



ESTUDIO *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN ÁCIDO NUCLEICO-PROTEÍNA: APTÁMEROS DIRIGIDOS CONTRA LA FOSFOLIPASA A₂

Pedro José Rueda Martínez

Universidad De Pamplona

Facultad Ciencias Básicas

Programa de Biología

Pamplona, Colombia

2021

ESTUDIO *IN SILICO* DE LA INTERACCIÓN ÁCIDO NUCLEICO-PROTEÍNA: APTÁMEROS DIRIGIDOS CONTRA LA FOSFOLIPASA A₂

Pedro José Rueda Martínez

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Director:

Dr. Yanis Ricardo Espinosa Silva

Codirector:

Ph. D. Martha Flórez Rangel

Línea De Investigación:

Biología Computacional

Grupo De Investigación:

BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA (Biomogen)

Universidad De Pamplona

Facultad De Ciencias Básicas

Programa de Biología

Pamplona, Colombia

2021

1. RESUMEN

Los aptámeros son secuencias de ADN, ARN e inclusive péptidos, descubiertas en la década de los 90, que poseen una alta afinidad de unión con una gran cantidad de moléculas y proteínas, haciéndolos ideales para el tratamiento de distintas enfermedades, e incluso para la neutralización de toxinas. En el presente trabajo, se implementaron aptámeros de ADN dirigidos contra la proteína Lys49-Fosfolipasa A₂, a partir de simulaciones utilizando técnicas computacionales como Docking y Dinámica Molecular, con la finalidad de estudiar las interacciones proteína-aptámero como sistema de interés biológico. Los complejos fueron preparados y simulados con ayuda del programa GROMACS, y el docking entre las moléculas se realizó en la plataforma web de HADDOCK. Inicialmente, se demostró la mayor estabilidad de la proteína en presencia de ácidos esteáricos mediante los cálculos como el RMSD, RMSF y puentes de hidrógeno. Posteriormente, seleccionamos la conformación proteica de mayor probabilidad con la cual se procedió a realizar el docking. El sistema proteína-aptámero fue evaluado por una dinámica molecular de 100 ns, analizando de esta forma la estabilidad del aptámero en contacto con la proteína, para finalmente determinar, que la principal interacción que estabiliza al complejo es la formación de puentes de hidrógeno producto de la estabilidad electrostática entre los grupos fosfato cargados negativamente en el aptámero y los residuos básicos en la proteína.

Palabras clave: Aptámeros, Docking, Dinámica molecular, simulación molecular, Fosfolipasa A₂

Índice

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Serpientes.....	7
2.1.1. Venenos de las serpientes.....	7
2.1.2. Fosfolipasas.....	8
2.2. Accidente ofídico.....	9
2.2.1. Inmunización pasiva.....	9
2.3. Aptámeros.....	10
2.3.1. Uso terapéutico.....	10
2.4. Modelado computacional.....	11
2.4.1. Dinámica molecular.....	11
2.4.2. Acoplamiento molecular.....	12
3. OBJETIVO GENERAL.....	13
3.1. Objetivos específicos.....	13
4. MÉTODOS.....	13
4.1. Preparación del sistema.....	13
4.2. Protocolo de simulación.....	14
4.3. Análisis de las trayectorias.....	15
4.4. Docking.....	15
4.5. Validación del docking.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Análisis de trayectorias.....	18
5.2 Docking.....	22
5.3. Validación.....	23
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	26
7. CONCLUSIÓN.....	28
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

Índice de figuras

Figura 1: Anatomía general de las serpientes.....	7
Figura 2: Variedad de blancos posibles a las moléculas de los aptámeros.....	10
Figura 3: Representación del modelo “llave-cerradura”.....	12
Figura 4: Presentación de ligandos.....	12
Figura 5: Conformaciones iniciales de los sistemas.....	13
Figura 6: Propiedades físico-químicas del sistema Lys49-fosfolipasa A2 sin ácido esteárico.....	18
Figura 7: Propiedades físico-químicas del sistema Lys49-fosfolipasa A2 con ácido esteárico.....	19
Figura 8: Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los sistemas evaluados por medio de DM en presencia y ausencia de ácido esteárico.....	20
Figura 9: Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de los sistemas evaluados por medio de DM en presencia y ausencia de ácido esteárico.....	20
Figura 10: Área superficial accesible al solvente (SASA).....	21
Figura 11: Análisis de Cluster.....	21
Figura 12: Aptámero 1KR8 utilizado para el docking con la proteína Lys49-fosfolipasa A ₂	22
Figura 13: Evolución temporal de la Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD).....	23
Figura 14: Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) del sistema evaluado por DM en presencia del aptámero 1KR8.....	24
Figura 15: Puentes de hidrógeno entre la proteína Lys49-fosfolipasa A ₂ y el aptámero 1KR8.....	24
Figura 16: Matriz de distancias ente los monómeros de Lys49-fosfolipasa A ₂ y los aptámeros.....	25
Figura 17: Representación visual de la interacción entre Lys49-fosfolipasa A ₂ y el aptámero 1KR8...	26
Figura 18: Puentes de hidrógeno formados entre la Tyr119 con la proteína en presencia (Con AG) y ausencia de ácidos grasos (AG).	27
Figura 19: Complejo formando entre la Lys49-fosfolipasa A ₂ y el aptámero 1KR8.....	28

Índice de tablas

Tabla 1: Información de los aptámeros usados en el docking aptámero-proteína.....	15
Tabla 2: Proceso de equilibración usado en el sistema aptámero-proteína.....	17
Tabla 3: Puntuación HADDOCK para los aptámeros presentados en el docking a la proteína.....	22

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existen alrededor de 3.000 especies diferentes de serpientes conocidas en el mundo, de estas, solo un poco más de 250 se encuentran en territorio nacional, y menos de una quinta parte, cerca de 49 especies son venenosas o peligrosas para el hombre; dichos individuos, se encuentran organizadas en 2 familias (Viperidae y Elapidae), y 9 géneros. Dadas las condiciones geográficas del país, sumadas a la cercanía de Colombia al trópico, las serpientes que representan un peligro para el hombre tienen una distribución casi completa a nivel nacional, llegando hasta los 2.500 msnm (Castrillón, *et al.* 2007), esto, sumado al constante contacto que existe entre el hombre y las serpientes, debido al desplazamiento de los hábitats naturales de los ofidios por diferentes actividades antrópicas como la explotación ecosistémica o la degradación del mismo para su adaptación a la agricultura, generan una exposición latente al riesgo de mordedura hacia las personas, lo que finalmente conlleva al denominado, accidente ofídico.

Actualmente, el anti veneno que se produce comercialmente, se genera a partir del plasma sanguíneo de los caballos, que son híper-inmunizados previamente con la finalidad de generar los anticuerpos necesarios para la neutralización del veneno; al ser un animal, evolutivamente distante de la especie humana, en algunas ocasiones dicho anti veneno, es reconocido por el sistema inmune de los pacientes como un agente extraño, lo que puede llegar a generar reacciones adversas al medicamento (RAM) (Gómez, 2017), llevando incluso a la muerte ocasionada por el tratamiento y no por la acción del veneno.

La manera en la que se ha abordado dicho problema de las RAM, ha sido mejorar la purificación del plasma sanguíneo, e inclusive, de hacer una digestión enzimática con papaína y pepsina en los anticuerpos del caballo, dejando solo el fragmento de unión al antígeno (FAB), que son los puntos de interés en las proteínas para la neutralización del veneno, reduciendo así la probabilidad de las RAM. Este procedimiento, aunque positivo, disminuye la efectividad de los anticuerpos y aumenta los costos de producción del anti veneno, dificultando su adquisición por parte de las poblaciones que se encuentran en las zonas de exposición.

Una alternativa al método tradicional de producción de antiofídico mediante la híper-inmunización, podría ser la de implementar aptámeros, por la gran afinidad, especificidad y facilidad de producción que estas moléculas presentan para tratar objetivos específicos como las toxinas del veneno, mejorando la distribución en el organismo; al ser estructuras más pequeñas que los convencionales anticuerpos, y al no ser reconocidas como agentes externos, estos no tendrían repercusiones sobre el sistema inmune del paciente. Pese al gran potencial que representan estas moléculas, son poco conocidas y actualmente, su uso no ha alcanzado el área que se desea tratar en este trabajo, el accidente ofídico.

Con la ejecución del presente trabajo, se logró elucidar el proceso de interacción aptámero – proteína, y la formación de un complejo estable entre estos, estableciendo un método idóneo a partir de herramientas computacionales para el desarrollo de estrategias dirigidas a la neutralización de toxinas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Serpientes

Las serpientes, son organismos vertebrados, que carecen de extremidades (o solo presentan vestigios de estas, como lo es el caso particular de la familia Boidae), y poseen un cuerpo alargado, con órganos internos modificados a su estructura corporal (Figura 1). Se encuentran organizados taxonómicamente, en el Phylum Cordata, clase Reptilia, orden Squamata, y suborden Ofidia (Escobar, C, *et al.* 1985). Se calcula que existen aproximadamente 3000 especies de serpientes, de las cuales, solo el 15% de estas representan o pueden llegar a significar representar peligro para los humanos (Gold, B, *et al.* 2002), . excepción de A .con una distribución global los polos, eEstos individuos se encuentran en todos los continentes, contando con una mayor presencia y abundancia en los trópicos, siendo estos, sitios con condiciones propicias para su reproducción.

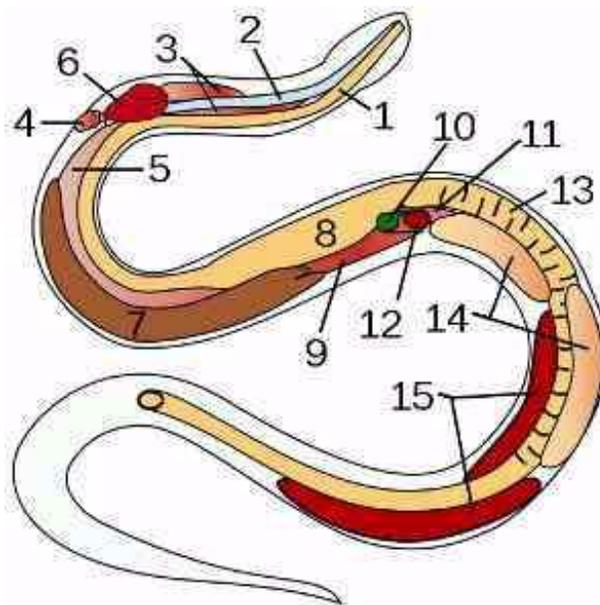


Figura 1. Anatomía general de las serpientes. 1. Esófago, 2. Tráquea, 3. Pulmones traqueales, 4. Pulmón izquierdo rudimentario, 5. pulmón derecho, 6. Corazón, 7. Hígado, 8. Estómago, 9. Saco de aire, 10. Vesícula biliar, 11. Páncreas, 12. Bazo, 13. Intestino, 14. Testículos, 15. Riñones. Fuente: Fonseca, 2016

La piel de las serpientes, es seca, elástica, no presenta glándulas y se encuentra recubierta por las características escamas que posee el orden Squamata. En dicho orden, la escamación de sus integrantes, juega un papel fundamental en la clasificación e identificación de las diferentes especies que lo integran; siendo así que, el número, tamaño y forma de las escamas en la cabeza, cuerpo y abdomen, prestan información sobre el individuo de interés, que es única para cada especie, lo que permite una facilidad en la distinción (Moreno, A. 1986).

