



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO:  
EL MODELADO MOLECULAR COMO  
HERRAMIENTA PARA EL DESCUBRIMIENTO  
DE NUEVOS FÁRMACOS QUE  
INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS  
(TEÓRICO-PRÁCTICO)**

Autor: Javier Pérez Dias

Fecha: 1 de julio de 2019

Tutor: Giorgio Giorgi

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

## INDICE

1	Resumen	3
2	Abstract	3
3	Keywords	4
4	Introducción y antecedentes	4
5	Objetivos	11
6	Metodología	11
7	Resultados y discusiones	12
8	Conclusiones	18
9	Agradecimientos	19
10	Bibliografía	19

### 1 Resumen

*Introducción:* Las enfermedades neurodegenerativas son uno de los principales retos de la medicina del siglo XXI. Aplicar los mismos principios de alta especificidad, individualización y combinatoria de terapias, que tan buenos resultados ha dado en otras áreas de la medicina, puede ser una de las estrategias con las que desarrollar nuevos fármacos para la Enfermedad de Alzheimer. En este trabajo se plantea el desarrollo de un fármaco multi-diana que combine la inhibición de la vía RhoA/ROCK y capacidad de captar radicales libres.

*Objetivos:* Demostrar que la interacción a nivel de proteína-ligando entre ambas moléculas, un control que sabemos dónde y cómo interacciona con la proteína; y una molécula hipótesis, interactúan de forma similar con la proteína diana ROCK. Con este fin, se emplearán programas de modelado molecular o "Docking".

*Resultados y discusión:* No existen diferencias de tipo energético entre ambas interacciones con la proteína ROCK en el sitio de unión de Fasudil, pero las conformaciones de los dos fármacos, en el centro activo, no se comportan de la misma forma.

*Conclusiones:* Las herramientas de modelado molecular son cada vez más útiles y su uso más extendido. Gracias a la gran resolución que permiten tecnologías como la cristalografía y la resonancia magnética, permitiendo predicciones más acertadas de la interacción proteína ligando.

### 2 Abstract

*Introduction:* Neurodegenerative diseases are one of the main challenges of 21st century medicine. Applying the same principles of high specificity, individualization and combinatorial therapy that has given such good results in other areas of medicine, may be a guideline to develop new drugs for Alzheimer's Disease. In this work we propose evidence of a multi-target drug that combines the inhibition of the RhoA / ROCK pathway and the ability to capture free oxygen radicals.

*Objectives:* To demonstrate that the interaction at the protein-ligand level between both molecules, a control that we know where and how it interacts with the protein; and a

hypothetical molecule which is suppose to interact in a similar way with the ROCK target protein. To this end, molecular modeling or "Docking" programs will be used.

*Results and discussion:* There are no differences of energy decrease between both interactions with the ROCK protein in the binding site of Fasudil, but the conformations of the two drugs, in the active center, do not behave in the same way.

*Conclusions:* Molecular modeling tools are increasingly useful and their use more widespread. Thanks to the high resolution allowed by technologies, such as, crystallography and magnetic resonance, more accurate predictions of the protein-ligand interaction are obtained.

### 3 Keywords

Protein Kinasa Inhibitors; Rho kinase; Alzheimer's disease; Humans; Fasudil; Edaravone hybrids; Docking; Molecular dynamics.

### 4 Introducción y antecedentes

Las enfermedades neurodegenerativas (END), representan uno de los mayores desafíos del siglo XXI, siendo su abordaje una urgencia a nivel global, con una prevalencia en aumento y que sobrepasa los 20 millones de pacientes. El propio envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo (4). Al mismo tiempo, el manejo farmacológico de infecciones, enfermedades cardiovasculares y especialmente, de neoplasias, es notablemente superior al de la misma década pasada, teniendo como resultado el aumento de la esperanza de vida. La principal causa de este espectacular progreso médico se basado en tres pilares: *alta especificidad, individualización y combinatoria de terapias* <sup>9</sup>. Aplicar esta estrategia es una de las claves fundamentales para combatir los desordenes neurodegenerativos.

Todas la enfermedades neurodegenerativas comparten mecanismos patogénicos, como: agregación proteica, degeneración axonal temprana, disfunción en el aclaramiento de proteínas, disfunción mitocondrial, desregulación de la respuesta inmune y muerte celular. Además, para ninguna END existe una terapia efectiva con fármacos modificadores de la enfermedad, impidiendo o revirtiendo la progresión de la enfermedad, como último punto en común.

Dentro de las END se engloban a la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica, además de muchas otras. El presente trabajo se centra en posibles desarrollos farmacoterapéuticos para la enfermedad de Alzheimer (EA).

#### Enfermedad de Alzheimer

La EA se describe como una progresiva pérdida de memoria, demencia y disfunción cognitiva y puede ocasionar un estado vegetativo completo, lo que ocasiona alteración socioeconómica grave y muerte temprana (Katzung y Trevor, 2015).

La EA posee una naturaleza multifactorial <sup>5,14,15</sup>, considerandose como mecanismo patogénico inicial, una susceptibilidad mayor a la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial, defectos en el metabolismo energético (fosforilación oxidativa), además de otros defectos en la funcionalidad mitocondrial. La mitocondria tiene un papel muy destacado en la producción de péptido amiloide y especies reactivas de oxígeno, y por

consiguiente, las mitocondrias son las primeras en sufrir la acción tóxica de estas. Otros mecanismos patogénicos: el estrés oxidativo, causado por la edad, los depósitos aberrantes de proteínas ( $\beta$  amiloide y proteína tau) y la disfunción de los sistemas glutamatérgico y colinérgico centrales.

