negativa, estos sería indicativo de que no nos hallamos en un pozo de potencial, en nuestro caso se obtuvo cero frecuencias imaginarias, lo que nos habla de que realmente nos hallamos en un mínimo de la superficie de potencial, una curiosidad del proceso de optimización, es que el hidrógeno del grupo hidroxilo rotó hacia el oxígeno carbonílico de la estructura. Adicionalmente, realizamos el análisis poblacional en la aproximación de las cargas de Hirshfeld, lo que presentamos en la Tabla 4.1.

De nuestro análisis poblacional de Hirshfeld, apreciamos que el átomo con la mayor carga positiva es el C – 17, y el de mayor carga negativa es el O – 20. Estas cargas, son indispensables, para el diseño de los campos de fuerza, que requerimos introducir para nuestros cálculos posteriores. Debido fundamentalmente, a que son parte importante de los términos no enlazantes, de las formas funcionales de los campos de fuerza.

Usando el formalismo del campo de fuerza OPLS-AA, definimos los átomos necesarios para el reconocimiento de nuestro fármaco, esto se introdujo en los archivos que definen los tipos de átomos (archivo atomtypes.atp), su definición interna como molécula (archivo aminoacids.rtp), la naturaleza de las uniones que pueden ser el enlace, el ángulo, el diedro (archivo ffbonded.itp) y la definición de los términos Coulombicos y de Lennard-Johns (archivo ffnonbonded.itp). Como resultado, logramos el reconocimiento de la estructura como se muestra en la figura 4.2(a), a esta estructura, se le realizó una primera minimización en el contexto de la mecánica molecular en la cual se minimiza las fuerzas interactuantes entre los átomos definidos, obteniendo la estructura presentada en la figura 4.2(b).

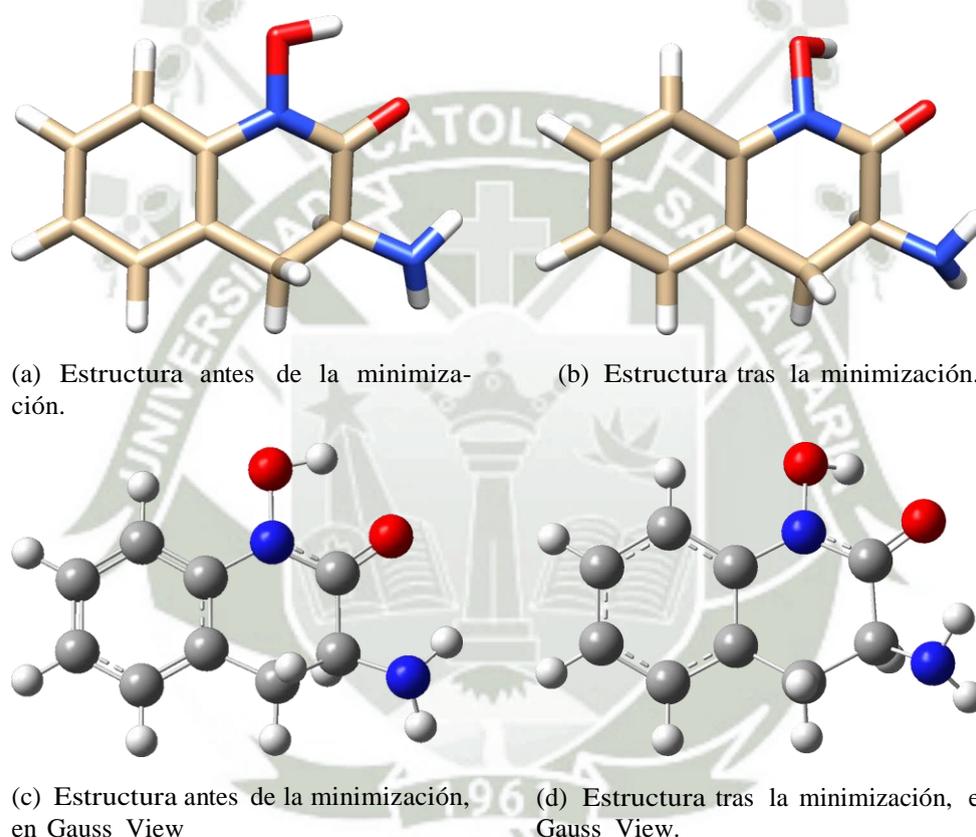


Figura 4.2: Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona visualizado en Chimera y Gauss View.

Para verificar el adecuado funcionamiento del campo de fuerza, se procedió a una simulación de dinámica molecular, de nuestro fármaco en un ensamble Canónico, por un tiempo de simulación de 500ns, a la temperatura de 309.65°K. En la figura 4.3(a), se presenta la estructura final de la simulación de dinámica molecular del fármaco.

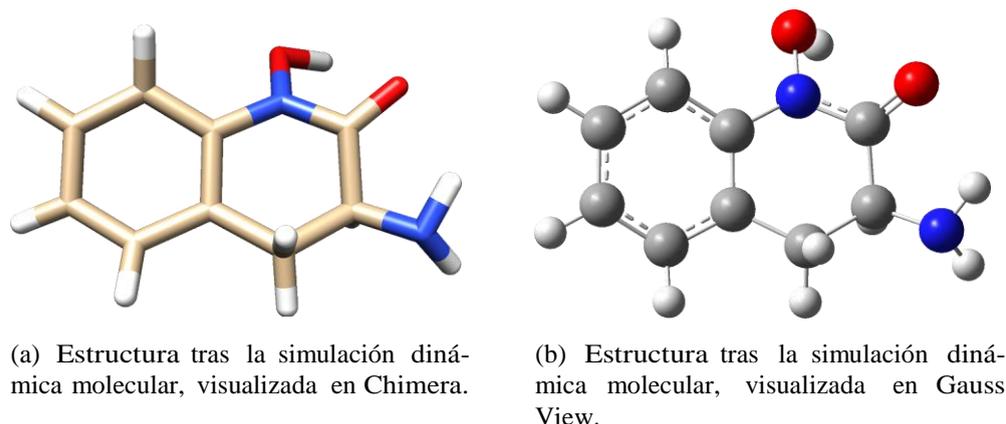


Figura 4.3: Fármaco (3S)-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2(1H)-ona visualizado en Chimera y Gauss View, tras la dinámica.

Una vez realizado la simulación de dinámica molecular, para comprobar si llegamos a la región de equilibrio, calculamos la raíz cuadrada de la desviación media estándar, lo cual presentamos en la figura 4.4, de donde se desprende que llegamos en forma temprana a la zona equilibrio, y con una dispersión no mayor a 0.15nm, por debajo de lo recomendado en la literatura (0.2nm).⁹³

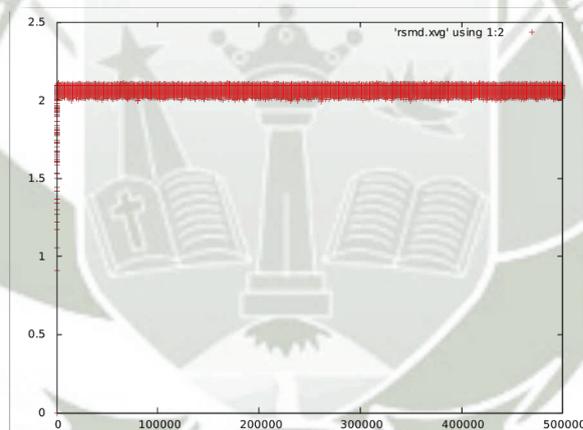
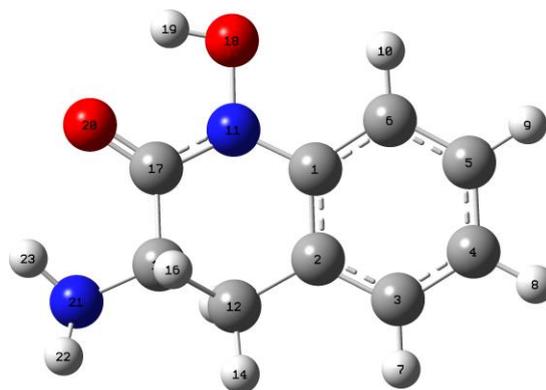


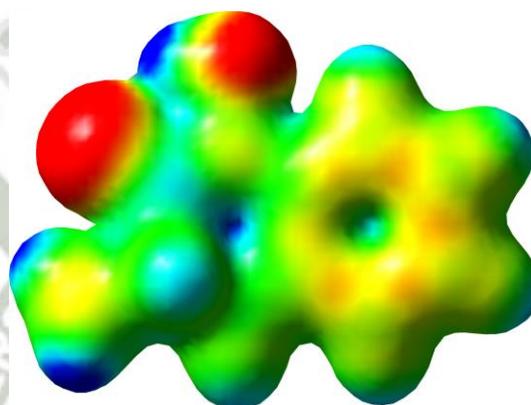
Figura 4.4: Evaluación RMSD del fármaco tras la dinámica, donde el eje y está en nm y el eje x en ps.

Podemos apreciar, que los parámetros adicionados al campo de fuerza en la estructura de OPLS-AA, son correctos, y reproducen en forma adecuada la estructura optimizada a nivel de la mecánica cuántica, y los términos de Lennard-Johns de largo alcance fueron adecuadamente descritos a nivel clásico, en concordancia con los análisis cuánticos.