2.1.1. Venenos de las serpientes

La glándula encargada de la producción del veneno en las serpientes, es considerada una glándula salivar modificada, que se encuentra desde el maxilar hasta la comisura labial, a ambos lados de la

cabeza (Escobar, C, *et al.* 1985). El veneno, es una secreción de unos pocos individuos pertenecientes a este suborden de ofidios; se puede presentar con una coloración amarillenta o blanca, que al secarse, disminuye su volumen en un 25 – 40%, y deja un residuo cristalizado del mismo (Gil, G, *et al.* 2011). A su vez, es una sustancia constituida por un número grande de diferentes elementos como proteínas no enzimáticas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminoácidos libres, azúcares fosforilados, lípidos, iones como: Na, K, Zn, Ca, Mg, Fe, Co, detritus celulares y también bacterias (Escobar, C. *et al.* 1985). La función principal del veneno, es ayudar en la captura y digestión del animal, dado que las serpientes ingieren a sus víctimas completas, necesitan un método que facilite y acelere la degradación del alimento (Patiño, C, *et al.* 2002). Dichos venenos, pueden clasificarse en tres tipos, dependiendo de su principal modo de acción: (i) crotálico (se caracteriza por ser el más miotóxico, neurotóxico, nefrotóxico y generar un efecto desfibrinante), (ii) botrópico (es proteolítico, edematizante, coagulante, desfibrinizante, hemorrágico, necrosante y nefrotóxico) y (iii) elapídico (es fundamentalmente neurotóxico). Pese a la clasificación existente, el veneno puede variar entre especies, e inclusive entre individuos de la misma especie, o también puede presentar cambios a lo largo de la vida de un solo individuo, pues se ha demostrado que el veneno de algunas serpientes recién nacidas posee características hemorrágicas y edematizantes, mientras que, en los mismos individuos, ya adultos, es hemolítico y mionecrótico (Gil, G, *et al.* 2011).

2.1.2. Fosfolipasas

Existe un grupo de enzimas conocidas como las fosfolipasas A₂ (PLA₂), que tienen una acción hidrolizante en los glicerofosfolípidos, cuya reacción efectúa la liberación de ácido graso y la producción de lisofosfolípidos relevantes (Burke y Dennis. 2009). Se encuentran clasificadas en dos grandes grupos, PLA₂ citosólica, caracterizada por un alto peso molecular que contrasta con el segundo grupo, las PLA₂ secretorias, de bajo peso molecular; forman parte de la familia de las fosfolipasas, superfamilia de las lipasas y mega familia de las hidrolasas; el nombre propuesto por la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular biology*), es EC 3.1.1.4 (García y Cardona, 2009).

Este grupo enzimático de PLA₂, puede encontrarse comúnmente dentro de las composiciones de los venenos; existe una gran variedad procesos patológicos en los que se encuentra involucrada esta enzima, como el efecto anti coagulante, hemorrágico, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotóxico, convulsivo y miotóxico, también presentan efectos benéficos y de interés como antibióticos, anti-VIH, anti tumoral, anti parasitario e incluso anti malarico (Kini, 2003). Las estructuras homologas de las fosfolipasas A₂ presentes en las toxinas de las serpientes, no tienen una relación directa con sus efectos biológicos, siendo que pueden existir varias isoformas de PLA₂ en un mismo individuo, y tener cada una, funciones diferentes (Inga, *et al.* 2010). La suma de estas características, y dada la gran variabilidad de estas moléculas en el pool de toxinas, genera un gran incentivo por discernir la incertidumbre existente en las mismas, y comprender las posibilidades de neutralización de las que se dispone.

Entre los grupos de PLA₂, el primero descrito formalmente, fue la fracción perteneciente a venenos, que se encuentra en las serpientes, abejas, escorpiones, etc. Este estudio se centra en las del veneno de serpiente, que se hallan en dos grandes grupos dependiendo de la clasificación del animal, los elápidos, y los crotálicos, y son el primero de estos dos grupos, en el que se tiene más interés, dado las mismas propiedades y funcionamiento de su veneno.

Como se mencionó, el primer grupo descrito de PLA₂, actualmente pertenece al llamado grupo conocido como secretadas (sPLA₂), y este a su vez, se divide en otros cuatro tipos, los dos primeros de estos, se encuentran en los venenos de serpientes, mientras que el tipo 3, presenta estructuras únicas, que se encuentran en dos especies de lagarto (*Heloderma suspectum* y *H. horridum horridum*) y también en el veneno de abejas, y finalmente las de tipo 4, son las presentes en el veneno de caracoles marinos, propiamente el grupo *Conus*. (Harris y Scott-Davey, 2013).

En términos generales, las sPLA₂, son estructuras sencillas, de 115 o 125 aminoácidos, y de masa molecular de 13-15 kDa (Manjunatha, 2003), y su actividad se encuentra mediada por una diana conformada por histidina-aspartato en su centro catalítico, además de que requieren minúsculas concentraciones de Calcio (García y Cardona, 2009).

2.2. Accidente ofídico

Las serpientes y sus presas han compartido territorio por más de 100 millones de años; pese a que el hombre no pertenece al grupo de animales de interés alimenticio para estos individuos, el constante desplazamiento que se ejerce sobre estas, genera un contacto entre hombre y ofidio, que origina una tasa de accidentalidad, con serias repercusiones a los dos grupos de animales, dada la mortalidad a nivel mundial (Metz, *et al.* 2006). El accidente ofídico se define o se denomina, como la lesión que ocasiona la mordedura de serpientes inoculadoras de toxinas propias de su organismo, las cuales son capaces de ocasionar condiciones clínicas que pueden llegar a perjudicar la vida de la víctima, e inclusive a originar la muerte de la misma (Bardales, F. 2006).

La problemática social por envenenamiento de serpientes, es un problema de salud pública más común de lo que generalmente llega a creerse; pese a esto, es un problema desatendido por las entidades encargadas, representando una mayor consideración en zonas rurales y pobres como África, Latinoamérica, y parte de Asia, siendo estos a su vez, los lugares donde tanto los incidentes como la mortalidad, presentan los mayores registros (Gutiérrez, J, *et al.* 2014). En 1998, el investigador Chippaux, logró estimar que, en todo el mundo, anualmente suceden más o menos 5'400.000 mordeduras de serpientes, de las cuales 2'500.000 presentan síntomas de envenenamiento, y solo 125.000 de todos estos casos mueren (Gutiérrez, J, *et al.* 2010). En América Latina, en un estudio realizado por Kasturiratne y colaboradores en el 2008, se estimaron aproximadamente 80.329 accidentes y la muerte de 540 de estos (Zambrano ÁM. 2012). Cabe resaltar que estos datos no pueden ser exactos, dadas las condiciones de pobreza a las que están sometidos los países de la región, ocasionando que no se pueda reportar el 100% de todos los casos (Janaka de Silva, D, *et al.* 2013).

2.2.1. Inmunización pasiva

La seroterapia, fue descubierta a finales del siglo XIX, por el inmunólogo francés Calmette, y fue uno de los acontecimientos más importantes de este siglo. Después de más de 100 años, este proceso continúa presentando una respuesta positiva, y aún se sigue utilizando como principal respuesta o como tratamiento específico ante una mordedura en las víctimas del accidente ofídico (Castrillón D., 2007). Después de tener marcado un punto de inicio, muchos otros investigadores en diferentes países, como McFarland en Estados Unidos, Tidwell en Australia e Ishizaka en Japón retomaron el trabajo de Calmette, y reprodujeron el experimento, con la finalidad de obtener un tratamiento contra las serpientes correspondientes a sus respectivos países. (Gómez J, *et al.* 2017). En Latinoamérica, la

introducción de la producción de sueros antiofídicos, fue primordial Brasil, y la formación del instituto Butantan, en 1901; posteriormente en Costa Rica, en la década de los 20, el Dr. Clodomiro Picado, realizó investigaciones para la producción, pero no fue hasta 1967 que no se obtuvo un lote de suero para la implementación en humanos; en México, hacia 1927, el Dr. Isauro Venzor comenzó con las investigaciones en el área. Finalmente siendo estos los precursores de la seroterapia en Latinoamérica (Otero R, *et al.* 2007). La seroterapia, ha tenido un impacto significativo en la mortandad de las víctimas de accidentes ofídicos, desde que comenzó su uso a principios del siglo XX, llegando a reducir de la totalidad de mordeduras a un 0.1% de muertes.

2.3. Aptámeros

Los aptámeros, son secuencias cortas de peptidos, ARN o ADN (sencillo), no poseen más de 200 bases y presentan una región central variable que les permite un plegamiento tridimensional único (Ospina, 2019), es esta propiedad la que facilita una alta capacidad de unión con diferentes tipos de proteínas y enzimas (Figura 2), ocasionando que exista en estas secuencias de nucleótidos un gran interés creciente por su potencial de uso terapéutico en diferentes áreas.

Los aptámeros, generalmente se obtienen mediante el empleo de un proceso *in vitro* conocido como SELEX (por sus siglas en inglés, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), que consiste en exponer una gran cantidad de secuencias de nucleótidos, a las moléculas de interés, de las cuales serán eliminadas aquellas con poca afinidad por la molécula, dejando solo una parte que contiene las secuencias con mayor capacidad de acoplamiento, finalmente, estas secuencias cortas, son amplificadas mediante PCR, y el proceso se repite (entre 6 y 8 veces) hasta tener la cantidad suficiente de moléculas con la mayor afinidad posible (Manley, 2013).

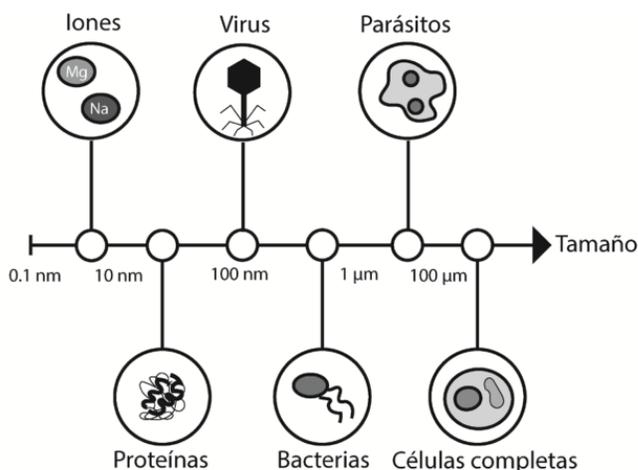


Figura 2. Variedad de blancos posibles a las moléculas de los aptámeros. Fuente: Ospina, 2015.

2.3.1. Uso terapéutico

Se ha demostrado el gran uso que tienen estas moléculas desde la década de los 90, en la que grupos de investigación señalaron la alta capacidad y afinidad de unión a terceros como iones, toxinas, antibióticos, aminoácidos, péptidos, proteínas, virus, bacterias, parásitos, hormonas, sustancias tóxicas

e incluso compuestos activos de drogas ilegales (Ospina, 2019). El potencial presente en los aptámeros, puede ser empleado en reemplazo de gran cantidad de terapias con anticuerpos, llegando a ser tan versátil como los anticuerpos monoclonales (Ospina, 2019). Entre las ventajas de su uso, se encuentra el que no utiliza métodos complejos y extensos como los mencionados anticuerpos monoclonales, ni emplean procesos *in vivo* que involucran animales; sumado a que su producción es muy versátil, con métodos sencillos como la PCR (Bruno, 2015). Como se ha mencionado, el uso de los aptámeros es tan amplio, que sus utilidades van desde su utilidad como herramienta terapéutica en el diagnóstico de enfermedades, en el transporte de fármacos, como marcadores de moléculas, o biosensores, hasta la orientación de nano partículas (Zhao, 2015).

2.4. Modelado computacional

Poder entender el comportamiento de las partículas, átomos y moléculas, además de los distintos tipos de plegamiento que pueden presentar macromoléculas de interés biológico como ácidos nucleicos y proteínas es uno de los desafíos de la biofísica y bioquímica actualmente. Dada la complejidad y la escala nano y/o micrométrica de los sistemas en estudio, el empleo de algoritmos en simulaciones computacionales se convierte en una herramienta vital que permite realizar ensayos computacionales de laboratorio, que llevan a una mejor estimación y comprensión de los resultados.

2.4.1. Dinámica molecular

Los métodos de simulación molecular, emplean programas de cómputo para evaluar y seguir el comportamiento de un sistema en el tiempo (Baez. 2013). Existen diferentes procesos para la obtención de estos datos, en el caso de la Dinámica Molecular (DM), el fundamento teórico del proceso son las leyes del movimiento de Newton. Así, la DM estima de forma numérica (ecuación 1) las condiciones existentes para un determinado número de cuerpos, resolviendo el movimiento de estos, y siguiendo su posición en el sistema (Hernández, *et al.* 2012). Sobre cada partícula, actúan distintos tipos de fuerzas mediadas por las interacciones entre los componentes del sistema. La forma de expresar esta información en los procesos de DM es mediante la implementación de condiciones y parámetros que describan dichas interacciones, este conjunto de características se conoce como campo de fuerza (Baez. 2013).