Una de las principales vías de investigación se basó en la hipótesis de la cascada amiloide, la cual tiene más de 28 años<sup>6</sup>. Esta hipótesis plantea que al impedir la producción, agregación y toxicidad de las placas amiloides y ovillos neurofibrilares, consecuentemente, la progresión de la enfermedad se detendría. Para este propósito se han desarrollado anticuerpos y fármacos moleculares que bloquearían la vía amiloidogénica: péptidos  $\beta A_{1-40}$  y  $\beta A_{1-42}$ .

Muchas fármacos fueron diseñadas teniendo como diana péptidos amiloides, tanto facilitando su aclaramiento como impidiendo su producción, pero sin ningún resultado esperanzador hasta la fecha. Esto puede explicarse por una interpretación errónea de los resultados obtenidos *in vitro*. A modo de resumen, los modelos de experimentación empleaban concentraciones de péptido amiloide mucho mayores a las patológicas ( $\mu M$  vs. nM), problemas en la reproducibilidad, interferencia de marcadores moleculares y una pobre descripción de la población y conformaciones de los oligómeros amiloides<sup>6</sup>.

#### Nuevos enfoques en la patogénesis de la EA: nueva diana farmacoterapéutica

Teniendo en cuenta el precedente anterior, nadie puede negar la necesidad de re-estudiar y replantear los mecanismos de la enfermedad de Alzheimer. En los últimos diez años surgió un incipiente interés por relacionar la contribución de la vía Rho/ROCK a la patogénesis de las END. Gracias a estos esfuerzos, existe una gran cantidad de evidencias, procedentes de estudios preclínicos, que sugieren a la Rho cinasa (ROCK), como una prometedora diana farmacológica en el tratamiento de END<sup>15</sup>. La actividad de ROCK afecta a muchos procesos celulares, como la modulación del citoesqueleto, de la síntesis proteica, de las funciones de las células de la glía, la autofagia, la activación microglial y de la función sináptica. Los inhibidores de la ROCK tendrían un efecto modificador de la enfermedad en las END.

La ROCK es una quinaza de tipo serin/treonina, con dos homólogos descritos en mamíferos con similar estructura. Ambas isoformas, ROCK1 y ROCK2, poseen un sitio catalítico en la posición N-terminal; una hélice superenrollada en la región central, como sitio de unión a las proteínas Rho-GTPase de la familia Ras; y un dominio PH que contiene un dedo de zinc, en C-terminal.

En su estado nativo ROCK está inhibida por impedimento estérico de la región carboxil-terminal sobre el sitio activo o estabilizando una conformación no catalítica<sup>14,15</sup>.

#### Nuevos enfoques en la patogénesis de la EA: inhibir la ROCK

El crecimiento neuronal requiere una polimerización y despolimerización dinámica de los filamentos de actina, y la actividad de la ROCK desempeña un papel obligatorio en el colapso del cono de crecimiento, la retracción axonal y la formación de fibras de estrés.

Además del papel esencial que desempeña ROCK en la regulación de la morfología neuronal y el crecimiento de las neuritas, también participa en la mediación de la apoptosis neuronal y la supervivencia. La inducción de la apoptosis, a través de la actividad ROCK, está mediada al aumentar la actividad de la vía PTEN y, en consecuencia, disminuye la actividad de

Akt (Li et al., 2005), la actividad de Fas (Piazzolla, Meissl, Kucerova, Rubiolo y Baccharini, 2005) o la vía p38 / MAPK (Semenova et al. , 2007).

Varios estudios apoyan la idea de que el aumento de la actividad de ROCK provoca la apoptosis neuronal en respuesta a estímulos nocivos y que la inhibición de la actividad de ROCK interfiere con la activación de vías pro-apoptóticas en la corriente descendente, lo que resulta en una acción neuroprotectora.

Junto al sistema de proteasoma de ubiquitina, la autofagia es el sistema de degradación intracelular más importante para las proteínas y orgánulos disfuncionales (Klionsky et al., 2012). Varias publicaciones han demostrado que el tratamiento con inhibidores de ROCK o la regulación a la baja específica de cualquiera de las isoformas ROCK dan como resultado una activación de la autofagia.

Los estudios de etiquetado metabólico revelaron que el dominio de quinasa de ROCK puede fosforilar la APP (Amano, Nakayama y Kaibuchi, 2010; Amano, Tsumura, et al., 2010). Dependiendo del procesamiento de la APP, existen varias formas de escisión de A $\beta$ . La forma A $\beta$ 40 es más frecuente, pero la forma A $\beta$ 42 es más fibrilogénica y está fuertemente asociada con la enfermedad neurológica. Se ha demostrado que las placas de A $\beta$  son, al menos, parcialmente responsables de la desregulación de la polimerización de actina que perjudica a la función sináptica.

Los niveles de proteína ROCK2 aumentaron en homogenados de tejido de corteza frontal humana de pacientes con AD en comparación con el control (Herskowitz et al., 2013). Curiosamente, los niveles de ROCK2 también aumentaron significativamente en homogenados de pacientes con deterioro cognitivo leve en el mismo estudio, lo que sugiere que la expresión ROCK, ya alterada, juega un papel temprano durante el curso de la EA.