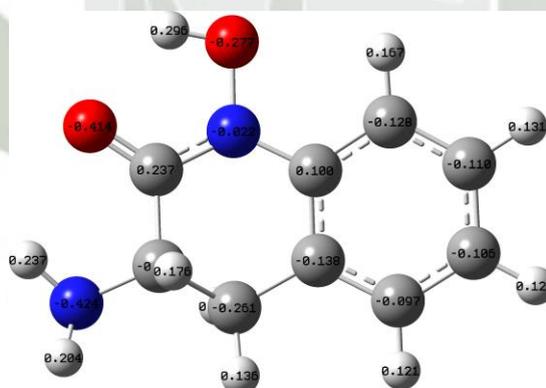
Además se realizaron dos análisis adicionales, el potencial electrostático del fármaco y la densidad total de carga, que se muestran a continuación.



(a) Estructura



(b) Potencial electrostático



(c) Densidad total de carga

Figura 4.5: Estructura del fármaco, potencial electrostático y densidad total de cargas del mismo, visualizados en GaussView.

4.2. Modelamiento Estructural de KAT I

Para poder iniciar el modelamiento de la KAT-I, es indispensable iniciar de la estructura primaria, o secundaria en su defecto, que se halle reportado en la bibliografía. Mediante el uso de las bases de datos RCSB PDB y NCBI, se encontraron cuatro archivos con la información requerida, estos son: 1w7l, 1w7m, 1w7n y 4wllh, según la nomenclatura PDB, en todos los casos corresponden a la KAT-I humana (la enzima unida a su cofactor) los cuales se muestran en la figura 4.6.



Figura 4.6: Estructuras secundarias de la KAT-I visualizados en Chimera.

En la figura 4.6(a), muestra la estructura secundaria correspondiente al archivo con código 1w7l, que presentaba a la información de la KAT-I humana, con un total de 422 aminoácidos. Sin embargo, el archivo presentaba siete aminoácidos faltantes, los cuales son: Met-1, Ala-2, Lys-3, Ile-149, Gln-150, Asn-151 y Leu-422. Así mismo, la Lys-247 y el PLP aparecían como residuos distintos, y no presentaban los átomos de hidrógeno, lo que dificulta la declaración en el campo de fuerza. La figura 4.6(b),

presenta la estructura secundaria para el archivo con código 1w7m, contiene la KAT-I humana, con 422 aminoácidos, en complejo con L-Phe. Sin embargo, este archivo también presentaba siete aminoácidos faltantes, los cuales son: Met-1, Ala-2, Lys-3, Ile-149, Gln-150, Asn-151 y Leu-422. En forma similar al caso anterior, la Lys-247 y el PLP aparecían como residuos distintos también, y faltaban los hidrógenos del sistema. Adicionalmente, la figura 4.6(c), nos muestra la estructura secundaria del archivo con código 1w7n, que contiene a la KAT-I humana, con 422 aminoácidos, pero presentaba a su cofactor PLP, en su forma PMP. Además, presentaba los siete aminoácidos faltantes, los cuales son: Met-1, Ala-2, Lys-3, Ile-149, Gln-150, Asn-151 y Leu-422, la Lys-247 y no presentaba hidrógenos. En la figura 4.6(d), presentamos la estructura secundaria de con código 4wlh, que presentaba a las cadenas A y B de la KAT-I humana, con 422 aminoácidos cada una, también presentaban aminoácidos faltantes, que eran: Met-1, Ala-2, Lys-3, Gly-147, Pro-148, Ile-149, Gln-150, Asn-151 y Gly-152, y nombraba a la Lys-247 como residuo IT1, ya que estaba unida al PLP, a diferencia de los otros archivos. Además presentaba sus hidrógenos completos.

Debido a la completitud de la información en los archivos, se seleccionó la 4wlh, que era el más adecuado para trabajar, ya que presentaba sus hidrógenos completos, y como sólo se trabajó con una cadena, se limpió el archivo y se eliminó la cadena B. Por consiguiente, se buscó el archivo .fasta del archivo 4wlh, que se muestra en la figura 4.7.

```
>4WLH:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MAKQLQARRLDGIDYNPWVEFVKLASEHDVVNLGQGFPDFPPDFAVEAFQHAVSGDFMLNQYTKTFGYPPLTKILASFF
GELLGQEIDPLRNVLVTGGYGALFTAFQALVDEGDEVIIEPFFDCYEPMTMMAGGRP VFVSLKPGPIQNGELGSSSNW
QLDPMELAGKFTSRKALVLNTPNNPLGKVFSREELELVASLCQQHDDVVCITDEVYQWVVYDGHQHISIASLPGMWERTL
TIGSAGKTF SATGWKVGWVWLGPDHIMKHLRTVHQNSVFHCPTQSQA AVAESFEREQLLFRQPSSYFVQFPQAMQRCRDHM
IRSLQSVGLKPIIPQGSYFLITDISDFKRKMPDLP GAVDEPYDRRFVKWMIKKNKGLVAIPVSI FYSVPHQKHFDHYIRFC
FVKDEATLQAMDEKLRKWKVEL
>4WLH:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MAKQLQARRLDGIDYNPWVEFVKLASEHDVVNLGQGFPDFPPDFAVEAFQHAVSGDFMLNQYTKTFGYPPLTKILASFF
GELLGQEIDPLRNVLVTGGYGALFTAFQALVDEGDEVIIEPFFDCYEPMTMMAGGRP VFVSLKPGPIQNGELGSSSNW
QLDPMELAGKFTSRKALVLNTPNNPLGKVFSREELELVASLCQQHDDVVCITDEVYQWVVYDGHQHISIASLPGMWERTL
TIGSAGKTF SATGWKVGWVWLGPDHIMKHLRTVHQNSVFHCPTQSQA AVAESFEREQLLFRQPSSYFVQFPQAMQRCRDHM
IRSLQSVGLKPIIPQGSYFLITDISDFKRKMPDLP GAVDEPYDRRFVKWMIKKNKGLVAIPVSI FYSVPHQKHFDHYIRFC
FVKDEATLQAMDEKLRKWKVEL
```

Figura 4.7: Archivo tipo fasta de la 4wlh.

Se procedió a completar los restos de aminoácidos faltantes respecto al archivo 4wlh, la estructura secundaria resultante se muestra en la figura 4.8, esta cuenta con 422 aminoácidos, iniciando por Met-1 y finalizando en la Leu-422; así mismo, la Lys-247 se halla unida al cofactor PLP y sin presentar modificaciones en dicho residuo.

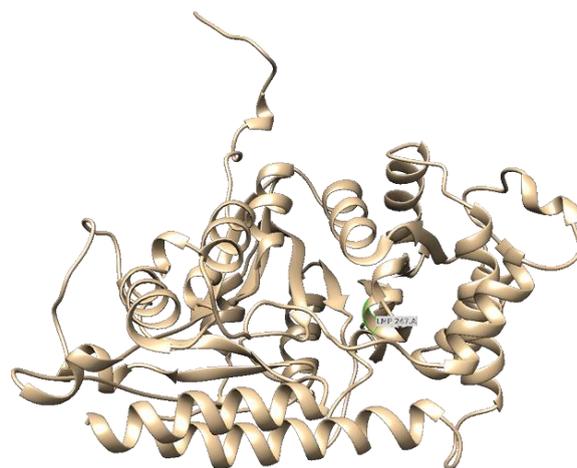


Figura 4.8: KAT-I unida a su cofactor visualizada en Chimera.

El residuo de Lisina unida al cofactor (PLP) en nuestro estudio, lo renombramos como LMP tras construirlo en GaussView y declarados en el campo de fuerza OPLS-AA, la estructura del LMP, fue optimizado en Gaussian-09, se realizó un cálculo de simple punto "SP", sobre la estructura optimizada, para obtener las cargas de Hirshfeld y que puedan ser introducidas en la declaración de los campos de fuerza, de esta forma se logró que el programa Gromacs reconozca a KAT-I unida al cofactor, como se muestra en la figura 4.9(a). Sin embargo, existía una separación entre el LMP y los aminoácidos colindantes 246-248, esto se puede ver en la figura 4.9(b).

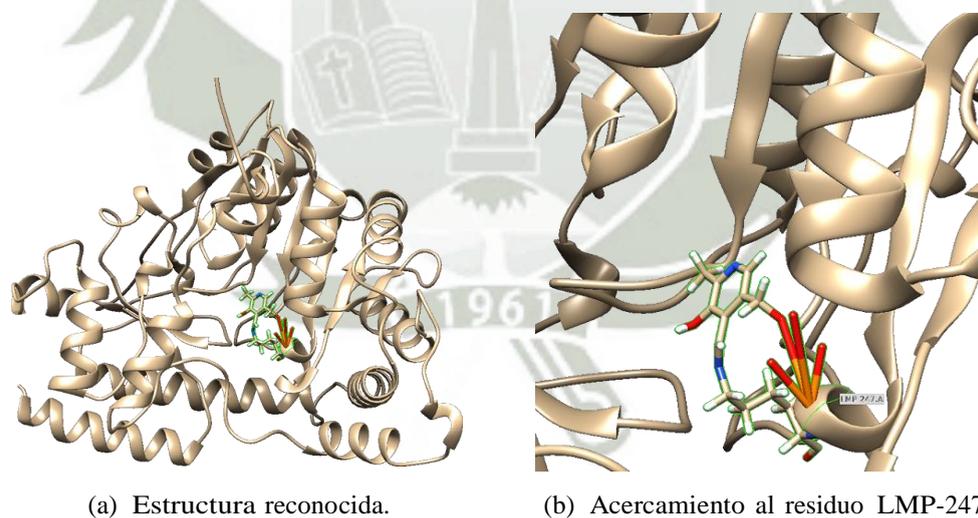


Figura 4.9: KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera

Adicionalmente, el cálculo para obtener las cargas de Hirshfeld, dio como resultado los datos que presentamos en la Tabla 4.2. También notamos que la sumatoria total de las cargas es igual a cero.