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, i = 1 \dots N. \quad \text{Ecuación 1}$$

El agua, tiene funciones esenciales en los organismos desde los niveles moleculares, muchas enzimas necesitan de estas moléculas para poder tomar las conformaciones correctas y de esta forma realizar sus funciones (Sepúlveda. 2007). Por tanto, la dinámica molecular debe tener consideraciones sobre las interacciones del solvente en el que se encuentre el sistema deseado, y de esta forma no despreciar información. Durante las simulaciones, los sistemas son sometidos a una caja solvatada y se otorgan condiciones periódicas de contorno, de forma que el sistema se rodea por replicas en todas las direcciones, para otorgar al mismo la condición de estar aparentemente inmerso en un solvente infinito.

Existen ciertas características propias de los sistemas que se deben mantener constantes, principalmente la energía, presión y temperatura. Así, para simulaciones isobáricas e isotérmicas, es necesario realizar

modificaciones en los algoritmos de movimiento, introduciendo en el sistema, por ejemplo, el termostato de Berendsen (Berendsen, *et al.* 1984), que se puede entender como someter las moléculas a un baño térmico que mantenga la temperatura constante, análogamente, el sistema puede ser sometido a un acople de presión, para establecer el mismo efecto del termostato, manteniendo la temperatura (Baez, 2013).

2.4.2. Acoplamiento molecular

En 1894, Emil Fischer estableció un modelo de interacción entre una proteína y un ligando, asemejando una llave y una cerradura (Figura 3), en un intento de explicar la gran afinidad que tienen las moléculas; en dicho modelo, es de principal interés el conocer la orientación específica existente entre el ligando y la enzima, representados por “llave” y “cerradura” respectivamente.

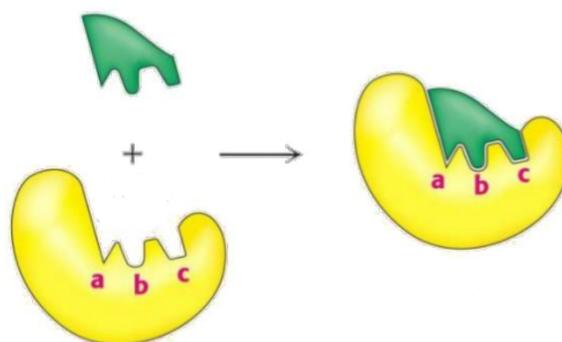


Figura 3. Representación del modelo “llave–cerradura”, propuesto por Fischer en 1894. Fuente: Fischer, E. 1984.

El acoplamiento o docking molecular, es una técnica de simulación, que emplea la información obtenida de dos algoritmos separados; uno que predice las conformaciones estructurales que pueden presentar el ligando y el sitio activo de la molécula, y un segundo algoritmo que predice las energías de unión entre estas para cada caso posible (Figura 4) (Ballón y Grados, 2019).

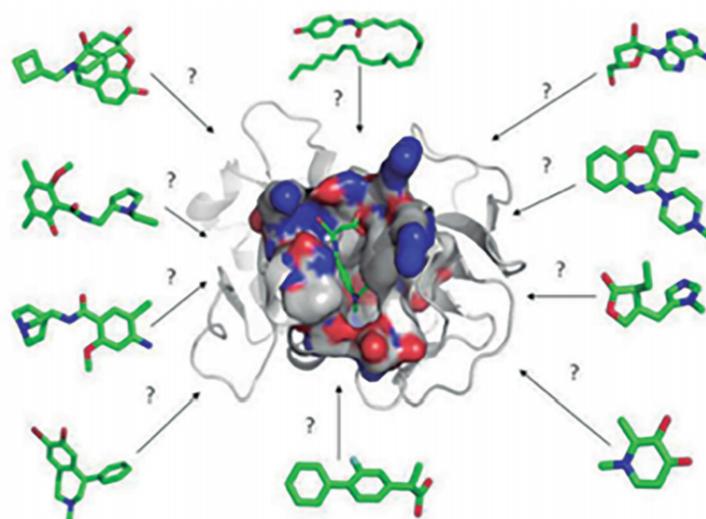


Figura 4. Presentación de ligandos, donde se evalúa su afinidad con la molécula diana. Fuente: Ballón, W. Grados, R. 2019.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar la interacción entre ácidos nucleicos y proteínas usando aptámeros dirigidos contra la fosfolipasa A₂.

3.1. Objetivos específicos

- Identificar las conformaciones aptámeros-fosfolipasa A₂ más estables.
- Construir un modelo molecular que permita analizar la interacción de los aptámeros con la fosfolipasa A₂.

4. MÉTODOS

4.1. Preparación del sistema

Inicialmente se seleccionó la estructura dimérica de la enzima de carácter miotóxico perteneciente al veneno de la serpiente *Bothrops moojeni*: Lys49-fosfolipasa A₂, la cual fue co-cristalizada con ácido esteárico (C₁₈H₃₆O₂) (Watanabe, *et al.* 2004). Las coordenadas atómicas iniciales se obtuvieron a partir de la estructura depositada en el Protein Data Bank (PDB) (Berman, *et al.* 2014)) con código 1XXS. Posteriormente, se procedió a la edición y preparación de las estructuras diméricas creando dos sistemas. En el primero, se eliminó todo tipo de residuo ajeno a la proteína (Figura 5.A); en el segundo, se preservó una molécula de ácido esteárico ubicada en el canal hidrofóbico de cada uno de los monómeros que conforman dicha proteína (Figura 5.B).

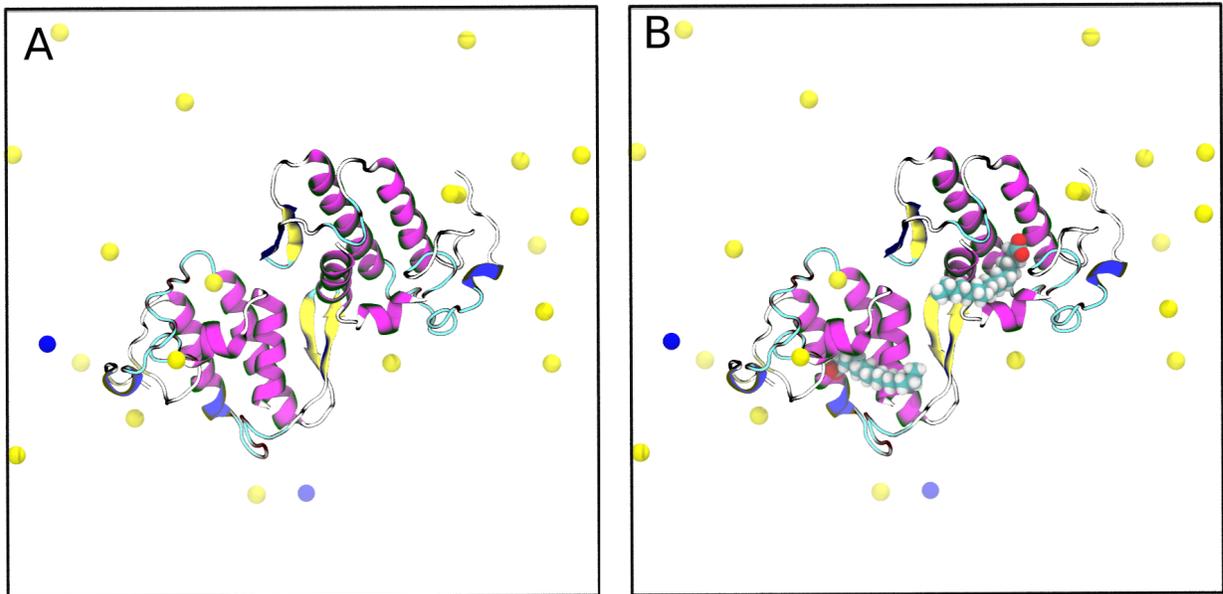


Figura 5. Conformaciones iniciales de los sistemas generados a partir de las coordenadas atómicas tomadas del código PDB 1XXS. **A**, proteína sin ácido esteárico. **B**, proteína con ácido esteárico.

4.2. Protocolo de simulación

El procedimiento por Dinámica Molecular (DM), se realizó utilizando el paquete de simulación biomolecular Gromacs 2018.8, empleando el campo de fuerza Amber99sb-ildn (Lindorff, *et al.* 2010). Los sistemas fueron solvatados con ~28000 moléculas de agua usando el modelo TIP3P (Jorgensen, *et al.* 1983) e implementado una caja cúbica de dimensiones X=Y=Z = 9,59 nm. Dos (2) iones de sodio (Na⁺) y veinte (20) de cloro (Cl⁻) fueron adicionados para equilibrar las cargas del sistema. Inicialmente, se optimizó la estructura mediante un proceso de minimización de energía, empleando 5000 pasos del método Steepest Descent (Nazareth, 2009) con la finalidad de eliminar conformaciones de alta energía que pudiesen generar errores. Durante este proceso se restringió la posición de los átomos pesados usando un potencial armónico con una constante de fuerza de 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻¹ en todas las direcciones cartesianas. Posterior a la minimización y manteniendo la restricción de posición, se acopló el sistema a un ensamble NVT usando el termostato *Velocity rescale* (Bussi, *et al.* 2007) durante 1 ns. Seguidamente, el sistema fue acoplado a un ensamble NpT durante 1ns de simulación implementando el barostato de Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981).

Para dar inicio a las dinámicas de producción, se retiraron las restricciones de posición. La longitud de los enlaces covalentes se mantuvieron constantes utilizando el algoritmo LINCS (Hess, *et al.* 1997). Las interacciones electrostáticas fueron calculadas mediante el esquema de suma de Ewald de malla de partículas (PME) (Abraham & Gready, 2011). El radio de corte electrostático y de Van der Waals fue de 1 nm. Finalmente, se generaron trayectorias durante 100 ns para cada estructura simulada por DM: (i) dímero de Lys49-fosfolipasa A₂ con ácidos esteáricos y (ii) dímero de Lys49-fosfolipasa A₂ sin ácidos esteáricos. Para el análisis de los sistemas fueron empleadas las herramientas de cálculo de Gromacs 2018.8.

4.3. Análisis de las trayectorias

Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), consiste en evaluar la diferencia estructural entre las moléculas (Antunes, 2014). En el caso de la DM, este ejercicio se basa en calcular la desviación estructural durante el tiempo de simulación en relación a una estructura de referencia. En otras palabras, consiste en señalar la desviación de las estructuras desde su configuración inicial durante la trayectoria. El RMSD puede ser expresado como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2 + (z_i - z_j)^2}, \quad \text{Ecuación 2}$$

donde n es el número de átomos pertenecientes al sistema; xyz son las coordenadas espaciales del sistema, e i y j son los átomos a comparar.

La raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF), es una herramienta complementaria al RMSD, que consiste en calcular la magnitud de las fluctuaciones en cada átomo de la estructura desde una posición de referencia (Antunes, 2014). Así, el RMSF se expresa como:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j}^T (x_i(t_j) - x_i')^2}$$

Ecuación 3

donde T es el tiempo total de la trayectoria calculada, x_i' es la posición de referencia para la partícula i .

Área superficial accesible al solvente (SASA), es una propiedad o análisis para el cual no existe una fórmula matemática, dado que los átomos que componen las estructuras son de tipo discreto, haciendo que la superficie calculada no sea sencillamente la suma de superficies correspondientes a los átomos del soluto. Este análisis consistió en hacer rodar una esfera de 1,4 Å sobre la estructura, la cual corresponde al diámetro de una molécula de agua (Sepúlveda, L. 2007).

Análisis de clúster, se realizó implementando el algoritmo GROMOS (Daura, *et al.* 1999) el cual consiste en generar conjuntos de estructuras similares, desde una conformación inicial, que se encuentre en el centro del conjunto con la mayor cantidad de estructuras similares durante la trayectoria, y desde esta, re-definir los agrupamientos que formaran los agregados (Espinosa. 2016). El criterio empleado para la formación de grupos consistió en un radio de corte $\leq 0,30$ nm, desde donde se observó y seleccionó la estructura más probable, para proceder con esta a realizar el docking entre el dímero y los aptámeros.