Más recientemente, también se demostró que los niveles de proteína ROCK1 estaban elevados en el deterioro cognitivo leve y en la EA en comparación con los controles (Henderson y colaboradores, 2016). Por lo tanto, ambas isoformas ROCK parecen jugar un papel en la patología de la enfermedad en los cerebros de los pacientes con EA.

#### Inhibidores de la ROCK

La caracterización de vías de señalización relacionadas con la activación de la ROCK, ha sentado las bases para entender mejor la patogenia de la EA. Hoy en día, nuevas moléculas orientadas a intervenir o modular la hiperactividad de la ROCK están en desarrollo, como el fármaco KD025, en ensayo clínico fase 2, tipo pivotal. También se puede reorientar el uso de medicamentos ya autorizados, como el caso de fasudil, en un principio, desarrollado como un inhibidor de los canales de calcio, indicado para el vasoespasma cerebral tras una hemorragia subaracnoidea.

Fasudil es una molécula compuesta por un anillo planar de isoquinolina y un anillo de homopiperazina unidos por un grupo sulfonilo <sup>1</sup>. Destacar que es una molécula hidrosoluble, con una semivida corta y con una buena distribución periférica. Tras su administración in vivo, sufre un metabolismo hepático, generándose metabolitos activos como hidroxifasudil .

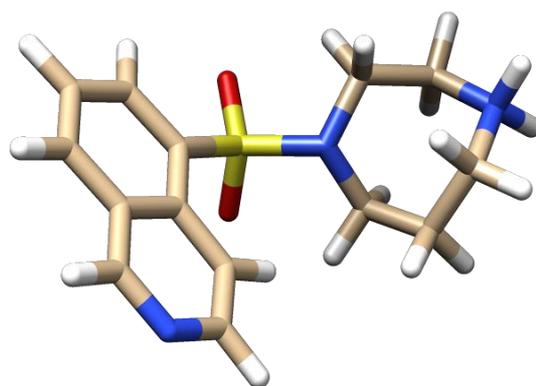


Figura 1. Fasudil.

Fasudil, junto a su derivado ripasudil, es el único medicamento comercializado con capacidad de inhibir competitivamente ambas isoformas de la ROCK y posee un  $K_i$  de  $0,33 \mu\text{M}$ .

Este fármaco está comercializado en Japón, actualmente indicado para el tratamiento del glaucoma.

El anillo de isoquinolina plano de fasudil se inserta en el bolsillo de unión de adenina de la ROCK, mientras que el anillo de homopiperazina de siete miembros se coloca en la entrada de la hendidura, donde se agrupan los residuos activos. Fasudil se une a la ROCK bovina a través de puentes de hidrógeno entre el anillo de isoquinolina al residuo de metionina 172 y entre el ciclo de homopiperazina y el residuo de ácido aspártico 176.

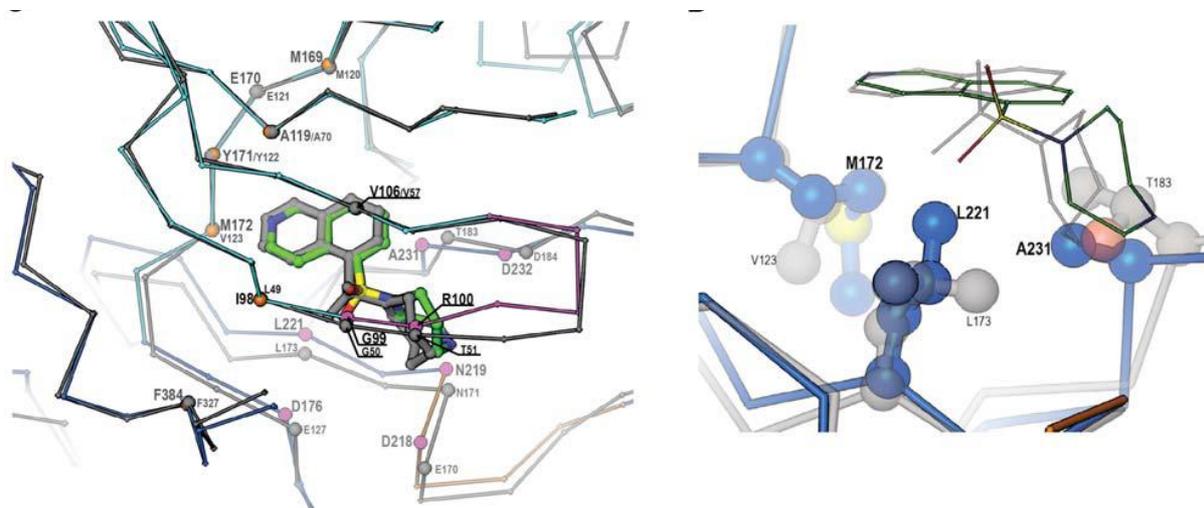


Figura 2. Unión de Fasudil a la Rho-quinasa <sup>10</sup>. El anillo de isoquinolina está situado en una plataforma hidrofóbica (Met172, Leu221 y Ala231) y está cubierto por residuos del lóbulo N-terminal (Ile98, Val106, Ala119 y Met169). El borde del anillo inhibidor hace contacto con los anillos aromáticos de Phe384 y Tyr171 <sup>10</sup>.