Tabla 4.2: Cargas de Hirshfeld de LMP

| Num. | Átomos | Q. Hirshfeld | Num. | Átomos | Q. Hirshfeld |
|------|--------|--------------|------|--------|--------------|
| 1 | C | 0.073116 | 22 | O | -0.209174 |
| 2 | C | 0.093830 | 23 | N | -0.185335 |
| 3 | C | -0.024376 | 24 | C | -0.100711 |
| 4 | C | -0.015944 | 25 | H | 0.051081 |
| 5 | C | 0.009009 | 26 | H | 0.044600 |
| 6 | N | -0.259018 | 27 | H | 0.045648 |
| 7 | C | 0.057765 | 28 | H | 0.043495 |
| 8 | C | 0.107020 | 29 | H | 0.037367 |
| 9 | O | -0.098469 | 30 | H | 0.035928 |
| 10 | C | -0.059067 | 31 | H | 0.041468 |
| 11 | C | -0.059660 | 32 | H | 0.040120 |
| 12 | C | -0.058442 | 33 | H | 0.037407 |
| 13 | C | -0.001151 | 34 | H | 0.052334 |
| 14 | N | -0.139165 | 35 | H | 0.054508 |
| 15 | O | -0.368485 | 36 | H | 0.062009 |
| 16 | P | 0.654172 | 37 | H | 0.051432 |
| 17 | O | -0.151590 | 38 | H | 0.135431 |
| 18 | O | -0.146475 | 39 | H | 0.046686 |
| 19 | O | -0.209111 | 40 | H | 0.047528 |
| 20 | C | 0.044350 | 41 | H | 0.047695 |
| 21 | C | 0.065281 | 42 | H | 0.105894 |

Del análisis poblacional de Hirshfeld, apreciamos que el átomo con la mayor carga positiva es el fósforo número 16 con un valor de 0.654172, y el átomo con la mayor carga negativa es el oxígeno 15, con un valor de -0.368485. Como ya se mencionó estas cargas son indispensables para realizar los siguientes pasos metodológicos realizados en la presente investigación.

Por efecto de la introducción de un nuevo resto como es el LMP, tuvimos que declarar parámetros adicionales en los archivos de Gromacs, tanto para los términos enlazantes como no enlazantes. Y se logró que el programa reconozca el archivo en formato "pdb", de la enzima KAT-I completa y sin rupturas (entre los aminoácidos Gly,246-Thr,248 y el residuo LMP), como se muestra en la figura 4.10(a), y un acercamiento en la figura 4.10(b). Luego de una primera minimización de las fuerzas sobre la estructura, obtuvimos la estructura presentada en la figura 4.10(c), mientras que un acercamiento de la misma se presenta en la figura 4.10(d).

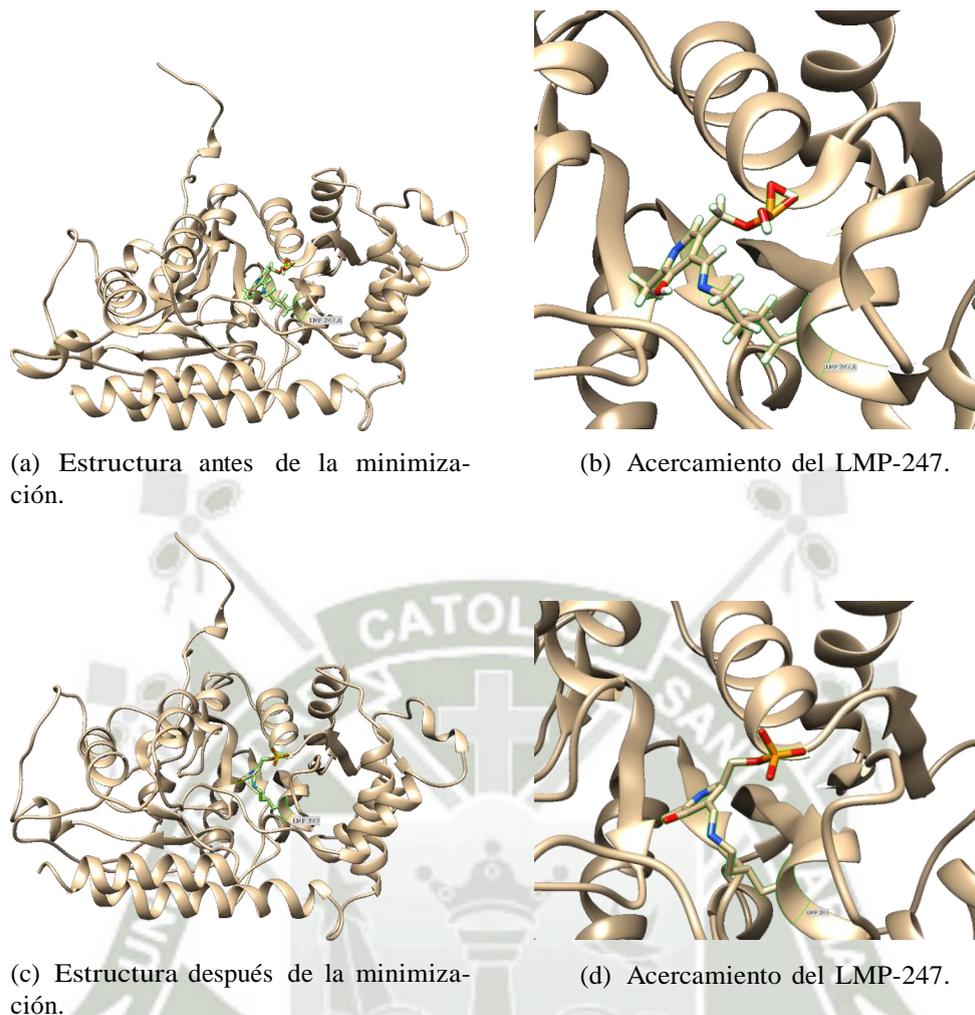


Figura 4.10: KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera.

Después de tener la estructura en la mínima interacción de sus fuerzas, se procedió a realizar una simulación de dinámica molecular, en un ensamble Canónico, a una temperatura fisiológica de 309.65°C, por un periodo de 50ns, luego del proceso de simulación, obtuvimos as estructuras promedio para la zona de equilibrio, la cual se presenta en la figura 4.11(a), y un acercamiento se presenta en la figura 4.11(b). Podemos apreciar, que la estructura ha llegado a una fase de equilibrio y sus ángulos y diedros se hallan en forma correcta para la visualización. Para poder determinar en forma adecuada la región de equilibrio, realizamos una gráfica del RMSD, la cual presentamos en la figura 4.12(a), donde se visualiza que llegamos en forma temprana al equilibrio, aproximadamente a los 7ns, con una dispersión menor de 0.15nm, generando confiabilidad respecto a nuestros resultados.

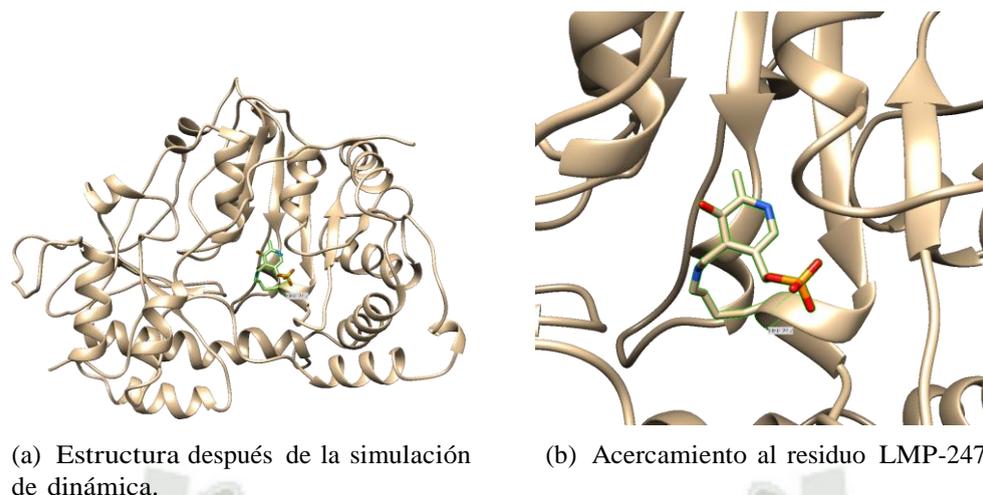


Figura 4.11: KAT-I unida al cofactor (PLP) visualizada en Chimera

Así mismo, se realizó un RMSF para verificar la fluctuación por átomo, que dio como resultado la figura 4.12(b), donde se aprecia que la fluctuación es menor a 1, y es la región que corresponde a los 700 primeros átomos, los que contribuyen enormemente a la fluctuación, o movimiento de la estructura durante la simulación de dinámica molecular, y estos son los que corresponden a la región que faltaban en la estructura inicial, y que nosotros completamos en la estructura secundaria, para poder iniciar nuestro proceso de simulación molecular.