4.4. Docking

El proceso de docking molecular fue llevado a cabo en el servidor web HADDOCK (por sus siglas High Ambiguity Driven biomolecular DOCKing) versión 2.4 (G,van Zundert, 2016) disponible en: <https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4>. El acoplamiento se realizó entre la estructura más probable del dímero 1XXS y todos los aptámeros resueltos experimentalmente cuyas coordenadas se encuentran disponibles en el PDB (ver tabla 1) y pueden ser revisados en el trabajo de Mohamad, *et al.* (2020).

Tabla 1: Información de los aptámeros usados en el docking aptámero-proteína.

Código PDB	Secuencia 5' a 3'	Longitud
1AC7	ATCCTAGTTATAGGAT	16
1BJH	GTACAAAGTAC	11
1ECU	GCGCGAAACTGTTTCGCGC	19
1EN1	GTCCCTGTTCCGGCGCCA	18
1KR8	GCGAAGC	7
1LA8	CGCGGTGTCCGCG	13
1NGO	CTCTTTTGTAAAGAAATACAAGGAGAG	27
1NGU	CTCTCCTTGATTTCTTACAAAAGAG	27
1POU	GCATCGACGATGC	13
1PQT	GCGAAGC	7
1XUE	GTGGAATGCAATGGAAC	17
1ZHU	CAATGCAATG	10
2K71	GCGAAAGC	8
2L5K	CAGTTGATCCTTTGGATACCCTG	23
2LO5	GGCCGCAGTGCC	12
2LO8	GCCGCAGTGC	10
2LOA	GCCGCAGTGC	10
2M8Y	CGCGAAGCATTCCGCG	15

HADDOCK es una plataforma de acoplamiento molecular que emplea datos experimentales obtenidos de procesos biofísicos, bioquímicos o predicciones bionfórmicas (Panagiotis, *et al.* 2018). El acoplamiento realizado consta de tres fases previamente establecidas:

1. La primera parte llamada it0, consistió en revisar y agregar los hidrógenos faltantes en las moléculas, realizar una minimización de energía a las estructuras y un primer acercamiento al acople de los sistemas aun *rígidos*. En dicho acople se generaron 100 estructuras para las combinaciones aptámero-proteína, manteniendo aquella que obtuvo la puntuación HADDOCK ($HADDOCK_{score}$) más baja (esta puntuación consiste en una sumatoria de características propias de cada acoplamiento, basándose en la energía electrostática, energía de Van Der Waals, energía de desolvatación y restricciones de interacción ambigua (AIR) obteniéndose desde la ecuación 4). Adicionalmente, se implementó un muestreo sistemático de dichas combinaciones giradas 180° para minimizar la ocurrencia de falsos positivos (van Dijk, *et al.* 2006).
2. La segunda parte denominada it1 o refinamiento semiflexible, consistió en evaluar todas las conformaciones establecidas anteriormente, tomar las estructuras con mejor puntuación y proceder a liberar las restricciones de las moléculas. Esta fase a su vez se divide en otras tres sub-fases, las cuales consisten en un escalado de temperatura que enfría el sistema. En el primero, el sistema aptámero-proteína fue acoplado durante 500 pasos a un descenso desde los 2000 a los 500 K usando un paso de integración de 8 fs. En el segundo, se emplearon 1000 pasos para llevar el sistema desde los 1000 a los 50 K con un paso de integración de 4 fs. Finalmente, en un proceso de 1000 pasos el sistema fue llevado de los 300 a 50 K usando un paso de integración 2 fs (van Dijk, *et al.* 2006).
3. Por último, HADDOCK realizó un refinamiento del solvente en una fase denominada itw, que al igual que el paso anterior, consistió en un escalado de temperatura, donde inicialmente, se eleva la temperatura del sistema hasta los 300 K en 100 pasos, seguido por un muestreo de 750 pasos manteniendo la temperatura de referencia (300 K). Finalmente, se realiza un descenso de 300 a 100 K en 500 pasos (van Dijk, *et al.* 2006). El solvente en el que se desarrolló esta fase fue el mismo empleado en nuestras simulaciones, TIP3P.

$$HADDOCKscore = 0,2 * E_{elec} + 1,0 * E_{vdW} + 1,0 * E_{Dsolv} + 0,1 * E_{AIR} \quad \text{Ecuación 4}$$

Teniendo en cuenta que la Lys49-fosfolipasa A₂ presenta una actividad catalítica reducida pero una actividad miotóxica muy elevada, el acoplamiento aptámero-proteína está dirigido a bloquear los residuos miotóxicos Lys20, Lys115 y Arg118, responsables de la disgregación de la membrana.

4.5. Validación del docking

Una vez realizado el docking y seleccionada la estructura con la menor energía de acople calculada por HADDOCK, se procedió a preparar el sistema para iniciar la dinámica de validación. Primero se hidrató nuevamente el sistema agregando los iones correspondiente para neutralizar las cargas en la nueva caja de simulación. Posterior a esto, se realizó una minimización de energía usando el método Steepest Descent tal como se explica en el **Protocolo de simulación**. Seguidamente, se llevó a cabo la

equilibración del sistema aptámero-proteína restringiendo la posición de los átomos pesados usando un potencial armónico con una constante de fuerza de $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$ en todas las direcciones cartesianas, los cuales se fueron liberando gradualmente mientras las simulaciones avanzaban usando los ensambles NVT y NpT tal como se describen en la tabla 2. Finalmente, la dinámica de validación fue implementada manteniendo invariantes los parámetros descritos en el **Protocolo de simulación**.

Tabla 2: Proceso de equilibración usado en el sistema aptámero-proteína.

Paso	Ensamble	Restricción ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$)	Tiempo (ps)
1	NVT	1000	100
2	NVT	800	100
3	NVT	600	100
4	NVT	400	100
5	NVT	200	100
6	NpT	200	125
7	NpT	100	125
8	NpT	50	125
9	NpT	0	125

Los cálculos de producción se llevaron a cabo gracias a la cooperación con el grupo de investigación: Grupo de Mecánica Estadística de Líquidos y Materia Condensada Blanda del Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos, a cargo del Dr. Carlos Manuel Carlevaro Investigador Independiente CONICET (<http://ifllysib.unlp.edu.ar/investigadores-2/>).

5. RESULTADOS

Inicialmente se estabilizaron sistemas simulados por DM: (i) Lys49-fosfolipasa A_2 sin ácidos esteáricos (control) y, (ii) Lys49-fosfolipasa A_2 con ácidos esteáricos en el sitio activo de la enzima. A partir de las conformaciones más estables, seleccionamos la conformación promedio de la enzima con la cual realizamos un análisis en acoplamiento aptámero-proteína, validando dicho acoplamiento mediante dinámica molecular.

5.1. Análisis de trayectorias

Con la construcción de los sistemas Lys49-fosfolipasa A_2 con y sin ácidos esteáricos, analizamos la evolución temporal de sus propiedades físico-químicas. Así en la figura 6 y 7, se observa que los dos sistemas son estables durante los 100 ns de simulación y no presentan variaciones que den indicios de una mala estabilización.

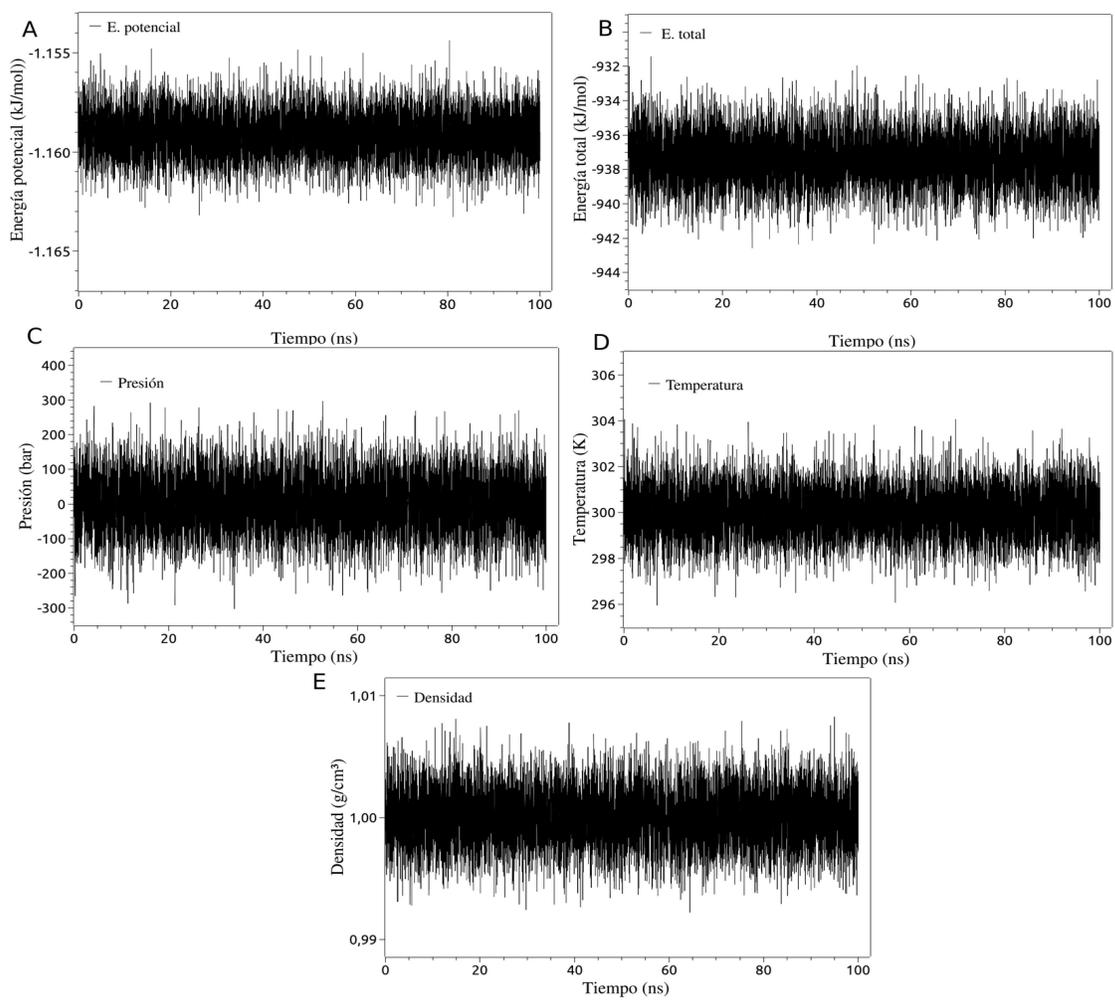


Figura 6. Propiedades físico-químicas del sistema Lys49-fosfolipasa A₂ sin ácido esteárico durante la simulación de DM por 100 ns. **A,** Energía potencial. **B,** Energía total. **C,** Presión. **D,** Temperatura. **E,** Densidad.