#### Inhibidor de la ROCK con actividad antioxidante

Teniendo en cuenta la multiplicidad de vías biológicas involucradas en la patogénesis y la progresión de la EA, el descubrimiento y el desarrollo de agentes multidiana es una estrategia

excepcionalmente desafiante y prometedora. Al contrario que la polimedición, un único medicamento que podría atenuar simultáneamente múltiples vías patógenas, simplificaría las tareas de optimización farmacocinética, reduciendo la toxicidad y evitando probables problemas relacionados con la mediación.

El estrés oxidativo es uno de los factores importantes que afectan negativamente la función neuronal en el cerebro. Se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y su eliminación por diversos mecanismos de los sistemas antioxidantes. Cabe señalar que el cerebro es más vulnerable al estrés oxidativo que cualquier otro tejido. Además, la eficacia del sistema antioxidante del cerebro disminuye progresivamente con el envejecimiento. En particular, esta disminución es más dramática en el cerebro del paciente con EA.

Edaravone, 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona, es un captador de radicales libres de oxígeno con potencial acción neuroprotectora. EDR tiene capacidad para intervenir en múltiples niveles de la patogenia de la EA incluyendo: formación del péptido  $\beta$  amiloide, estrés oxidativo, hiperfosforilación de tau, disfunción sináptica, pérdida neuronal, neuroinflamación y activación glial y mejorando los déficits de comportamiento.

Edaravone atenua la liberación del citocromo c, suprimiendo la activación de caspasa-3 y disminuyendo la relación Bax / Bcl-2. Este evento fue descrito en las células del neuroblastoma N2a, línea celular in vitro empleada para investigar acción neuroprotectora.

Edaravone posee baja biodisponibilidad oral, debido a una baja solubilidad, estabilidad y permeabilidad. Edaravone está indicado en Japón, vía intravenosa, como captador de radicales libres tras un accidente cerebro-vascular. Edaravone se metaboliza en conjugados de sulfato y glucurónido farmacológicamente inactivos. La semivida es corta, muy similar al Fasudil.

Con el objetivo de plantear una alternativa que aune ambos efectos, efecto antioxidante

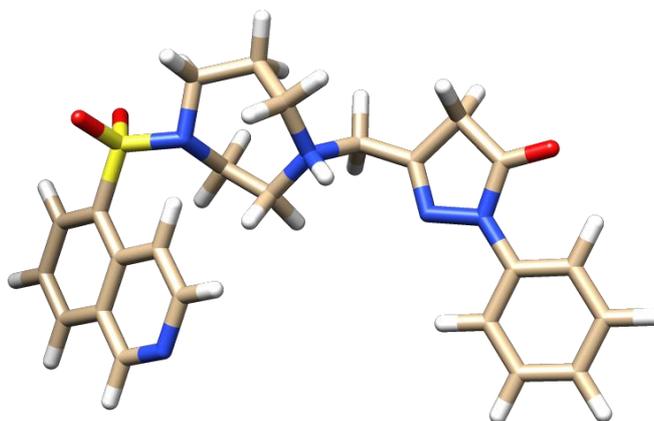


Figura 3. Conjugado de Fasudil y Edaravone.

y inhibición descendente de la vía RhoA/ROCK, se plantea el estudio de esta nueva molécula (Figura3).

Debido a la complejidad de la EA, los medicamentos que modulan la actividad de un solo objetivo podrían no ser suficientes para alterar la progresión de esta enfermedad. Por lo tanto, la estrategia terapéutica más adecuada se basa en ligandos dirigidos a múltiples dianas, para diseñar compuestos con potencial modificador de la EA.

El potencial terapéutico de esta nueva entidad química depende, por una parte de su capacidad para generar tautómeros cetoenólicos, y ha mayor número de posibles tautomerías, mayor capacidad de captar radicales libres. En segundo lugar, de interactuar con la ROCK de manera muy similar a fasudil (Figura 1).

#### Modelado molecular

Un conocimiento muy detallado de la estructura de las proteínas y de los complejos proteína ligando, gracias a los enormes avances en técnicas de purificación de proteínas, cristalografía y espectroscopia resonancia magnética nuclear, permiten que las estrategias computacionales tengan cada vez un mayor protagonismo en el desarrollo de nuevos fármacos.

El desarrollo de nuevos fármacos requiere una inversión muy alta de tiempo y dinero, además, según datos de la FDA el 90 % de nuevas entidades químicas en desarrollo para futuros fármacos fallan debido a problemas de eficacia o seguridad al iniciarse los ensayos en humanos (1).

La causa más habitual suele ser la extrapolación de los resultados de la experimentación animal a la práctica clínica. Hay dos explicaciones a este hecho, el primero, no se pueden estudiar los efectos en animales tras un uso crónico y, en segundo lugar, con el objetivo de visualizar un efecto farmacológico, los animales experimentan una dosis muy superior a las dosis que posteriormente se usará en la práctica clínica, provocando falsos positivos.