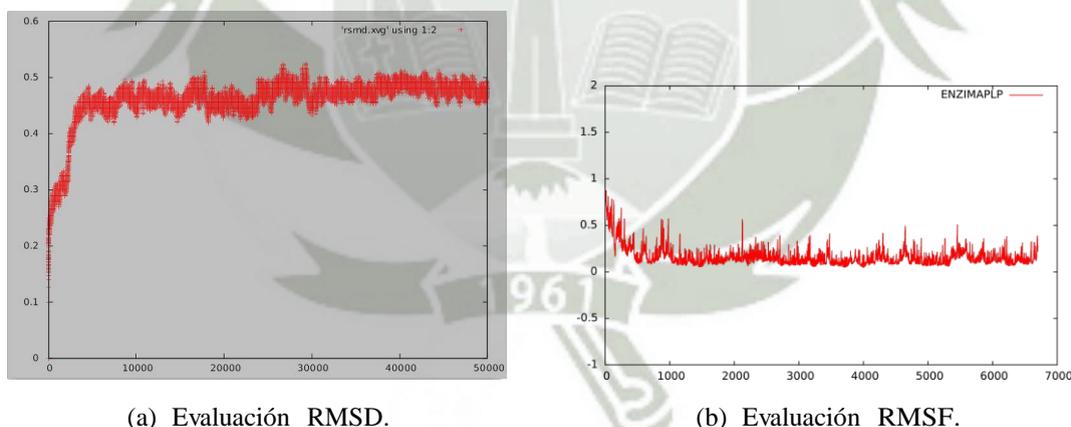
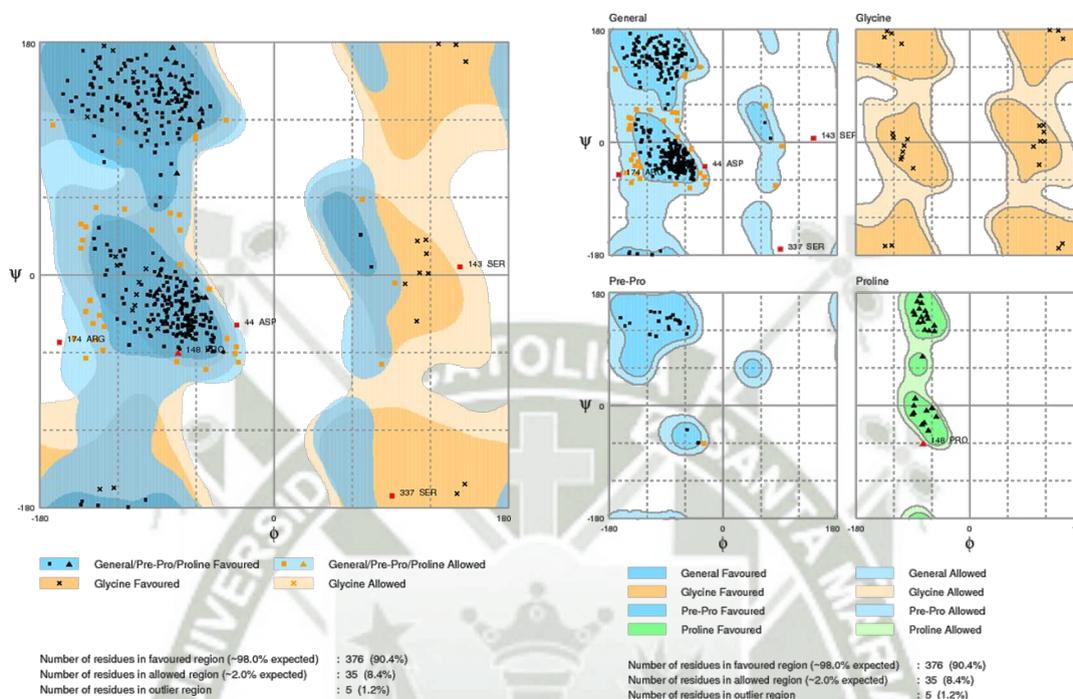


Figura 4.12: Evaluaciones RMSD, donde el eje y está en nm y el eje x en ps; y evaluación RMSF tras la dinámica, donde el eje y está en nm y el eje x en átomos.

Para poder comparar con las estructuras experimentales o también denominadas empíricas, son los diagramas de Ramachandran lo que nos permiten confirmar la calidad de la estructura obtenida para la enzima. En el esquema de Ramachandran, se gráfica la relación entre dos ángulos, el de rotación sobre su eje y el de desplazamiento. Mediante el uso de servidores, se obtuvo el diagrama que se muestra en la

figura 4.13(a). Donde se obtuvo 90.4 % de residuos o aminoácidos dentro de la región favorecida, 8.4 % de aminoácidos dentro de la región permitida y sólo 1.2 % de aminoácidos en las regiones desfavorecidas, como es el caso de Asp-44, Ser-143, Arg-174 y Ser-337, y cabe resaltar que ninguno de estos es parte del centro catalítico o centro activo.



(a) Diagrama de Ramachandran General

(b) Diagrama de Ramachandran Desglosado

Figura 4.13: Diagrama de la evaluación Ramachandran.

En el diagrama representado en la figura 4.13(b), nos damos cuenta que en las regiones de glicinas, prolinas o preprolinas no tenemos ninguno de los residuos desfavorecidos. Esto nos indica en forma directa, que la estructura a la que hemos llegado, debe existir en la naturaleza, y que si existe, es la fase en equilibrio de forma predominante con la estructura secundaria que se reporta.

Adicionalmente, se evaluó la estabilización de la estructura secundaria durante el proceso de la simulación de dinámica molecular, esto se realizó mediante el programa DSSP, interfaseado con el programa Gromacs, los resultados obtenidos los podemos apreciar en la figura 4.14, donde se puede observar que muchos residuos forman α -hélices y permanecen aparentemente constantes durante la simulación de dinámica molecular, estas tienden a mantenerse en el tiempo, otros residuos forman hojas- β y puentes β que también se mantienen en el tiempo.

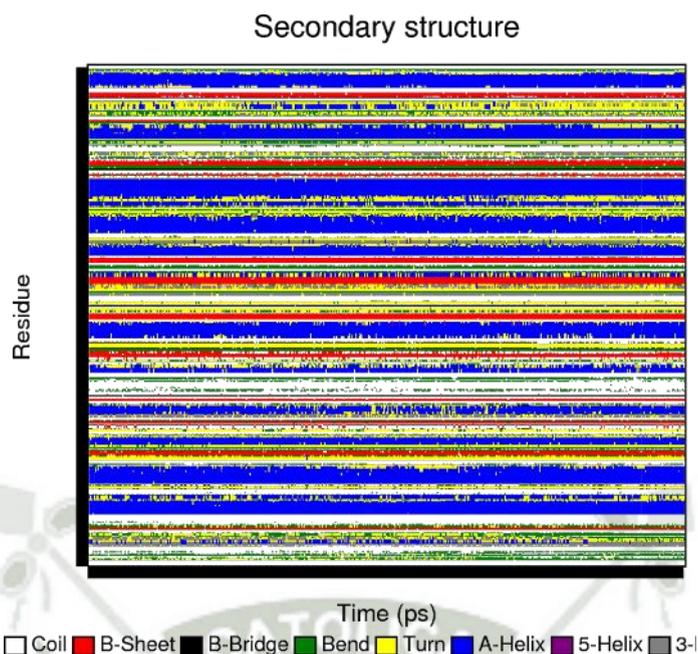


Figura 4.14: Gráfico de la evaluación DSSP.

En la mayoría de los casos las estructuras secundarias definidas, tales como α -helices, hojas- β y β invertidas se han conservado, durante el proceso de la simulación de dinámica molecular, cuando ocurre esto, por lo general sabemos que la estructura ha llegado en forma temprana a su estado de equilibrio, lo que hace de la estructura, una forma estable en la que la proteína puede estar en la naturaleza.

4.3. Acoplamiento del Fármaco con el Receptor

El proceso de acoplamiento o "*Docking*", se puede trabajar en tres potenciales formas: 1) cuando se mantienen las dos estructuras en forma rígida, es decir tanto el fármaco como el receptor, 2) cuando dejamos en forma flexible el fármaco y en forma rígida el receptor, y 3) cuando tanto el fármaco como el receptor son dejados en su forma flexible. De estas tres formas, nosotros procedimos a través de la primera aproximación, ya que requiere un menor tiempo de cómputo y a que nos brinda estructuras aproximadas que luego pueden ser refinadas por medio de una simulación de dinámica molecular. Es así que, mediante el programa AutoDock, y usando la función "*score*", logramos identificar 50 estructuras probables del acoplamiento entre el fármaco y la enzima KAT-I, ordenados de menor a mayor energía relativa. Siendo el acoplamiento de menor energía el de la corrida 24 (por tanto el de mayor "*score*"), que se muestra en la figura 4.15(a) y una ampliación de la estructura respecto al sitio de interacción en la figura 4.15(b).

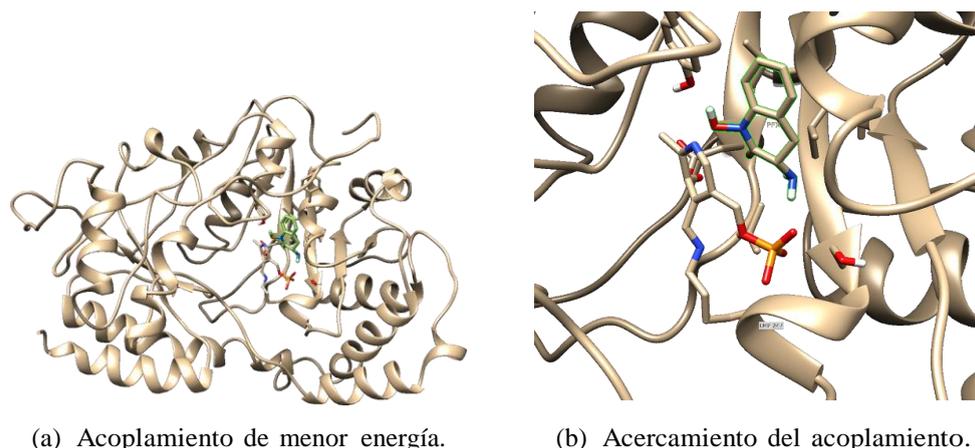


Figura 4.15: Acoplamiento de la enzima KAT-I unida al cofactor (PLP) y el fármaco visualizado en Chimera.