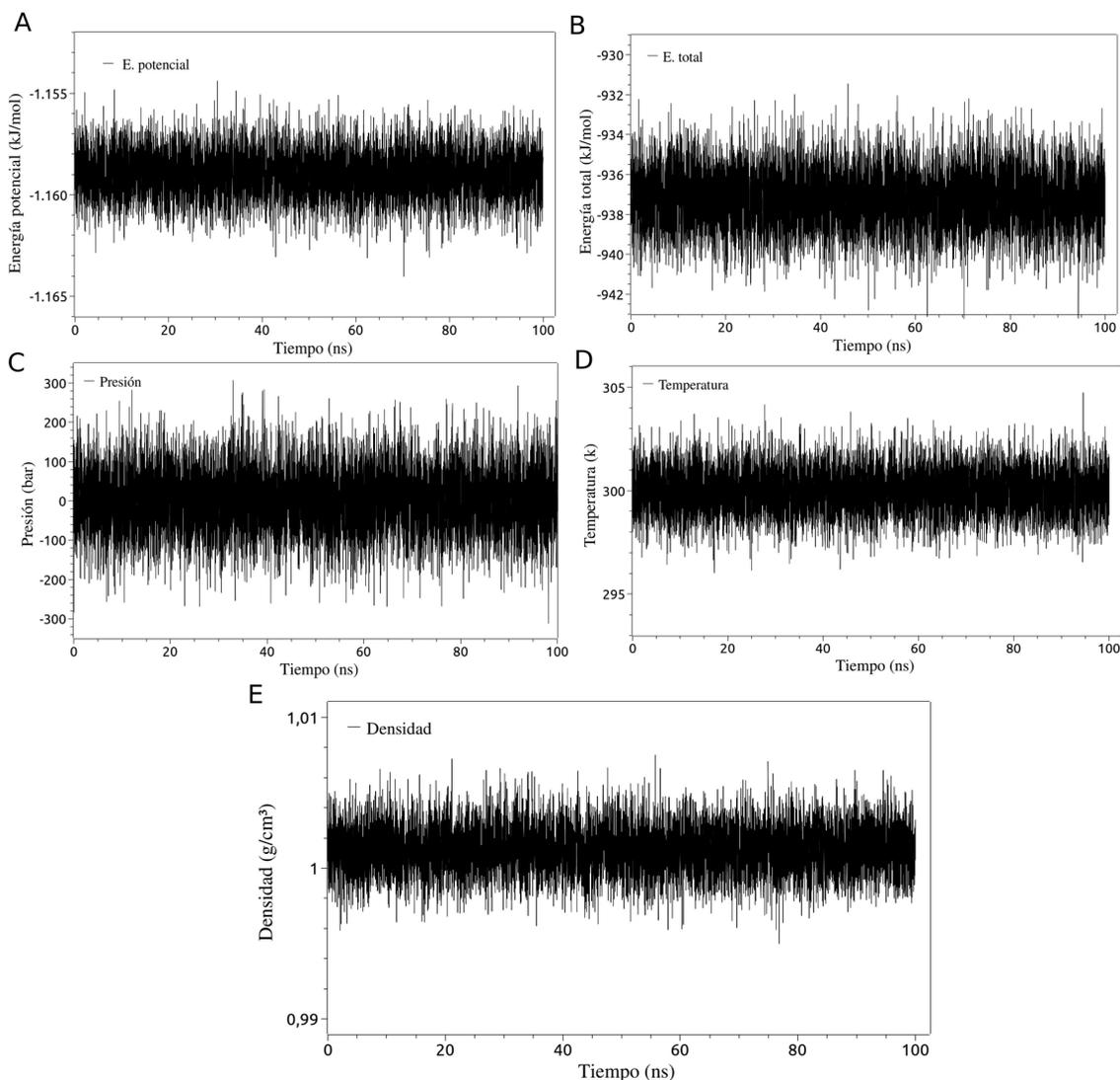


Figura 7. Propiedades físico-químicas del sistema Lys49-fosfolipasa A₂ con ácido esteárico durante la simulación de DM por 100 ns. **A,** Energía potencial. **B,** Energía total. **C,** Presión. **D,** Temperatura. **E,** Densidad.

Así mismo, el análisis estructural de los sistemas mediante el RMSD de las posiciones atómicas del esqueleto proteico (backbone) en la figura 8 señaló, que durante los primeros 30 ns la proteína en ausencia de ácidos grasos presenta una variación conformacional de hasta 1,1 nm, para posteriormente descender a un valor aproximado de 0,42 nm durante los 70 ns finales del tiempo de simulación. Por su parte, el sistema proteico con ácidos grasos, mostró un RMSD más estable, que converge rápidamente al valor de RMSD del sistema control.

Las variaciones iniciales, observadas en el sistema control, pueden atribuirse a un incremento en los grados de libertad del dímero proteico causado por la ausencia de moléculas de ácido esteárico,

indicando una mayor variación en la estructura de la proteína, llevando así, a un mayor tiempo de estabilización. Este efecto está ausente en el complejo dimérico con ácido esteárico.

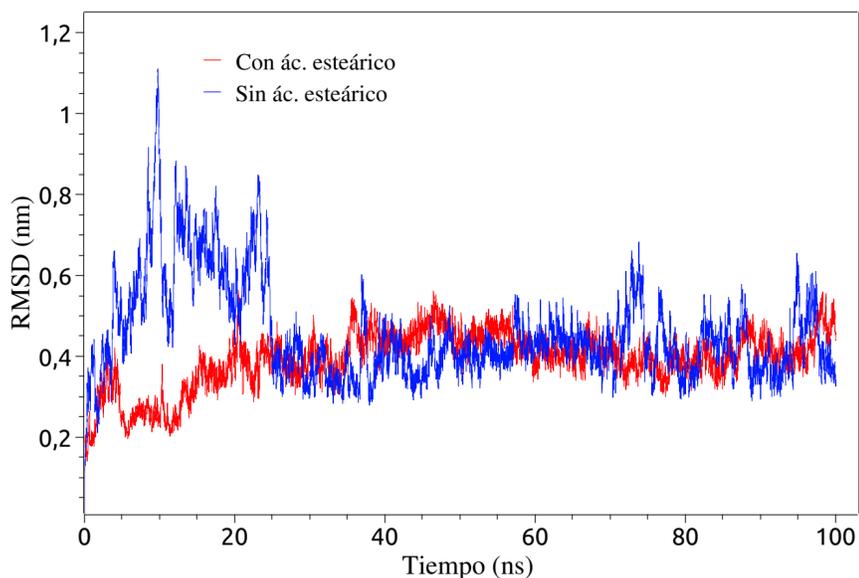


Figura 8. Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de los sistemas evaluados por medio de DM en presencia y ausencia de ácido esteárico. El calculo del RMSD se llevo acabo sobre todos los átomos en el dímero.

En la figura 9, se observa el calculo de la RMSF de los carbonos $C\alpha$ en los sistemas proteicos en presencia y ausencia de ácido esteárico. En estos se evidencia una menor fluctuación por parte del sistema que contiene el ácido graso, lo cual se traduce en una mayor estabilidad en el complejo, lo que a su vez, está en concordancia con la menor desviación estructural observada en el RMSD (Figura 8). Los resultados también señalan, que los residuos del sitio activo, His48, Lys49, Tyr52 y Asp99, responsables de la actividad catalítica y por tanto de la interacción enzima-ácido esteárico reducen su movilidad al estar en contacto con el ácido graso.

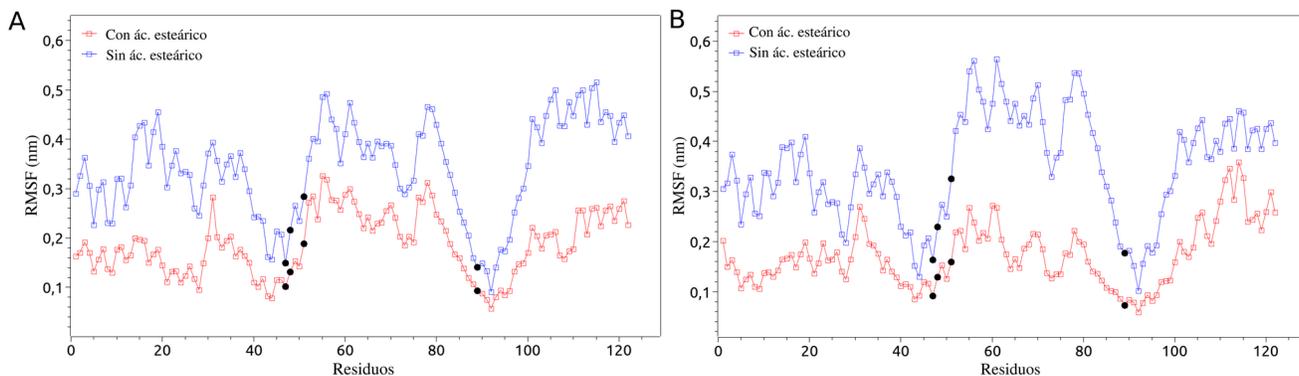


Figura 9. Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de los sistemas evaluados por medio de DM en presencia y ausencia de ácido esteárico. Los residuos señalados en negro, corresponden al sitio de interacción entre la proteína y el ácido esteárico. De izquierda a derecha los residuos His48, Lys49, Tyr52 y Asp99. **A**, monómero 1. **B**, monómero 2.

Por otra parte, en el análisis del área superficial accesible al solvente SASA (Figura 10), es evidente que los cambios conformacionales en el RMSD de las estructuras diméricas y las diferencias en la

fluctuación de sus residuos no altera su área superficial, por tanto, el sistemas dímérico no ve alterada su superficie de hidratación. Esto permite inferir que los cambios conformacionales en el dímero son exclusivos del sitio activo y están estrechamente ligados a la presencia o no de los ácidos grasos.

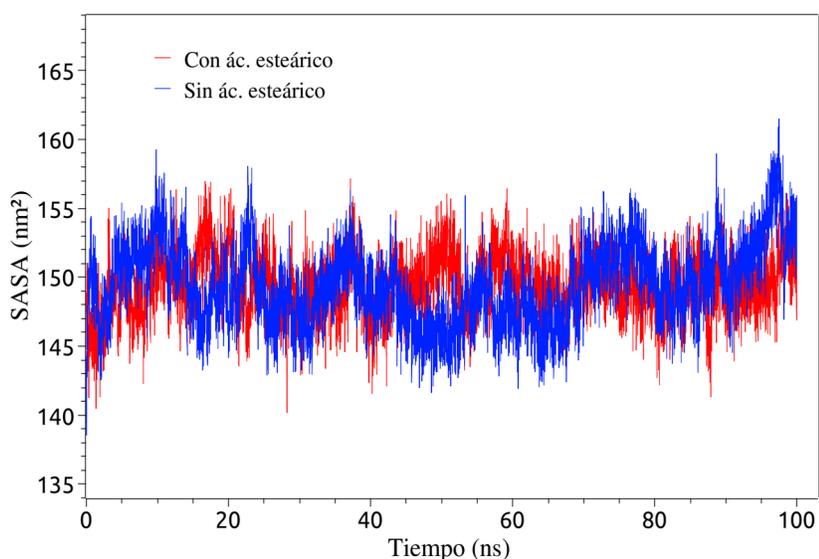


Figura 10. Área superficial accesible al solvente (SASA) de los sistemas evaluados por medio de DM en presencia y ausencia de ácido esteárico.

La mayor estabilidad mostrada en el RMSD (Figura 8) y RMSF (Figura 9) por parte del sistema en presencia de ácido esteárico, y la equivalencia indicada por los dos complejos en el análisis SASA (Figura 10), permitió la elección de este sistema para la realización del análisis de cluster (Figura 11). Observándose la presencia de cinco (5) grupos (cluster); seleccionando aquel con el mayor número de conformeros estructurales y a partir del cual se tomó la estructura promedio con la que posteriormente se llevaron a cabo los análisis de Docking.

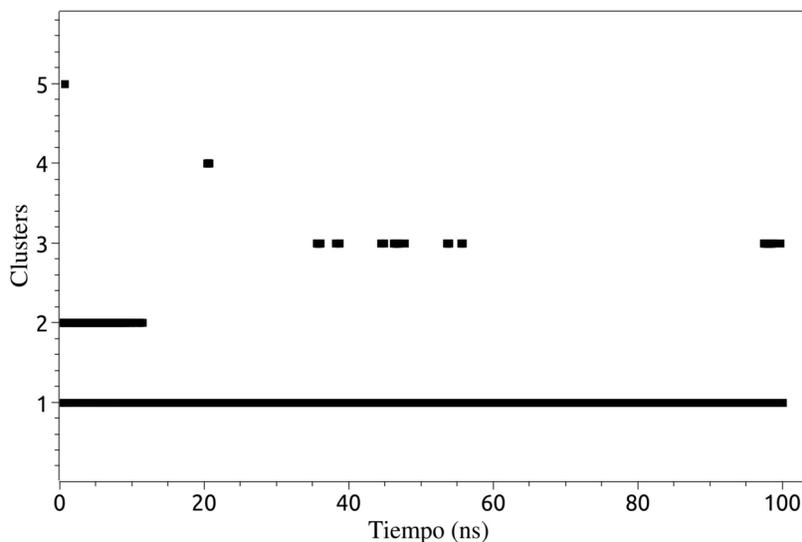


Figura 11. Análisis de cluster de las confirmaciones obtenidas durante 100 ns de simulación en presencia de ácido esteárico. El radio de corte usando fue de 0,3 nm.