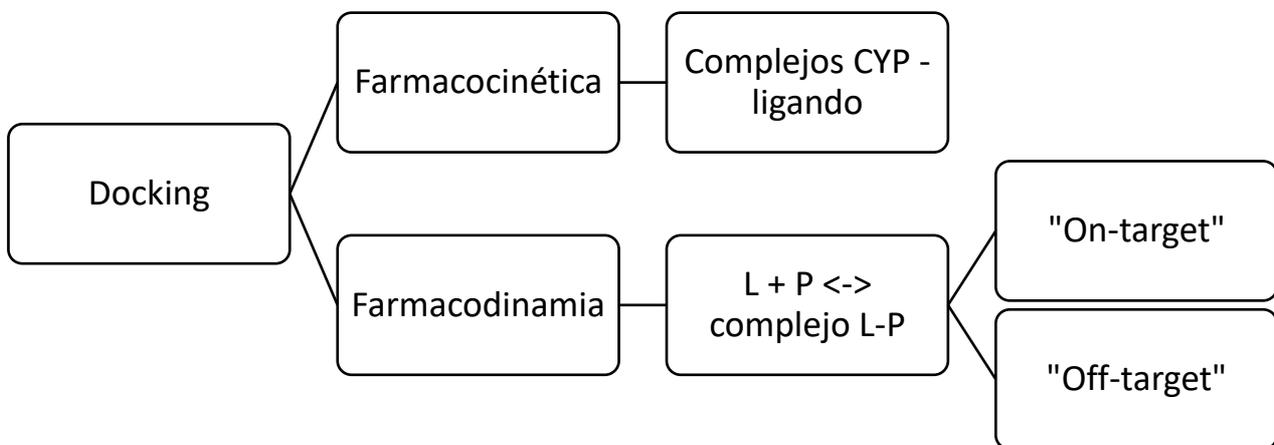


Diagrama 1. Las técnicas de acoplamiento molecular permiten predecir el comportamiento frente a proteína diana u "on-target" (farmacodinamia); su interacción con otras proteínas que medien los procesos de absorción, distribución, metabolismo o eliminación (farmacocinética) o su interacción con otras proteínas con similitudes con la proteína ligando que podrían desencadenar efectos no deseados.

Como respuesta a estos problemas se plantearon posibles soluciones "in silico". Con esta terminología se engloban nuevas técnicas que integran conocimientos de distintos campos: biología molecular, biotecnología, bioinformática, matemáticas y química; para predecir la interacción proteína-ligando, que genere la hipótesis de un posible efecto farmacológico.

El enfoque de acoplamiento molecular o "Docking" se puede usar para predecir la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico, lo que permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión a la proteína en estudio.

Continuando con el objeto de estudio de este trabajo, sería muy interesante comparar la interacción proteína ligando, para fasudil y la de nuestra nueva molécula. Esta aproximación más racional y directa, para descubrir nuevos fármacos, tiene la ventaja de ser mas barata y efectiva que los tradicionales cribados experimentales de alta eficiencia.

En realidad, no es una técnica independiente, normalmente se incorpora en un flujo de trabajo de diferentes técnicas “in silico” y experimentales. Varios grupos de investigación se centran en evaluar el acoplamiento o en realizar mejoras en las funciones de puntuación cuando ya se han realizado pruebas experimentales.

El acoplamiento, combinado con otras técnicas computacionales y datos experimentales, también podría involucrarse en el análisis del metabolismo de los medicamentos para obtener información útil sobre el comportamiento del sistema del citocromo P450 frente al nuevo medicamento (estudios off-target).

El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando, así como su posición y orientación dentro de estos sitios (generalmente denominados “pose”) y la evaluación de la afinidad de unión.

El grado en que se formará el complejo proteína-ligando se determina por la magnitud del incremento de la energía de Gibbs negativo.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

*Ecuación 1. El incremento G es una representación de la estabilidad de cualquier complejo proteína-ligando o, alternativamente, define la afinidad de unión de cualquier ligando a su aceptor (Jenkins, 2008).*

En términos generales, la entalpía es un cambio en la energía que resulta de las formaciones de interacciones como las fuerzas de van der Waals, el enlace iónico y cualquier otra interacción polar o no polar entre la proteína y el ligando, el ligando y la reorganización del solvente y el solvente en la interfaz de unión (Eftink et al., 1983).

La entropía define la distribución uniforme de la energía térmica en el sistema. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, el calor siempre fluye espontáneamente desde el área de temperatura más alta al área de temperatura más baja. Esto reduce el grado de orden del sistema inicial y, por lo tanto, la entropía se puede ver como una medida de arbitrariedad de un sistema.

Los estudios de Docking emplean programas informáticos de acceso libre a investigadores, con una interfaz intuitiva y fácil manejo. Además, cada vez más grupos de investigación emplean estas técnicas y el número de publicaciones relacionados con “docking” a incrementado exponencialmente en la última década. A pesar de ello la mayoría de estos papers son publicados por investigadores químicos, mientras que pocos farmacólogos emplean estas herramientas para sus investigaciones.

Existen numeros programas para predecir las interacciones proteína ligando, pero la mayoría de publicaciones emplean Autodock o Gold. Cada programa de acoplamiento utiliza sus propias funciones de puntuación, destacando la falta de homogeneidad.

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

*Ecuación 2. Cálculo del acoplamiento proteína ligando. El campo de fuerza incluye seis evaluaciones por pares (V) y una estimación de la entropía conformacional perdida tras la unión ( $\Delta S_{conf}$ ). L se refiere al "ligando" y P se refiere a la "proteína".*

AutoDock, programa informático que emplearemos, incorpora un simulado de apareamiento o “annealing” mediante la integración de Monte Carlo y el algoritmo de genético lamarckiano para modelar la flexibilidad del ligando mientras mantiene rígido el receptor.

La función de puntuación se basa en el campo de fuerza AMBER “Assisted Model Building with Energy Refinement”, que incluye fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entropía conformacional y términos de desolvatación.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-r_{ij}^2 / 2\sigma^2}$$

*Ecuación 3. Función de puntuación ampliada basada en el campo de fuerza de AutoDock. Para dos átomos i, j, la energía atómica por pares se evalúa mediante la suma de van der Waals, enlace de hidrógeno, energía de culombio y desolvatación. W son factores ponderados para calibrar la energía libre empírica.*

## 5 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es entender los modelos de acoplamiento receptor-ligando, tanto las bases teóricas como su ejecución en la práctica científica.