A la estructura seleccionada, con el criterio del mejor "score", se le realizó una minimización de las fuerzas sobre el sistema, la cual nos dio como resultado la estructura que se presenta en la figura 4.16(a), y una ampliación respecto al sitio activo lo podemos observar en la figura 4.16(b).

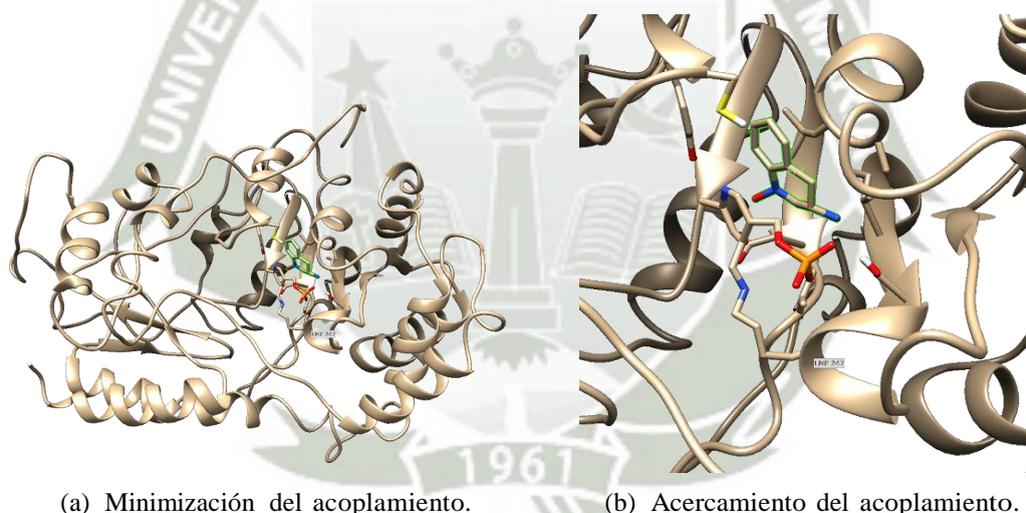
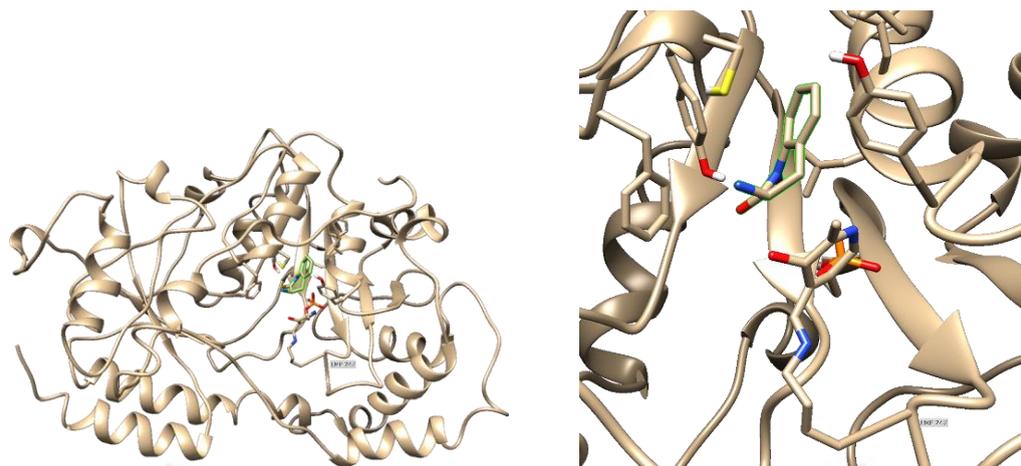


Figura 4.16: Minimización del acoplamiento visualizado en Chimera.

Con solo el proceso de minimización los átomos tanto del fármaco como del receptor, quedan en las posiciones adecuadas. Y listas para la simulación de la dinámica molecular.

Para el sistema acoplado, procedimos a realizar una simulación de dinámica molecular de 10ns, en un ensamble Canónico, obtuvimos las estructuras presentadas en la figura 4.17(a), así mismo, en la figura 4.17(b) presentamos una ampliación del sitio de interacción entre el fármaco y el receptor protéico.



(a) Simulación de dinámica molecular del acoplamiento.

(b) Acercamiento del acoplamiento.

Figura 4.17: Simulación de dinámica molecular del acoplamiento visualizado en Chimera.

Cuando realizamos el análisis de la trayectoria, obtuvimos el gráfico presentado en la figura 4.18, donde se visualiza el RMSD, verificando que llegamos en forma temprana a la zona equilibrio y con una dispersión menor de 0.2 nm.

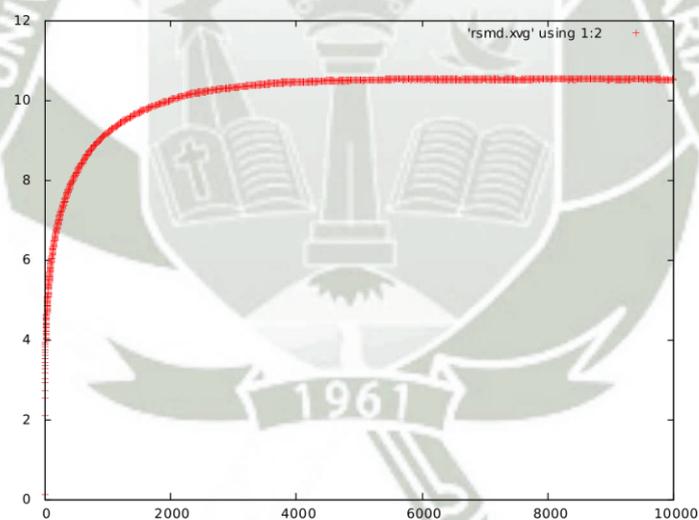


Figura 4.18: Evaluaciones RMSD tras la dinámica, donde el eje y está en nm y el eje x en ps.



4.4. Evaluación de las Propiedades

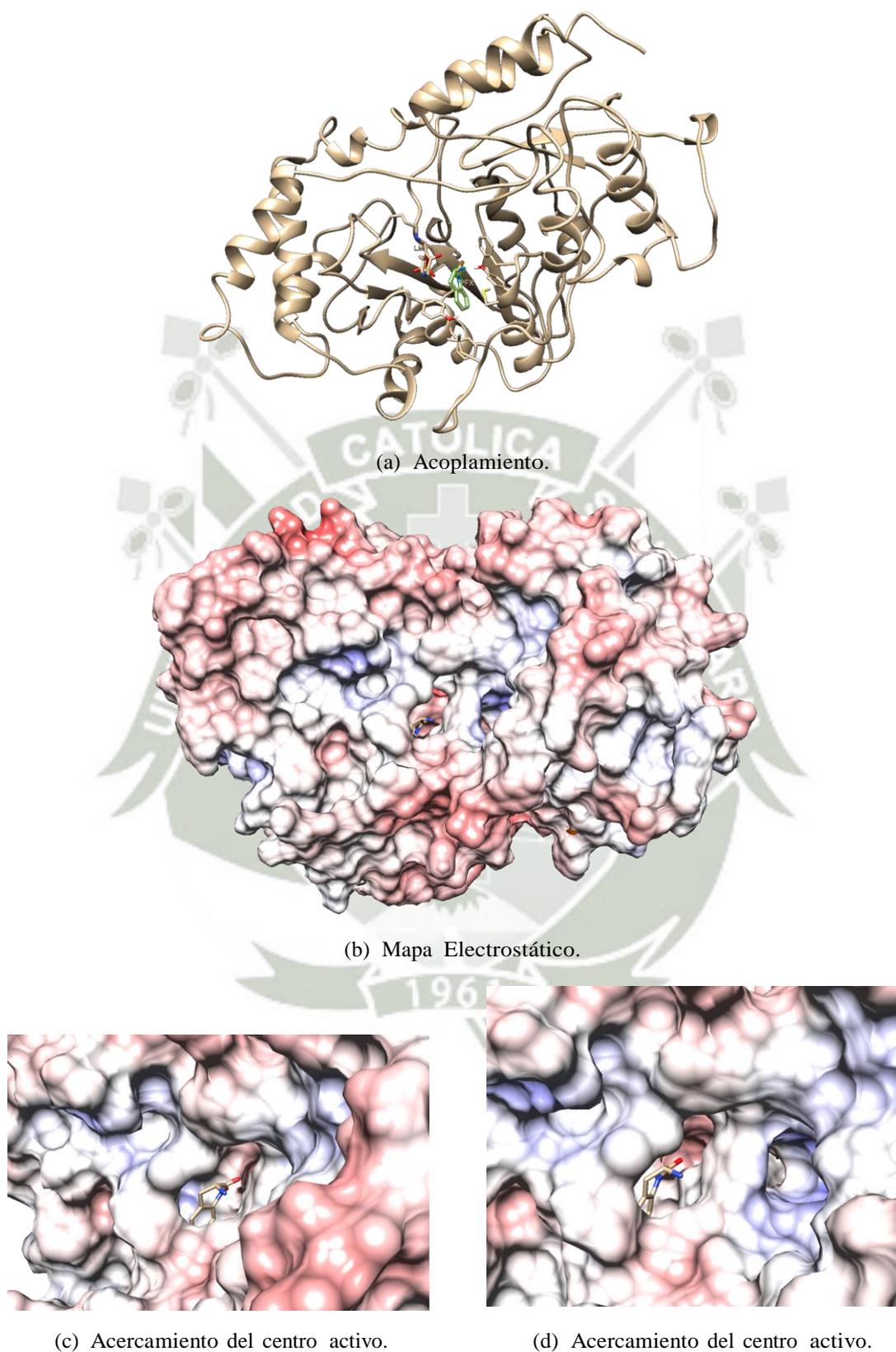


Figura 4.19: Mapa del Potencial Electrostático tras la simulación de dinámica molecular del acoplamiento visualizado en Chimera.