5.2 Docking

El criterio de selección del complejo aptámero-proteína esta dado (i) por su menor longitud de pares de bases y (ii) por el $HADDOCK_{Score}$ más bajo. Esto debido a que el presente trabajo pretende generar un protocolo de análisis que permita estudiar el posible uso de los aptámeros como tratamiento terapéutico contra el accidente ofídico; por está razón y dada la complejidad del sistema (dímero, ácidos grasos, ácidos nucleicos, iones y solvente) preferimos orientar el presente análisis a la estructura menos compleja posible y computacionalmente más eficiente de simular. Así, como se observa en la tabla 3 dos aptámeros coinciden con el criterio de longitud (7 pb) 1PQT y 1KR8 (Figura12), seleccionando este último por poseer un $HADDOCK_{Score} = -96,850$ kJ/mol.

Tabla 3: Puntuación HADDOCK para los aptámeros presentados en el docking a la proteína.3

Aptámero	Longitud (pb)	Elec (kJ/mol)	VdW (kJ/mol)	D_{solv} (kJ/mol)	AIR	$HADDOCK_{Score}$ (kJ/mol)
1KR8	7	-413,618	-21,727	7,401	2	-96,850
1PQT	7	-336,926	-25,440	3,102	0	-89,723
2K71	8	-364,089	-28,625	6,122	0	-95,321
1ZHU	10	-310,784	-34,546	0,584	3	-95,819
2LO8	10	-335,560	-37,380	2,565	0	-101,927
2LOA	10	-363,931	-27,094	11,474	2	-88,206
1BJH	11	-427,903	-16,048	10,688	3	-90,641
2LO5	12	-449,301	-32,061	9,231	5	-112,190
1LA8	13	-452,378	-34,868	13,003	5	-111,841
1POU	13	-505,814	-32,700	17,257	3	-116,306
2M8Y	15	-458,798	-24,498	1,295	3	-114,663
1AC7	16	-428,044	-62,376	3,666	1	-144,219
1XUE	17	-432,384	-38,186	9,629	4	-114,634
1EN1	18	-464,608	-61,112	4,856	2	-148,978
1ECU	19	-592,628	-36,437	7,472	3	-147,191
2L5K	23	-567,338	-32,771	8,506	9	-136,833
1NGO	27	-529,681	-39,776	3,950	12	-140,562
1NGU	27	-542,700	-45,050	7,889	10	-144,701

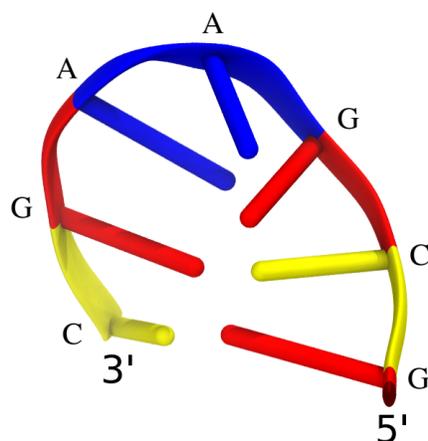


Figura 12. Aptámero 1KR8 utilizado para el docking con la proteína Lys49-fosfolipasa A₂. El color rojo representa la guanina, el amarillo la citosina y el azul la adenina.

5.3. Validación

Una vez se realizó el docking, generamos una nueva trayectoria por DM para la validación y evaluación del comportamiento de las moléculas en el nuevo sistema (Figura 14). A partir de esta validación entre la proteína Lys49-fosfolipasa A₂ y el aptámero 1KR8 realizada por DM, se calculó el RMSD para los monómeros que conforman dicha proteína y para los aptámeros enlazados con esta (Figura 13). La figura 13.A señaló que los monómeros presentan un comportamiento similar en las desviaciones de su estructura, permaneciendo estables durante toda la trayectoria, con pequeñas diferencias desde los 5 hasta los 65 ns, para estabilizarse conjuntamente en una desviación aproximada de 0,25 nm. Por su parte, el RMSD de los aptámeros mostrado en la figura 13.B, señaló oscilaciones de hasta 0,5 nm, en los primeros 60 ns, y a partir de este punto, sus desviaciones convergen en una medida aproximada de 0,3 nm; los movimientos iniciales presentados por los aptámeros pueden deberse a una exploración conformacional que les permite establecer interacciones estables con la proteína.

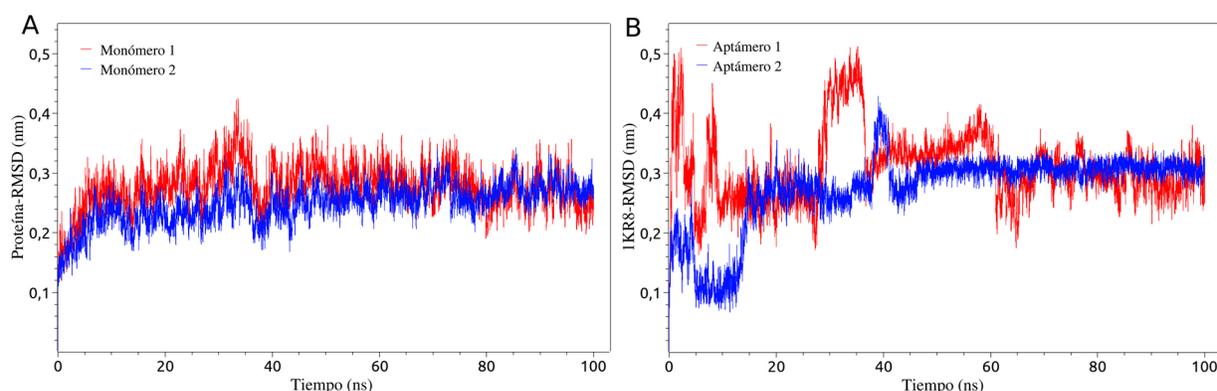


Figura 13. Evolución temporal de la Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD). El calculo del RMSD se llevo acabo sobre todos los átomos de cada monómero (A) en la Lys49-fosfolipasa A₂ y sobre los aptámeros ligados a cada monómero (B).

En la figura 14, se observa el RMSF para los residuos de la proteína y los nucleótidos que conforman los aptámeros incluidos en el sistema. Se evidenció un comportamiento similar por parte de los dos monómeros, con movimientos de hasta 0,25 nm (Figura 14.A). Los residuos que tienen contacto directo con los aptámeros (Lys20, Lys115 y Arg118), muestran una menor fluctuación. Por su parte, la figura 14.B, señaló un comportamiento similar en los primeros cinco nucleótidos de los aptámeros, y en los dos restantes, hubo una notoria diferencia en cuanto a su movimiento; entendiéndose como las distintas conformaciones tomadas por cada aptámero en su respectivo monómero.

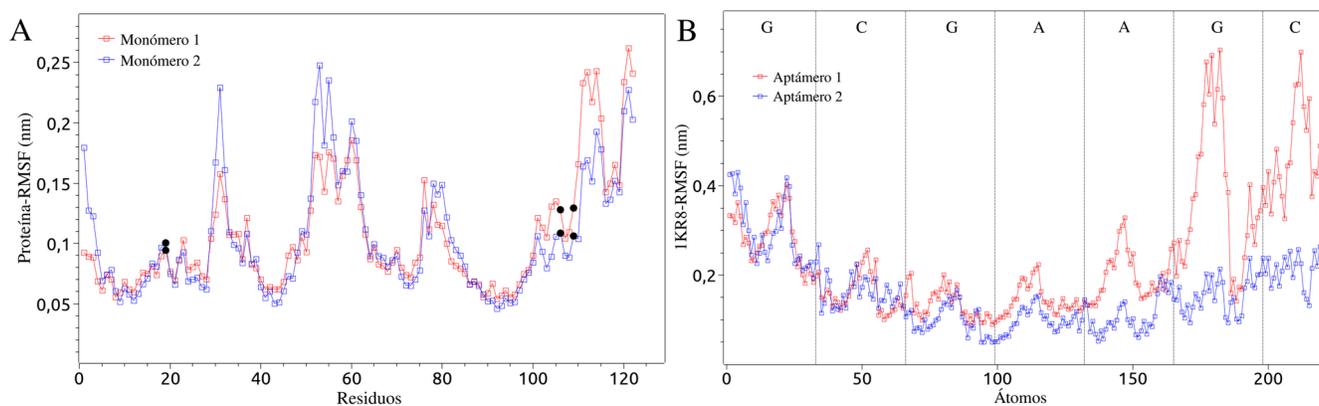


Figura 14. Raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF) del sistema evaluado por DM en presencia del aptámero 1KR8. El RMSF se realizó sobre cada monómero (A) por separado y sobre los aptámeros (B) presentes en el sistema. Los residuos en círculos negro, corresponden al sitio de interacción entre la proteína y el aptámero, de izquierda a derecha los residuos Lys20, Lys115 y Arg118.

La cantidad de puentes de hidrógeno (PH) formados entre el complejo proteína-aptámero durante la validación del docking a lo largo de la DM (Figura 15), mostró un promedio de diez (10) PH durante los 100 ns de trayectoria y no se observaron diferencias que indiquen una interacción selectiva monómero-aptámero.

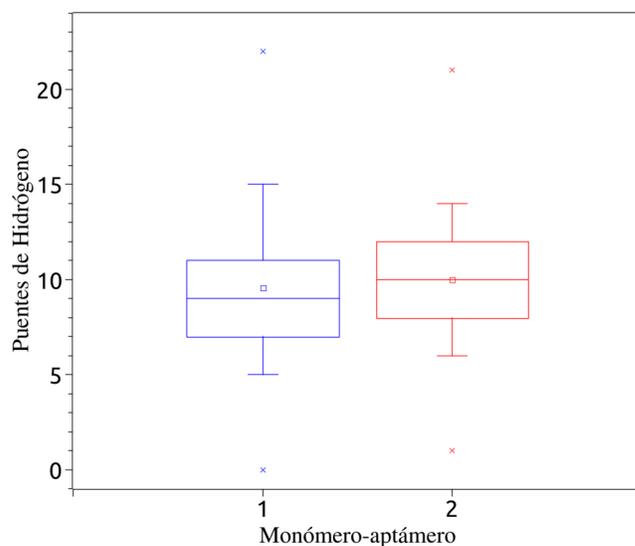


Figura 15. Puentes de hidrógeno entre la proteína Lys49-fosfolipasa A₂ y el aptámero 1KR8 correspondiente a cada monómero durante la DM.

La matriz de distancias observada en la figura 16, señala los sitios de interacción o cercanía entre los residuos de cada monómero y los nucleótidos pertenecientes a los aptámeros. Este análisis muestra que el aptámero se mantiene en vecindad con los residuos miotóxicos Lys20, Lys115 y Arg118 en la Lys49-fosfolipasa A₂, lo cual indicaría la estabilidad del aptámero en contacto con la proteína.