Para garantizar la aplicación precisa y efectiva de los modelos de acoplamiento, es necesario comprender las fortalezas, limitaciones, el alcance de la aplicación y la interpretación del método.

Objetivos secundarios

Los métodos de acoplamiento específicos en el campo de la Farmacología, engloban varias técnicas computacionales, ¿qué tan prometedoras son? ¿Cuáles son sus limitaciones? En el futuro, ¿serán claves en el desarrollo de nuevos medicamentos?

## 6 Metodología

Selección y preparación de la proteína

Se emplea la estructura proteica cristalizada de ROCK1 unida a fasudil (PDB ID: 2ESM, X-ray: 3,2 Å), disponible en la base de datos de ProteinDataBank (rcsb.org). Se empleará como sitio activo las coordenadas donde se encuentra Fasudil cristalizado en la molécula, para realizar el acoplamiento molecular y posterior análisis.

La proteína se depuro mediante el software Chimera 1.13. Primero, se eliminaron todos los residuos de naturaleza no proteica, a continuación se añadieron hidrógenos y cargas de Gasteiger.

Selección y preparación de los ligandos

Los ligandos empleados para el docking fueron fasudil (hexahidro-1-(5-isoquinolil-sulfonil)-1H-1,4-diazepina) y un híbrido de fasudil-edaravone. Los ligandos se dibujaron y optimizaron mediante Chemsketch (www.acdlabs.com), y por último, se minimizó la

estructura con Chimera 1.13, añadiendo cargas Gasteiger. Ambos ligandos tienen una carga neta igual a +1, ambas moléculas poseen nitrógenos tipo amina.

Calculo de la energía de acoplamiento molecular

AutoDockTools, mediante un campo de fuerza semi-empírico, cuantifica y evalúa la energía libre resultante de la interacción proteína-ligando, normalmente para 10 conformaciones. AutoGrid, ejecuta un precálculo de las afinidades atómicas, establece las condiciones del acoplamiento molecular, por ejemplo, donde se lleva a cabo la unión proteína-ligando. AutoDock calcula y clasifica cada una de las poses o conformaciones como variación de energía libre mediante algoritmo genético Lamarckiano.

Los resultados se someterán a análisis estadístico, mediante paquete estadístico de Excel. Una prueba T de Student permitirá comparar ambas poblaciones de datos. Se comparará la reducción en la energía libre entre la proteína y cada uno de los ligandos, teniendo como hipótesis nula, igualdad entre ambas simulaciones y como hipótesis alternativa, no igualdad entre ambas simulaciones.

Análisis de la interacción proteína-ligando

Además, se describirán las interacciones de los residuos del centro activo con los ligandos: los enlaces de hidrógeno, Van der Waals... Se buscará que interacciones son las responsables de las similitudes o diferencias para ambos ligandos. Con este fin, se visualizarán las conformaciones o poses energéticamente más favorables. Una vez recopilados los datos anteriores, se compararán estos resultados con la literatura disponible.

## 7 Resultados y discusiones

Para el análisis de acoplamiento molecular se obtuvieron 10 conformaciones o “poses” de ambos ligandos a estudio frente a la proteína ROCK1, obteniendo datos para la energía de unión y energía intermolecular, considerando estos los más relevantes a analizar.

La hipótesis a refutar o confirmar es la siguiente:

$H_0$ : Interacción proteína-ligando sin diferencias significativas.

$H_1$ : Diferencias significativas en la interacción proteína-ligando.

Los datos completos se han recogido en el Anexo 1 de este documento, el cual recoge los valores del acoplamiento molecular de fasudil (ligando1) y de fasudil-edaravone (ligando2) con la ROCK1. Los valores de energía se expresan en Kcal/mol.

Energía de unión

La energía de unión es una medida de la afinidad del complejo ligando-proteína. Desde otro punto de vista, es la diferencia entre la energía del complejo y la suma de las energías de cada molécula por separado. Una variación negativa de la energía de Gibbs se traduciría en un mayor establecimiento del complejo proteína-ligando, esto a su vez significaría estabilizar a la

ROCK1 en su estado nativo inactivo, atenuando la vía descendente y obteniendo el efecto farmacológico: modular la sobreactivación de la vía RhoA/ROCK.