Con las estructuras promedio, calculadas en la zona de equilibrio, pasamos a un proceso de minimización para que las fuerzas sean mínimas, lo que se muestra en la figura 4.19(a), a la cual se le calculo el potencial electrostático mediante el software APBs, y se ha mapeado sobre la superficie hidrofóbica del sistema, como podemos ver en la figura 4.19(b), donde el color azul indica que la superficie es predominantemente positiva, y el color rojo indica que la superficie es predominantemente negativa.

La superficie de energía potencial, mapeado sobre la superficie hidrofóbica, nos muestra amplias regiones negativas y pequeñas islas positivas. El centro de interacción se muestra mayormente negativo, como podemos observar en la figura 4.19(c) y en la figura 4.19(d), de donde podemos deducir que el sitio activo o sitio de interacción es predominantemente susceptible de un proceso de ataque por parte de electrófilos. Es por ello que, nuestro fármaco de prueba puede acceder a la región del sitio activo, ya que cuenta con una amplia región de densidad electrónica remanente.

Adicionalmente, se realizó un análisis de los puentes de hidrógeno en la estructura acoplada, el resultado se muestra en la figura 4.20(a), donde podemos apreciar que la estructura cuenta con puentes de hidrógeno dispersos, así mismo, cuando realizamos un acercamiento, se aprecia que hay puentes de hidrógeno que comunican al residuo LMP y al fármaco, como podemos apreciar en la figura 4.20(b).

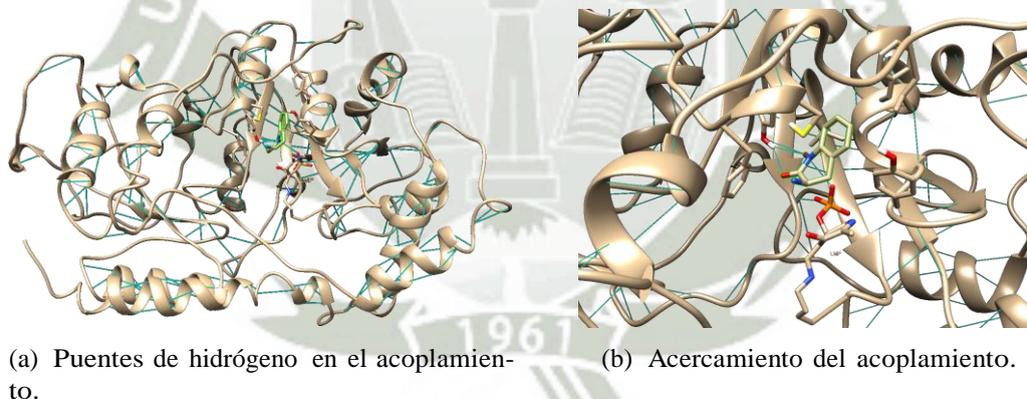


Figura 4.20: Puentes de Hidrógenos apreciados tras la simulación de dinámica molecular del acoplamiento visualizado en Chimera.

Estos resultados corroboran la potencial estabilidad de la interacción entre el fármaco en estudio y el receptor, y adicionalmente, el fármaco forma puentes de hidrógeno con la estructura, para generar una mayor estabilización del sistema complejo. Convenientemente, esto se da en el sitio activo de la enzima, haciendo esta interacción aún más óptima.

Conclusiones

Primero. Se logró optimizar el Fármaco (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona.

Segundo. Se logró modelar estructuralmente la Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I).

Tercero. Se logró acoplar el fármaco (3S)-3-amino-1-hidroxi-3,4-dihidroquinolin-2-(1H)-ona con el receptor Quinurenina Aminotransferasa I (KAT I).

Cuarto. Se logró evaluar las propiedades del acoplamiento.

Recomendaciones

Se recomienda realizar el acoplamiento con la estructura de la KAT-I en QMMM y con diferentes tipos de derivados del fármaco, también mediante QMMM, y realizar cálculos de la energía libre.



Referencias Bibliográficas

- [1] Erhardt S, Schwieler L, Nilsson L, Linderholm K, Engberg G. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiology and behavior*. 2007;92(1):203–209.
- [2] Vining D, Robinson JC. Concept Analysis of Illness Engulfment in Schizophrenia. *Archives of Psychiatric Nursing*. 2016;30(3):370–374. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883941716000029>.
- [3] Bakhshi K, Chance SA. The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience*. 2015;303(Supplement C):82–102. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215005692>.
- [4] Poels EMP, Kegeles LS, Kantrowitz JT, Javitt DC, Lieberman JA, Abi-Dargham A, et al. Glutamatergic abnormalities in schizophrenia: A review of proton MRS findings. *Schizophrenia Research*. 2014;152(2):325–332. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996413006919>.
- [5] O’Farrell K, Harkin A. Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders. *Neuropharmacology*. 2017;112(Part B):307–323. The Kynurenine Pathway in Health and Disease. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390815302008>.
- [6] Fujigaki H, Yamamoto Y, Saito K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. *Neuropharmacology*. 2017;112(Part B):264–274. The Kynurenine Pathway in Health and Disease. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390816300119>.
- [7] Akladios FN, Nadvi NA, Park J, Hanrahan JR, Kapoor V, Gorrell MD, et al. Design and synthesis of novel inhibitors of human kynu-

- renine aminotransferase-I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22(4):1579–1581. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12000273>.
- [8] Koola MM. Kynurenine pathway and cognitive impairments in schizophrenia: Pharmacogenetics of galantamine and memantine. *Schizophrenia Research: Cognition*. 2016;4(Supplement C):4–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221500131630004X>.
- [9] Okada K, Angkawidjaja C, Koga Y, Kanaya S. Structural and mechanistic insights into the kynurenine aminotransferase-mediated excretion of kynurenic acid. *Journal of Structural Biology*. 2014;185(3):257–266. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847714000100>.
- [10] Cherian AK, Gritton H, Johnson DE, Young D, Kozak R, Sarter M. A systemically-available kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor restores nicotine-evoked glutamatergic activity in the cortex of rats. *Neuropharmacology*. 2014;82(Supplement C):41–48. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390814000896>.
- [11] Buchan NS, Rajpal DK, Webster Y, Alatorre C, Gudivada RC, Zheng C, et al. The role of translational bioinformatics in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2011;16(9):426–434. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644611000742>.
- [12] Liu T, Song X, Chen G, Paradis AD, Zheng X. Prevalence of schizophrenia disability and associated mortality among Chinese men and women. *Psychiatry Research*. 2014;220(1):181–187. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178114003564>.
- [13] Najjar S, Pearlman DM. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophrenia Research*. 2015;161(1):102–112. White Matter Pathology. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996414002540>.
- [14] Caqueo-Urizar A, Boyer L, Boucekine M, Auquier P. Spanish cross-cultural adaptation and psychometric properties of the Schizophrenia Quality of Life short-version questionnaire (SQoL18) in 3 middle-income countries: Bolivia, Chile and Peru. *Schizophrenia Research*. 2014;159(1):136–143. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996414004241>.

- [15] Comercio. Más de 280 mil peruanos padecen de esquizofrenia, según el Minsa; 2010.
- [16] Singh S, Kumar A, Agarwal S, Phadke SR, Jaiswal Y. Genetic insight of schizophrenia: past and future perspectives. *Gene*. 2014;535(2):97–100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111913013449>.
- [17] Davison J, O’Gorman A, Brennan L, Cotter DR. A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2017; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996417305807>.
- [18] Berkovitch L, Dehaene S, Gaillard R. Disruption of Conscious Access in Schizophrenia. *Trends in Cognitive Sciences*. 2017;21(11):878–892. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364661317301869>.
- [19] Jose D, Ramachandra, Lalitha K, Gandhi S, Desai G, Nagarajaiah. Consumer perspectives on the concept of recovery in schizophrenia: A systematic review. *Asian Journal of Psychiatry*. 2015;14(Supplement C):13–18. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876201815000076>.
- [20] Caqueo-Urizar A, Boyer L, Baumstarck K, Gilman SE. The relationships between patients’ and caregivers’ beliefs about the causes of schizophrenia and clinical outcomes in Latin American countries. *Psychiatry Research*. 2015;229(1):440–446. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178115004205>.
- [21] Kulhara P, Shah R, Grover S. Is the course and outcome of schizophrenia better in the ‘developing’ world? *Asian Journal of Psychiatry*. 2009;2(2):55–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876201809000306>.
- [22] Tueth MJ. Schizophrenia: Emil kraepelin, Adolph Meyer, and beyond. *The Journal of Emergency Medicine*. 1995;13(6):805–809. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0736467995020225>.
- [23] Holla B, Thirthalli J. Course and Outcome of Schizophrenia in Asian Countries: Review of Research in the Past Three Decades. *Asian Journal of Psychiatry*.