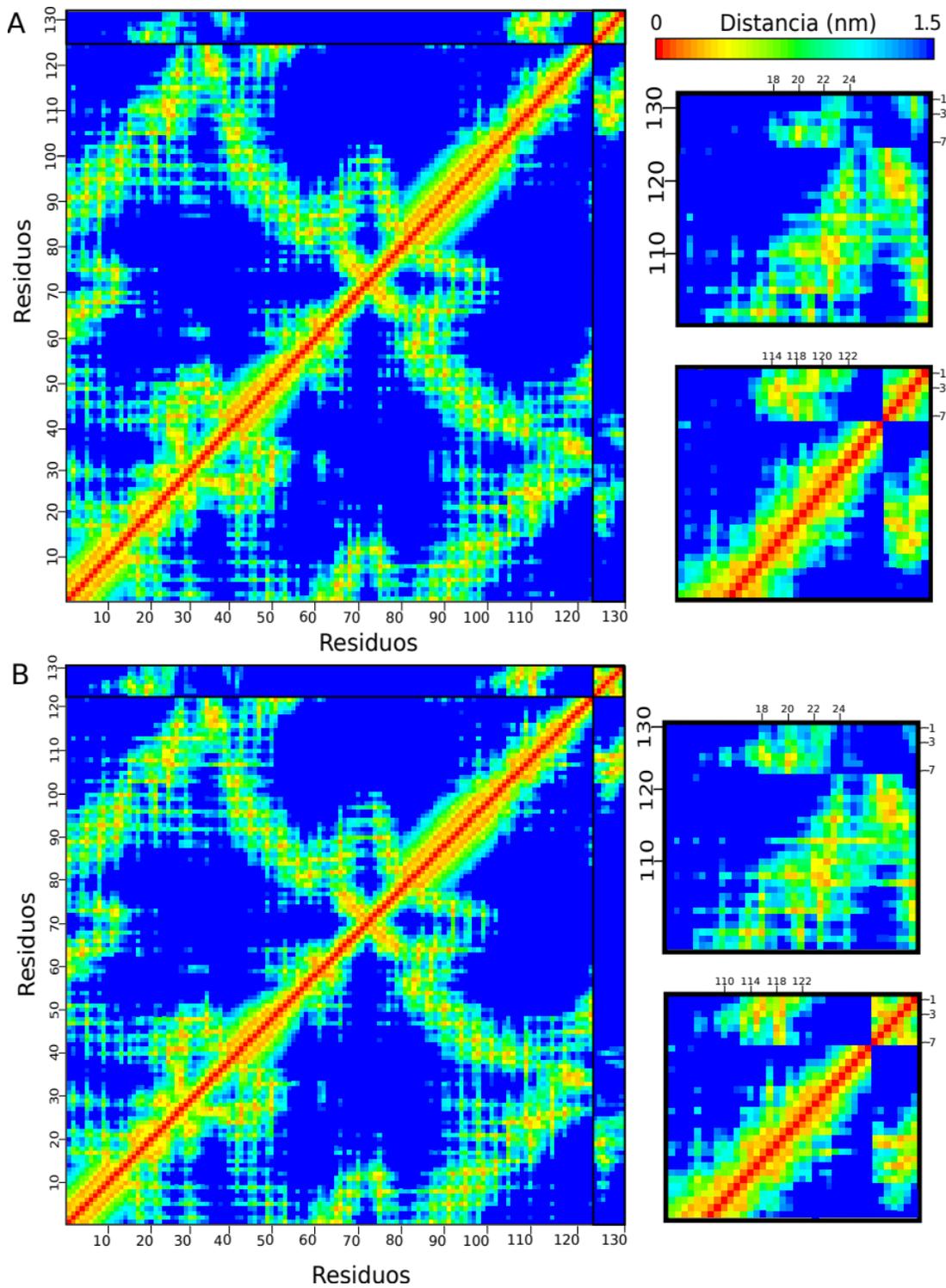


Figura 16. Matriz de distancias entre los monómeros de Lys49-fofolipasa A₂ y los aptámeros. Cada representación tiene una vista ampliada de las esquinas superiores izquierda y derecha, señalando la sección que muestra el contacto entre el aptámero y los residuos Lys20, Lys115 y Arg118. La escala de numeración correspondiente a las representaciones ampliadas, indican la longitud del aptámero, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 equivalen a 5'-G, C, G, A, A, G y C-3' respectivamente. **A.** monómero 1-aptámero. **B.** monómero 2-aptámero.

Así mismo, la matriz de distancias, se refuerza con una representación visual del complejo correspondiente a proteína-ácido graso-ácido nucleico (Figura 17), donde se traduce la matriz de contactos a una visualización de la estructura tridimensional que indica la correcta ubicación del aptámero en la región seleccionada para el docking.

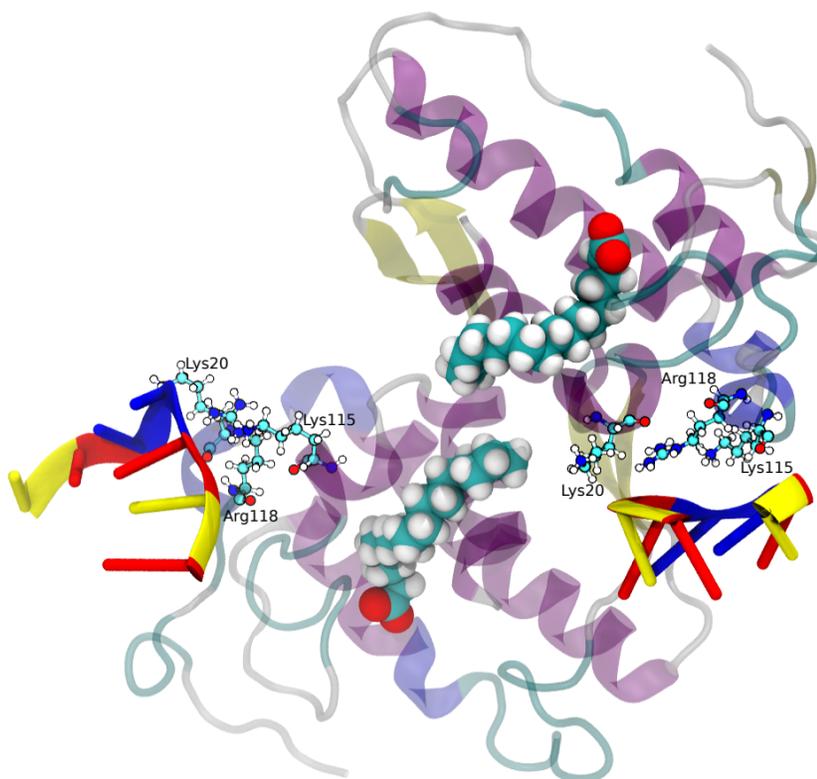


Figura 17. Representación visual de la interacción entre Lys49-fosfolipasa A₂ y el aptámero 1KR8. Donde se señala los ácidos esteáricos al interior de la proteína y los aptámeros junto a los residuos correspondientes a su interacción (Lys20, Lys115 y Arg118).

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las fosfolipasas son enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de los enlaces ester sn-2 de los fosfolípidos, liberando así ácidos grasos y lisofosfolípidos (Watanabe, *et al.* 2005). El mecanismo de hidrólisis de los lípidos mediante estas enzimas indica que la His48 y la Asp49 trabajan conjuntamente para extraer un protón de una molécula de agua conservada, lo que posteriormente facilitará el ataque nucleofílico sobre el ester en el fosfolípido, formando así un intermediario tetraédrico oxianiónico (Araujo, *et al.* 1996, Scott, *et al.* 1990). Para que la actividad catalítica sea posible, esta enzima debe interactuar con los fosfolípidos de membrana; tal interacción es posible gracias a una hendidura hidrofóbica que se encuentra en la superficie de la proteína la cual está rodeada de aminoácidos polares que reconocen la superficie de la membrana, y de esta forma se facilita la difusión de moléculas de fosfolípidos desde la membrana hacia el sitio catalítico de la enzima (Scott, *et al.* 1990).

Los venenos de las serpientes generalmente contienen enzimas homólogas en las que el Asp49 es sustituido por una Lys; este cambio de aminoácido genera una nueva variante Lys49-fosfolipasa A₂, que no muestra una actividad catalítica apreciable, sin embargo posee la capacidad de alterar la integridad de la membrana y provocar la liberación de los lípidos (Watanabe, *et al.* 2005. Araujo, *et al.* 1996. Díaz, *et al.* 1991). Además, la presencia de la Lys49 lleva a una pérdida de la actividad hidrolítica, en la cual, durante un primer ciclo de reacción, los ácidos grasos quedan atrapados en el sitio activo de la enzima interrumpiendo de esta forma el ciclo catalítico (Watanabe, *et al.* 2005. Araujo, *et al.* 1996).

Así mismo, Dos Santos, *et al.* (2009), demostraron que la presencia de estos ácidos grasos ligados al sitio activo induce un mayor orden en la estructura de la enzima. Este mismo efecto es observado en el modelo planteado en el presente trabajo, cuando se evalúa el RMSD (Figura 8) y RMSF (Figura 9) del homodímero Lys49-fosfolipasa A₂. Con esto, la evidente reducción en la fluctuación de la estructura proteica, permite seleccionar al complejo proteína-ácidos grasos como el más estable en concordancia con los datos experimentales. Así, el establecimiento de este complejo conlleva cambios conformacionales que reordenan la estructura de la enzima y, como lo demuestran Dos Santos, *et al.* (2009), conducen a la formación de puentes de hidrógeno entre la Tyr119 y los residuos próximos a esta en la proteína (Pro37, Tyr117, Arg118, Lys122, Phe125) (Figura 18), lo cual es una característica importante para la miotoxicidad de estas enzimas.

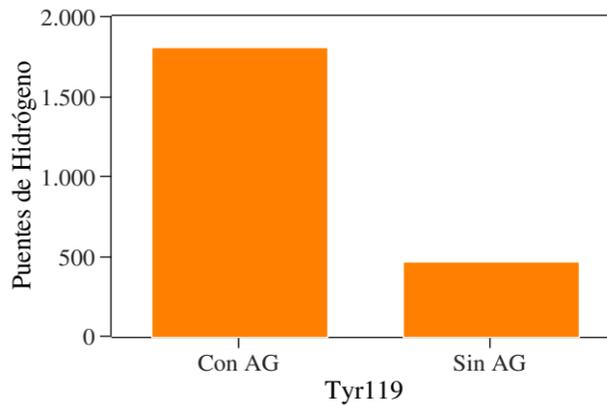


Figura 18. Puentes de hidrógeno formados entre la Tyr119 y los residuos cercanos a esta (Pro37, Tyr117, Arg118, Lys122, Phe125) en presencia (Con AG) y ausencia (Sin AG) de ácidos grasos.

Cuando se realizó el acoplamiento dirigido (Doking) a la región miotóxica de Lys49-fosfolipasa A₂, empleando para esto aptámeros con estructuras resueltas experimentalmente listados en la tabla 1 (Mohamad, *et al.* 2020), se observó que el aptámero 1KR8, bloquea eficientemente esta región (Figura 17) gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre el aptámero y la enzima (Figura 15). Una inspección visual en la estructura muestra que la conformación tomada por el aptámero en contacto con la proteína, señala que el ácido nucleico dispone sus bases nitrogenadas hacia el solvente, siendo los fosfatos quienes entran en contacto con los residuos de la proteína (Figura 19). La formación del complejo y su estabilización está dada por el apantallamiento de las cargas negativas en los grupos fosfato del aptámero por parte de los grupos amina cargados positivamente, y ubicados en las cadenas laterales de los residuos Lys20, Lys115 y Arg118. Así, tal como se muestra en la figura 19, los residuos miotóxicos en la proteína funcionan como contraiones y dan estabilidad estructural al aptámero. Este

mismo efecto fue observado cuando se usa heparina como inhibidor del efecto mitotico en la fosfolipasa A₂ de *Bothrops asper*, donde la formación del complejo enzima-heparina es estabilizado por las interacciones electrostáticas entre los grupos negativamente cargados de la heparina y las numerosas cargas positivas en los residuos mitotóxicos de la proteína (Lamonte, *et al.* 1194).

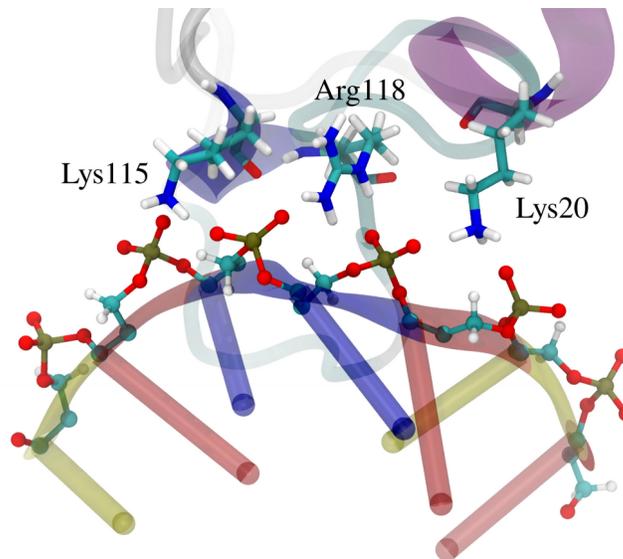


Figura 19. Complejo formando entre la Lys49-fosfolipasa A₂ y el aptámero 1KR8.

Actualmente, el ofidismo es tratado mediante la administración de anticuerpos previamente generados (inmunización pasiva) con distintos tipos de tratamientos, como purificaciones y digestiones enzimáticas para disminuir los efectos adversos que se puedan generar sobre los pacientes; dichos procesos de mejoramiento, aumentan considerablemente los costos de producción de los anti venenos (Gómez, *et al.* 2017); los aptámeros se han investigado como una nueva alternativa al desarrollo de fármacos y a la implementación de anticuerpos, no solo en aplicaciones como la postulada en este trabajo, sino en un gran número de áreas; los estudios con estas moléculas se han desarrollado rápidamente, hasta el punto que en la actualidad existen varios aptámeros que se encuentran en fase clínica, lo que permite especular que una cantidad importante de estos puedan tener salida al mercado en un futuro cercano (Hernández y Botero. 2012, Ospina. 2020).