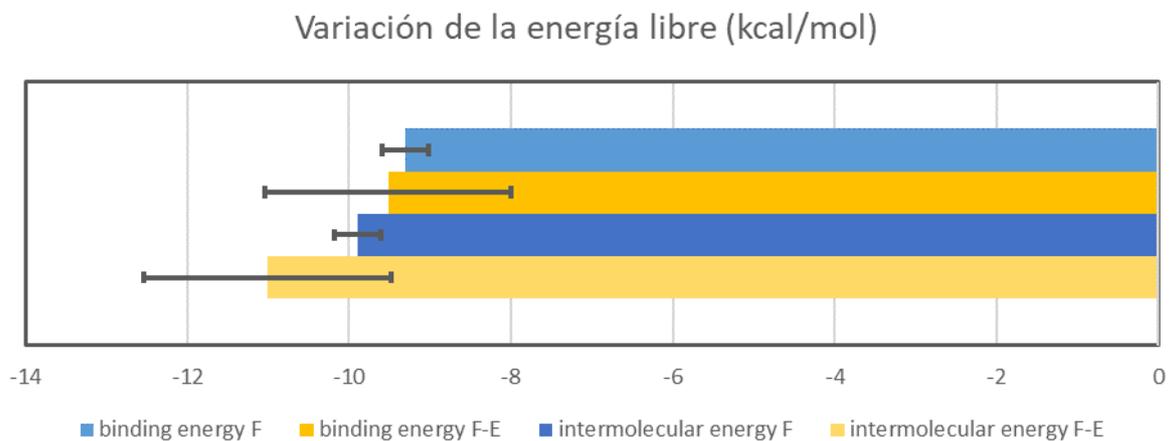
Estadístico  $p = 0,6706$ ; valor de  $p$  mayor a  $0,05$ ; no se encuentran diferencias significativas entre la interacción ROCK-fasudil y la interacción ROCK-fasudil-edaravone en términos de energía libre.

Este resultado nos indica que el aumenta en la estabilidad al formarse el complejo proteína-ligando, es muy similar para ambos ligandos. Es un resultado favorable, pero no concluyente.

#### Energía intermolecular

La energía intermolecular es la energía entre los átomos en diferentes moléculas.

Estadístico  $p = 0,0478$ ; valor de  $p$  menor a  $0,05$ ; existen diferencias significativas entre la interacción ROCK-fasudil y la interacción ROCK-fasudil-edaravone en términos de energía libre. El valor de  $p$  se encuentra muy cerca del límite estadístico, además solo 10 conformaciones para cada caso. No indica similitud ni diferencias.



*Ilustración 1. Media y desviación típicas. No presenta diferencias estadísticas al valorar la energía de unión, pero si existen discrepancias en la energía intermolecular entre los dos ligandos en estudio.*

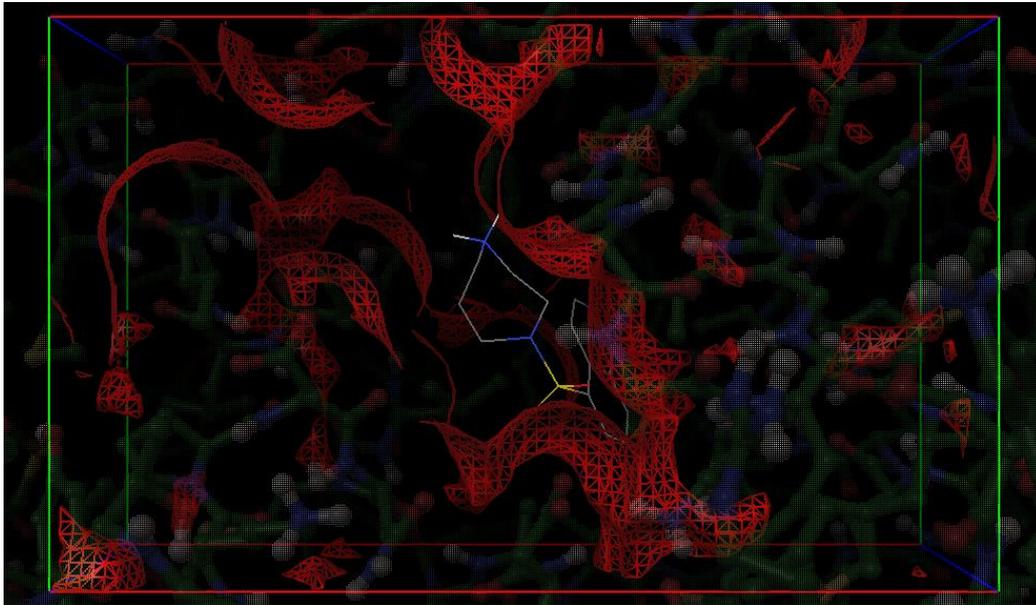
#### Energía de desolvatación

La energía de desolvatación es la pérdida de energía electrostática y/o Van der Waals de la interacción entre el ligando o la proteína y el disolvente al unirse.

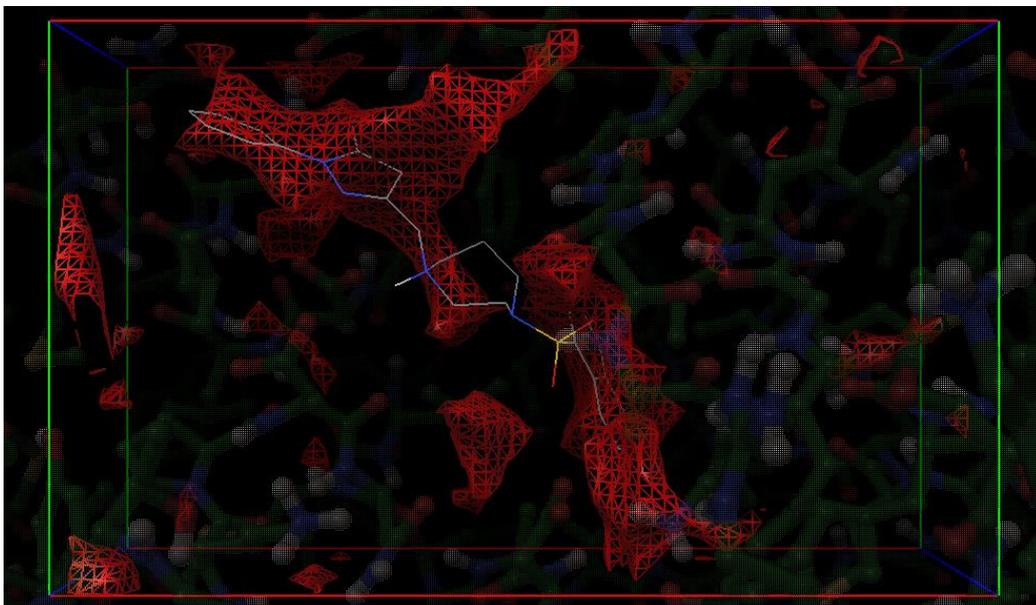
También la energía de desolvatación, indica diferencias ( $p$  inferior a  $0,05$ ) en como interactúan ambos ligandos con la proteína ROCK1. Este resultado indica diferencias en la interacción proteína ligando. El comportamiento de ambos ligandos en el sitio activo no es similar.