- 2015;14(Supplement C):3–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876201815000027>.
- [24] Arslan A. Imaging genetics of schizophrenia in the post-GWAS era. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018;80:155–165.
- [25] Nutt DJ, Need AC. Where now for schizophrenia research? *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(8):1181–1187. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X14001503>.
- [26] Khan A, Lindenmayer JP, Opler M, Kelley ME, White L, Compton M, et al. The evolution of illness phases in schizophrenia: A non-parametric item response analysis of the Positive and Negative Syndrome Scale. *Schizophrenia Research: Cognition*. 2014;1(2):53–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215001314000067>.
- [27] Misiak B, Frydecka D, Zawadzki M, Krefft M, Kiejna A. Refining and integrating schizophrenia pathophysiology – Relevance of the allostatic load concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014;45(Supplement C):183–201. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763414001420>.
- [28] Tomasik J, Rahmoune H, Guest PC, Bahn S. Neuroimmune biomarkers in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2016;176(1):3–13. Oxidative Stress and Inflammation in Schizophrenia. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092099641400382X>.
- [29] Horváth S, Mirnics K. Schizophrenia as a Disorder of Molecular Pathways. *Biological Psychiatry*. 2015;77(1):22–28. The New Psychiatric Genetics: Toward Next Generation Diagnosis and Treatment. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322314000079>.
- [30] Laruelle M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current Opinion in Pharmacology*. 2014;14(Supplement C):97–102. *Neurosciences*. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489214000022>.
- [31] Marques TR, Levine SZ, Reichenberg A, Kahn R, Derks EM, Fleischhacker WW, et al. How antipsychotics impact the different dimensions of Schizophrenia: A test of competing hypotheses. *European Neuropsychopharmacology*. 2014;24(8):1279–1288. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X14001096>.

- [32] Ratnayake U, Basrai HS, Turnley AM, van den Buuse M. Dopaminergic activity and behaviour in SOCS2 transgenic mice: Revealing a potential drug target for schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015;56(Supplement C):247–253. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584614001857>.
- [33] Leza JC, García-Bueno B, Bioque M, Arango C, Parellada M, Do K, et al. Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2015;55:612–626. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763415001402>.
- [34] Najjar S, Pearlman DM. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review. *Schizophrenia Research*. 2015;161(1):102–112. White Matter Pathology. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996414002540>.
- [35] Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, et al. A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2016;65(Supplement C):185–194. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763415302943>.
- [36] Arias I, Sorlozano A, Villegas E, Luna JdD, McKenney K, Cervilla J, et al. Infectious agents associated with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia Research*. 2012;136(1):128–136. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996411005615>.
- [37] Nemani K, Ghomi RH, McCormick B, Fan X. Schizophrenia and the gut–brain axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015;56(Supplement C):155–160. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584614001687>.
- [38] Lin CH, Lin PP, Lin CY, Lin CH, Huang CH, Huang YJ, et al. Decreased mRNA expression for the two subunits of system xc⁻, SLC3A2 and SLC7A11, in WBC in patients with schizophrenia: Evidence in support of the hypoglutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 2016;72(Supplement C):58–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395615002964>.
- [39] Dempster K, Norman R, Théberge J, Densmore M, Schaefer B, Williamson P. Glutamatergic metabolite correlations with neuropsychological tests in first

- episode schizophrenia. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2015;233(2):180–185. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092549271530010X>.
- [40] Koukouli F, Maskos U. The multiple roles of the α -7 nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system. *Biochemical Pharmacology*. 2015;97(4):378–387. *Nicotinic Acetylcholine Receptors as Therapeutic Targets: Emerging Frontiers in Basic Research and Clinical Science (Satellite to the 2015 Meeting of the Society for Neuroscience)* Oct 14-15, Chicago, IL USA. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003883>.
- [41] Paz RD, Tardito S, Atzori M, Tseng KY. Glutamatergic dysfunction in schizophrenia: From basic neuroscience to clinical psychopharmacology. *European Neuropsychopharmacology*. 2008;18(11):773–786. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X08001673>.
- [42] Labrie V, Roder JC. The involvement of the NMDA receptor d-serine/glycine site in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010;34(3):351–372. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763409001134>.
- [43] Balu DT, Coyle JT. The NMDA receptor ‘glycine modulatory site’ in schizophrenia: d-serine, glycine, and beyond. *Current Opinion in Pharmacology*. 2015;20(Supplement C):109–115. *Neurosciences*. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489214001714>.
- [44] Smesny S, Gussew A, Biesel NJ, Schack S, Walther M, Rzanny R, et al. Glutamatergic dysfunction linked to energy and membrane lipid metabolism in frontal and anterior cingulate cortices of never treated first-episode schizophrenia patients. *Schizophrenia Research*. 2015;168(1):322–329. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996415003527>.
- [45] Pomierny-Chamioło L, Rup K, Pomierny B, Niedzielska E, Kalivas PW, Filip M. Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. *Pharmacology and Therapeutics*. 2014;142(3):281–305. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813002544>.
- [46] Cheng Q, Yakel JL. The effect of α 7 nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochemical Pharmacology*. 2015;97(4):439–444. *Nicotinic Acetylcholine Receptors as Therapeutic Targets: Emerging Frontiers in Basic Research and Clinical Science (Satellite to*

- the 2015 Meeting of the Society for Neuroscience) Oct 14-15, Chicago, IL USA. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295215003858>.
- [47] Strzelecki D, Podgórski M, Kałużyńska O, Gawlik-Kotelnicka O, Stefańczyk L, Kotlicka-Antczak M, et al. Supplementation of antipsychotic treatment with sarcosine – GlyT1 inhibitor – causes changes of glutamatergic 1NMR spectroscopy parameters in the left hippocampus in patients with stable schizophrenia. *Neuroscience Letters*. 2015;606(Supplement C):7–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394015301099>.
- [48] Bubeníková-Valešová V, Horáček J, Vrajová M, Höschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2008;32(5):1014–1023. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014976340800050X>.
- [49] Cioffi CL. Modulation of NMDA receptor function as a treatment for schizophrenia. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(18):5034–5044. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X13008640>.
- [50] Erhardt S, Schwieler L, Nilsson L, Linderholm K, Engberg G. The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiology and Behavior*. 2007;92(1):203–209. Karolinska Institutet - Neuroscience. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938407002168>.
- [51] Pershing ML, Bortz DM, Pocivavsek A, Fredericks PJ, Jørgensen CV, Vunck SA, et al. Elevated levels of kynurenic acid during gestation produce neurochemical, morphological, and cognitive deficits in adulthood: Implications for schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2015;90(Supplement C):33–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002839081400392X>.
- [52] Nilsson LK, Linderholm KR, Engberg G, Paulson L, Blennow K, Lindström LH, et al. Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of male patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2005;80(2):315–322. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996405003117>.
- [53] Maddison DC, Giorgini F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2015;40(Supplement

- C):134–141. Extracellular vesicles: a paradigm shift in how we think about cell-cell communication and Molecular neuroprotection. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115000452>.
- [54] Nilsson LK, Linderholm KR, Engberg G, Paulson L, Blennow K, Lindström LH, et al. Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of male patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2005;80(2):315–322. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996405003117>.
- [55] Banerjee J, Alkondon M, Albuquerque EX. Kynurenic acid inhibits glutamatergic transmission to CA1 pyramidal neurons via alpha 7 nAChR-dependent and -independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*. 2012;84(8):1078–1087. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212005126>.
- [56] Notarangelo FM, Pocivavsek A. Elevated kynurenine pathway metabolism during neurodevelopment: Implications for brain and behavior. *Neuropharmacology*. 2017;112(Part B):275–285. *The Kynurenine Pathway in Health and Disease*. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390816300739>.
- [57] Wong J, Ray WJ, Kornilova AY. Development of a microplate fluorescence assay for kynurenine aminotransferase. *Analytical Biochemistry*. 2011;409(2):183–188. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269710007116>.
- [58] Sekine A, Okamoto M, Kanatani Y, Sano M, Shibata K, Fukuwatari T. Amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain in vitro. *SpringerPlus*. 2015;4(1):48.
- [59] Varasi M, Torre AD, Heidempergher F, Pevarello P, Speciale C, Guidetti P, et al. Derivatives of kynurenine as inhibitors of rat brain kynurenine aminotransferase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1996;31(1):11–21. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S022352349680002X>.
- [60] Wojciech Rzeski TKADKWBZMKSWATEOJA. Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in cultured cerebral cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 2005;80:677–682.