Los aptámeros, presentan una mayor afinidad y especificidad con las dianas, tienen un bajo costo de producción, poseen una menor inmunogenicidad e igualmente una menor reactividad cruzada inespecífica (Devi y Chaitanya. 2021), nuestro modelo demuestra que estas moléculas también son potencialmente idóneas para dirigir la inhibición de la actividad mitotóxica en Lys49-fosfolipasa A₂, haciendo de estos una excelente opción para el tratamiento terapéutico contra el accidente ofídico.

7. CONCLUSIÓN

El análisis de la interacción entre los aptámeros y la proteína Lys49-fosfolipasa A₂, permitió demostrar la capacidad de estos ácidos nucleicos para adherirse a los residuos con actividad mitotóxica en la proteína. Lo que permite postular estas moléculas, como una potencial alternativa al uso de anticuerpos

equinos como tratamiento terapéutico del accidente ofídico.

El aptámero evaluado, demostró poseer una alta estabilidad con la proteína, evidenciada con el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las dos moléculas. Finalmente, se espera en un futuro poder realizar este estudio en ensayos *in vitro*, para corroborar los resultados aquí evidenciados. Así mismo, se continuará validando los aptámeros que no pudieron ser analizados en el presente trabajo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, M. J., & Gready, J. E. (2011). Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *Journal of computational chemistry*, 32(9), 2031-2040.

Alonso, H. Bliznyuk, A. Gready, E. 2006. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Med. Res. Rev.* 26, 531–568.

Ambrosio, A.L.B., Nonato, M.C., Selistre-de-Araújo, H.S., Arni, K., Ward, R.J., Ownby, C.H., de-Souza, D.H.F., Garratt, R.C., 2005. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* 280, 7326–7335.

Antunes Dos Santos Deborah. 2014. Proposição de modelos tridimensionais da extensão COOH-terminal da cisteíno-protease B de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Tesis de maestría, instituto Oswaldo Cruz.

Araujo, H. S. S., White, S. P., & Ownby, C. L. 1996. Sequence analysis of Lys49 phospholipase A₂ myotoxins: a highly conserved class of proteins. *Toxicon*, 34(11-12), 1237-1242.

Baez C. Leonardo. 2013. Simulación por dinámica molecular de fosfolípidos usando GROMACS. Universidad de Sonora

Ballón, W. Grados, R. 2019. Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia* N°2/vol.7: 55-72. ISSN: 2310-0265

Bardales F. R. 2006. Ofidismo: experiencia clínica en la Amazonía Peruana. I Curso Internacional de Enfermedades infecciosas; Perú.

Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Di Nola, A.; Haak, J. R. 1984. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81 (8)

Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H., & Markley, J. L. 2013. *Biopolymers*. 99(3), 218-222.

Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2014). The Protein Data Bank archive as an open data resource. *Journal of computer-aided molecular design*, 28(10), 1009-1014.

Bruno, J. G. 2015. Predicting the uncertain future of aptamer-based diagnostics and therapeutics. *Molecules*, 20(4), 6866–6887.

Burke, J., Dennis, E. 2009. Estructura, función, mecanismo y señalización de la fosfolipasa A₂. 50 (Supl.): S237 – S242.

Bussi, G., Donadio, D., & Parrinello, M. 2007. *The Journal of chemical physics*. 126(1), 014101

- Castrillón, David F. Acosta, Juan G. Hernández, Eder A. Alonso, Luz M. 2007. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*. Barranquilla (Col.); 23 (1): 96-111
- Chioato, L., Aragão, E.A., Ferreira, T.L., Medeiros, A.I., Faccioli, L.H., Ward, R.J., 2007. Mapping the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1247–1257.
- David F. Castrillón-Estrada, J. G.-R. 2007. Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte*, 23 (1): 96-111.
- Daura, X. Gademann, K. Jaun, B. Seebach, D. van Gunsteren, F. Mark, A. 1999. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, No. 1.
- Devi, A. Chaitanya, N. S. N. 2021. Designing of peptide aptamer targeting the receptor-binding domain of spike protein of SARS-CoV-2: an in silico study. *Molecular Diversity*. doi:10.1007/s11030-020-10171-6
- Delves, P., Seamus, M., Burton, D., & Roitt, I. 2011. *Roitt Inmunología Fundamentos*. Panamericana.
- Díaz, C., Gutiérrez, J., Lomonte, B., & Gené, J. 1991. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba)-Biomembranes*, 1070(2), 455-460.
- dos Santos, J. I., Soares, A. M., & Fontes, M. R. 2009. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A2 from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. *Journal of structural biology*, 167(2), 106-116.
- Espinosa Silva Yanis Ricardo. 2016. Estudio de la desnaturalización en frío de proteínas mediante simulaciones computacionales. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata.
- Escobar, Carlos. Reyes, Carlos. Acevedo, Ignacio. Salazar, Carlos. 1985. *Serpientes de Colombia*. Vol. XXXVI, N°1. UNAL Medellin.
- Fischer, E. 1894. *Informes de la sociedad química alemana*. 27: 2985 – 2993.
- Fonseca, J. 2016. *Anatomía y fisiología de las serpientes, órganos y sistemas*.
- García, A. Cardona, A. 2009. Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repertorio de cirugía y medicina*. Vol 18 N° 4.
- G.C.P van Zundert, J.P.G.L.M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P.L. Kastritis, E. Karaca, A.S.J. Melquiond, M. van Dijk, S.J. de Vries and A.M.J.J. Bonvin (2016). "https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/." *J. Mol. Biol.*, **428**, 720-725.
- Gil, G. Sánchez, M. Reynoso, V. 2011. Tratamiento pre hospitalario del accidente ofídico: revisión,

actualización y problemática actual. *Gaceta Médica de México*. 147:195-208

Gold B.S., Dart R.C. & R.A. Barish. 2002. Bites of Venomous Snakes. *N. Engl. J. Med.* 347: 347-356.

Gómez JP, Gómez C, Gómez ML. 2017. Sueros antiofídicos en Colombia: análisis de la producción, abastecimiento y recomendaciones para el mejoramiento de la red de producción. *Revista Biosalud*; 16(2): 96-116 DOI: 10.17151/biosa.2017.16.2.9

González, R., Larrea, L., Rodríguez, G., & Naves, M. 2000. *Inmunología Biología y patología del sistema inmune*. Panamericana.

Gutierrez J. M, Burnouf T, Harrison R. A, Calvete J. J, Kuch U. 2014. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bulletin of the World Health Organization*. 92(7):526-32.

Gutiérrez J. M, Williams D, Fan H. W, Warrell D. A. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 56(7):1223-35.

Harris, John. Scott-Davey, Tracey. 2013. Secreted Phospholipases A2 of Snake Venoms: Effects on the Peripheral Neuromuscular System with Comments on the Role of Phospholipases A2 in Disorders of the CNS and Their Uses in Industry. 5 (12): 2533–2571.

Hays, E. M., Duan, W., & Shigdar, S. 2017. Aptamers and glioblastoma: Their potential use for imaging and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).

Hernández, Frank J., & Botero Hincapié, Juliana Andrea. 2012. Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia*, 25(2),159-168. ISSN: 0121-0793

Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C. and Fraaije, J. G. E. M. 1997. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J.Comp. Chem.* 18: 1463-1472

Huey, R., Morris, G. M., & Forli, S. (2012). *Usando AutoDock 4, AutoDock Vina y AutoDockTools: Un tutorial*. La Jolla, CA: The Scipps Institute of Technology.

Inga, R. Vivas, D. Palermo, P. Mendoza, J. Lazo, F. Yarlequé, A. 2010. Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A₂ del veneno de *Lachesis muta*. *Rev. peru. Biol.* 17(1): 123 – 128

Janaka de Silva D, Anuruddha A. 2013. Snakebite: The true disease burden has yet to be determined. *The Ceylon Medical Journal*. 58(3):93-5.

Jorgensen, William L. Chandrasekhar, Jayaraman. Madura, Jeffry D. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Chem. Phys.* 79(2).

- Kasturiratne A, Wickremasinghe A. R, De Silva N, Gunawardena N. K, Pathmeswaran A. 2008. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS medicine*. 5(11):1591-604.
- Kini R.M. 2003. Excitament ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.
- Lie, A. Thomsen, R. Pedersen, C. Schiøtt, B. Christensen, M. 2011. Molecular docking with ligand attached water molecules. *J. Chem. Inf. Model.* 51, 909–917.
- Lillywhite, H. B. L. 2014. How Sankes Work. In *How snakes work: structure, function, and behavior of the world’s snakes*. Obtenido de: <http://animals.howstuffworks.com/snakes/snake.htm/printable>
- Lindorff-Larsen, K. Piana, S. Palmo, K. Maragakis, P. Klepeis, J. L. Dror, R. O. Shaw, D. E. 2010. Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field. *Proteins: Struct., Funct., Genet*, 78, 1950–1958.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U., & Hanson, L. Å. 1994. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochemical pharmacology*, 47(9), 1509-1518.
- Lynch, J. D. 2012. El contexto de las serpientes de Colombia con un análisis de las amenazas en contra de su conservación.
- Manjunatha Kini, R. 2003. Emoción por delante: estructura, función y mecanismo de las enzimas fosfolipasa A2 del veneno de serpiente. *Toxicon*, 42 (8), 827–840. doi: 10.1016
- Manley, J. L. 2013. *Cold Spring Harb Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot072934
- Metz, M., Piliponsky, A., Chen, Ch., Lammel, V., Abrink, M., Pejler, G., Tsai, M., Galli, S. 2006. Mast Cell can Enhance Resistance to Snake and Ho-neybee Venoms. *Science*; 313: 526-530.
- Mohamad, S. Azzmer, H. Sharifah, H. Zulkhairi. R. 2020. The assessment of three dimensional modelling design for single strand DNA aptamers for computational chemistry application. *Biophysical Chemistry* 267 – 106492
- Moreno, A., An, J. U., Ilo, C. A. M., & Strepo, R. E. 1986. Anotaciones sobre Ofidios en la Región de Urabá. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 39(1), 37–60.
- Nazareth, J. L. 2009. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 1(3), 348-353
- Ospina, J. D. 2020. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 40(Supl. 1), 148–165.

Otero, R. Silva, J. Barona, M. Toro, M. Quintana, J. Díaz, A. Vásquez, I. Rodríguez V. Delgado, C. Fernández, M. Ayala, A. Conrado, N. Marín, C. Ramírez, C. Arrieta, A. Córdoba, E. Ruiz, T. García, M. Aguirre, A. Londoño, J. Ospina, N. Macías, D. Jaramillo, O. Peláez, H. Espinal, M. Camargo, J. 2008. Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. *Iatreia*, vol. 20, núm. 3, septiembre, 2007, pp. 244-262

Panagiotis I. Koukos, Inge Faro, Charlotte W. van Noort and Alexandre M.J.J. Bonvin. 2018. A Membrane Protein Complex Docking Benchmark. *J Mol Biol* 430, 5246–5256

Parrinello, M. Rahman, A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Phys.* 52, 7182

Patiño, C; Blanca, S. 2002. Serpientes venenosas. Grupo de Estudio de Animales Silvestres (Boletín GEAS). VOLUMEN III, Núm. 1- 6

Pronk, S., S. Pall, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess and E. Lindahl (2013). "GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit." *Bioinformatics* 29(7): 845-854.

Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., & Sigler, P. B. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science*, 250(4987), 1541-1546.

Sepúlveda Durán, Leonardo Andrés. 2007. Estudio de dinámica molecular con solvente implícito de la influencia de la interfase de interacción entre los dominios de la proteína FTSZ en la estabilidad y plegamiento. Universidad de Chile.

van Dijk, M., van Dijk, A. D. J., Hsu, V., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2006). Information-driven protein-DNA docking using HADDOCK: it is a matter of flexibility. *Nucleic Acids Research*, 34(11), 3317–3325.

Watanabe, L., Soares, A. M., Ward, R. J., Fontes, M. R., & Arni, R. K. (2005). Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A2: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. *Biochimie*, 87(2), 161-167:42-51.

Zambrano ÁM. 2012. Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión. Universidad Nacional de Colombia