- [61] Knyihár-Csillik E, Csillik B, Pákási M, Krisztin-Péva B, Dobó E, Okuno E, et al. Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. *Neuroscience*. 2004;126(4):899–914. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452204003173>.
- [62] Rejdak R, Junemann A, Grieb P, Thaler S, Schuettauf F, Chorągiewicz T, et al. Kynurenic acid and kynurenine aminotransferases in retinal aging and neurodegeneration. *Pharmacological Reports*. 2011;63(6):1324–1334. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1734114011706971>.
- [63] Rossi F, Schwarcz R, Rizzi M. Curiosity to kill the KAT (kynurenine aminotransferase): structural insights into brain kynurenic acid synthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. 2008;18(6):748–755. Catalysis and regulation / Proteins. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X08001449>.
- [64] Zakrocka I, Turski WA, Urbańska EM, Kocki T. Effect of irbesartan on kynurenic acid production and activity of kynurenine aminotransferases in rat brain cortex. *Pharmacological Reports*. 2015;67(Supplement 1):44. XIX International Congress of the Polish Pharmacological Society. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1734114015002583>.
- [65] Rejdak R, Kohler K, Kocki T, Shenk Y, Turski WA, Okuno E, et al. Age-dependent decrease of retinal kynurenate and kynurenine aminotransferases in DBA/2J mice, a model of ocular hypertension. *Vision Research*. 2004;44(7):655–660. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042698903006977>.
- [66] Bellocchi D, Macchiarulo A, Carotti A, Pellicciari R. Quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) modeling of the irreversible transamination of l-kynurenine to kynurenic acid: The round dance of kynurenine aminotransferase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2009;1794(12):1802–1812. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963909002106>.
- [67] Baran H, Kepplinger B. Inhibition of kynurenine aminotransferase I, II and III activities due to human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of the Neurological Sciences*. 2015;357(Supplement 1):e298. Abstracts from the World Congress

- of Neurology (WCN 2015). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X15015476>.
- [68] Baumel A, Correll CU, Birnbaum M. Adaptation of a peer based online emotional support program as an adjunct to treatment for people with schizophrenia-spectrum disorders. *Internet Interventions*. 2016;4(Part 1):35–42. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214782915300282>.
- [69] Haro JM, Novick D, Perrin E, Bertsch J, Knapp M. Symptomatic remission and patient quality of life in an observational study of schizophrenia: Is there a relationship? *Psychiatry Research*. 2014;220(1):163–169. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178114006131>.
- [70] Schürhoff F, Fond G, Berna F, Bulzacka E, Vilain J, Capdevielle D, et al. A National network of schizophrenia expert centres: An innovative tool to bridge the research-practice gap. *European Psychiatry*. 2015;30(6):728–735. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092493381500111X>.
- [71] Kaufmann A, Wartelsteiner F, Yalcin-Siedentopf N, Baumgartner S, Biedermann F, Edlinger M, et al. Changes in psychopathology in schizophrenia patients starting treatment with new-generation antipsychotics: therapeutic drug monitoring in a naturalistic treatment setting. *European Neuropsychopharmacology*. 2016;26(4):717–728. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X16000389>.
- [72] Bianchini O, Porcelli S, Nespeca C, Cannavò D, Trappoli A, Aguglia E, et al. Effects of antipsychotic drugs on insight in schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2014;218(1):20–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165178114002285>.
- [73] Schürhoff F, Fond G, Berna F, Bulzacka E, Vilain J, Capdevielle D, et al. A National network of schizophrenia expert centres: An innovative tool to bridge the research-practice gap. *European Psychiatry*. 2015;30(6):728–735. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092493381500111X>.
- [74] Tonin FS, Piazza T, Wiens A, Fernandez-Llimos F, Pontarolo R. Adverse events and treatment failure leading to discontinuation of recently approved antipsychotic drugs in schizophrenia: A network meta-analysis. *Schizophrenia*

- Research. 2015;169(1):483–485. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996415004892>.
- [75] Peedicayil J. Preclinical epigenetic models for screening epigenetic drugs for schizophrenia. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2016;77(Supplement C):1–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871915002683>.
- [76] Harvey PD, Rosenthal JB. Treatment resistant schizophrenia: Course of brain structure and function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016;70(Supplement C):111–116. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584616300239>.
- [77] Michalopoulou PG, Lewis SW, Wykes T, Jaeger J, Kapur S. Treating impaired cognition in schizophrenia: The case for combining cognitive-enhancing drugs with cognitive remediation. *European Neuropsychopharmacology*. 2013;23(8):790–798. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X13001156>.
- [78] Mizrahi R, Kiang M, Mamo DC, Arenovich T, Bagby RM, Zipursky RB, et al. The selective effect of antipsychotics on the different dimensions of the experience of psychosis in schizophrenia spectrum disorders. *Schizophrenia Research*. 2006;88(1):111–118. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920996406003161>.
- [79] Monti JM, Torterolo P, Perumal SRP. The effects of second generation antipsychotic drugs on sleep variables in healthy subjects and patients with schizophrenia. *Sleep Medicine Reviews*. 2017;33(Supplement C):51–57. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087079216300144>.
- [80] Singh S, Kumar A, Agarwal S, Phadke SR, Jaiswal Y. Genetic insight of schizophrenia: past and future perspectives. *Gene*. 2014;535(2):97–100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811913013449>.
- [81] Dounay AB, Anderson M, Bechle BM, Campbell BM, Claffey MM, Evdokimov A, et al. Discovery of brain-penetrant, irreversible kynurenine aminotransferase II inhibitors for schizophrenia. *ACS medicinal chemistry letters*. 2012;3(3):187–192.

- [82] Ranganathan S. Bioinformatics. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier; 2017. p.–. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338123878>.
- [83] Martí MA, Turjanski AA. La bioinformática estructural o la realidad virtual de los medicamentos. *Química Viva*. 2009;8(1):25–34.
- [84] Ramachandran K, Deepa G, Namboori K. Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications. Springer Science & Business Media; 2008.
- [85] Peralta MZ. Premio Nobel de Química 2013. *Acta Herediana*. 2013 marzo-diciembre;535.
- [86] Andrew RL. Molecular modeling principles and applications. 2nd, editor: Pearson Education Limited. 2001;.
- [87] Cjuno J, Arroyo H. La química teórica y la química cuántica computacional. *Boletín CSI*. 2003;48:16–19.
- [88] Tomberg A. Gaussian 09W Tutorial. An introduction to computational chemistry using G09W and Avogadro software. 2013;p. 1–36.
- [89] Lewars EG. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer; 2016.
- [90] Jensen F. Atomic orbital basis sets. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2013;3(3):273–295.
- [91] Jensen F. Introduction to computational chemistry. John Wiley and Sons; 2017.
- [92] Saha S, Roy RK, Ayers PW. Are the Hirshfeld and Mulliken population analysis schemes consistent with chemical intuition? *International Journal of Quantum Chemistry*. 2009;109(9):1790–1806.
- [93] Kukol A. Molecular Modeling of Proteins. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Springer; 2008.
- [94] Young D. Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems. John Wiley and Sons; 2004.
- [95] Gago F. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 1994;.

- [96] Vilchez Á. Elaboración de un modelo 3D del receptor Humano de NK1 a partir del receptor delta Opiode. Universitat Politecnica de Catalunya; 2015.
- [97] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605–1612.
- [98] Hertig S, Goddard TD, Johnson GT, Ferrin TE. Multidomain Assembler (MDA) Generates Models of Large Multidomain Proteins. *Biophysical journal*. 2015;108(9):2097–2102.
- [99] Chen JE, Huang CC, Ferrin TE. RRDistMaps: a UCSF Chimera tool for viewing and comparing protein distance maps. *Bioinformatics*. 2014;31(9):1484–1486.
- [100] Huang CC, Meng EC, Morris JH, Pettersen EF, Ferrin TE. Enhancing UCSF Chimera through web services. *Nucleic acids research*. 2014;42(W1):W478–W484.
- [101] Yang Z, Lasker K, Schneidman-Duhovny D, Webb B, Huang CC, Pettersen EF, et al. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *Journal of structural biology*. 2012;179(3):269–278.
- [102] Pintilie GD, Zhang J, Goddard TD, Chiu W, Gossard DC. Quantitative analysis of cryo-EM density map segmentation by watershed and scale-space filtering, and fitting of structures by alignment to regions. *Journal of structural biology*. 2010;170(3):427–438.
- [103] Morris JH, Huang CC, Babbitt PC, Ferrin TE. structureViz: linking Cytoscape and UCSF Chimera. *Bioinformatics*. 2007;23(17):2345–2347.
- [104] Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE. Visualizing density maps with UCSF Chimera. *Journal of structural biology*. 2007;157(1):281–287.
- [105] Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC bioinformatics*. 2006;7(1):339.
- [106] Couch GS, Hendrix DK, Ferrin TE. Nucleic acid visualization with UCSF Chimera. *Nucleic acids research*. 2006;34(4):e29–e29.
- [107] Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE. Software extensions to UCSF chimera for interactive visualization of large molecular assemblies. *Structure*. 2005;13(3):473–482.

- [108] Berendsen HJ, van der Spoel D, van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*. 1995;91(1-3):43–56.
- [109] Lindahl E, Hess B, Van Der Spoel D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Journal of molecular modeling*. 2001;7(8):306–317.
- [110] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*. 2005;26(16):1701–1718.
- [111] Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*. 2008;4(3):435–447.
- [112] Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013;29(7):845–854.
- [113] Páll S, Abraham MJ, Kutzner C, Hess B, Lindahl E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: *International Conference on Exascale Applications and Software*. Springer; 2014. p. 3–27.
- [114] Kutzner C, Páll S, Fechner M, Esztermann A, de Groot BL, Grubmüller H. Best bang for your buck: GPU nodes for GROMACS biomolecular simulations. *Journal of computational chemistry*. 2015;36(26):1990–2008.
- [115] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009;30(16):2785–2791.
- [116] Hovmöller S, Zhou T, Ohlson T. Conformations of amino acids in proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2002;58(5):768–776.
- [117] Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of molecular biology*. 1963;7(1):95–99.