A modo de breve conclusión de este apartado, la información que aporta la variación en la energía libre de Gibbs no es concluyente. En términos totales, tanto fasudil como fasudil-edaravone no presentan diferencias, pero al analizar los parámetros de forma pormenorizada, aparecen discrepancias.

Estas diferencias también se aprecian en la desviación de cada uno de los parámetros medidos para el docking. Los valores de energía de unión fasudil-ROCK1 mucho menos dispersa, sin grandes cambios entre la conformación más favorable y la menos favorable.



*Ilustración 2. Gridbox conformación 1 de Fasudil. En rojo se marcan las áreas de interacción fasudil-ROCK1.*



*Ilustración 3. Gridbox conformación 1 de Fasudil-Edarravone. En rojo se marcan las áreas de interacción fasudil-edaravone-ROCK1.*

Análisis de las conformaciones generadas.

Las Ilustraciones 2 y 3 son una simulación de las conformaciones más posibles para cada uno de los ligados, siguiendo un algoritmo genético Lamarckiano. En ambas imágenes se marca en rojo la superficie de la proteína que interacciona con el ligando, la primera imagen

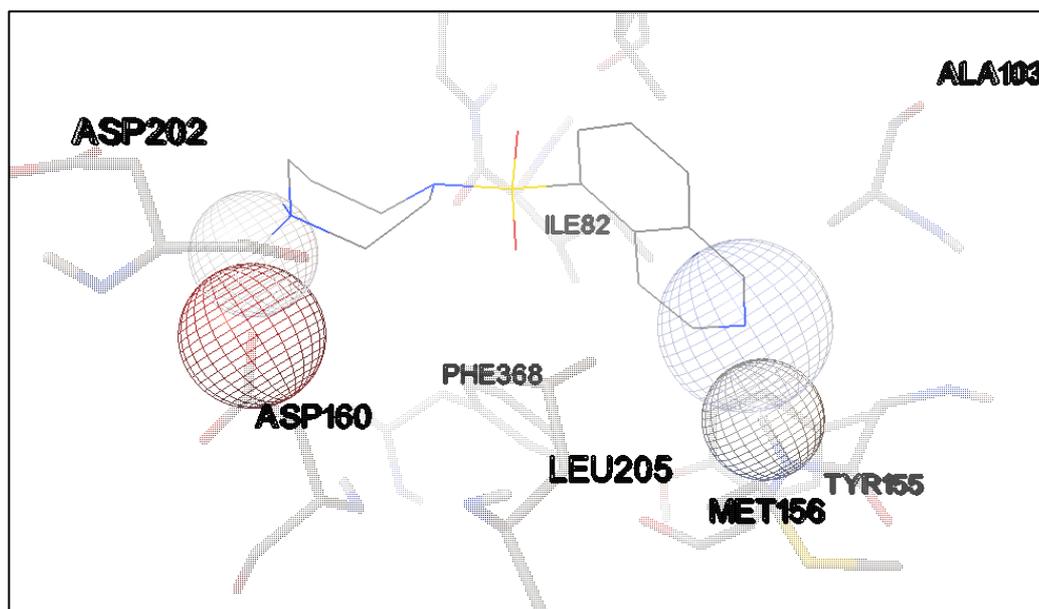
es la conformación de mayor estabilidad de fasudil; y la segunda imagen muestra la configuración de mayor estabilidad de fasudil-edaravone.

La principal diferencia entre ambas conformaciones es la misma disposición del ligando, mientras fasudil adopta una disposición espacial más recogida, fasudil-edaravone se distiende a lo largo de las coordenadas establecidas como sitio activo. Esta puede ser una de las causas, entre muchas otras de que la energía de desolvatación sea mucho mayor en el caso de fasudil-edaravone.

Comparandolo con la literatura publicada hasta la fecha, en líneas generales se mantienen el tipo de interacciones. El anillo de isoquinolina se inserta en un bolsillo hidrofóbico, mientras que el anillo de homopiperazina interactúa con los residuos del sitio activo <sup>1,10</sup>. Al analizar cada una de las interacciones proteína-ligando, todas las conformaciones fasudil-ROCK1 mantenían este patrón, mientras que dos de las diez conformaciones de fasudil-edaravone se salían de este esquema colocando el anillo de isoquinolina fuera de este bolsillo hidrofóbico.

#### Análisis de las interacciones ligando-proteína

Las simulaciones de dinámica molecular exploran la estabilidad y flexibilidad de las conformaciones del sistema proteína-ligando. Permiten reducir el número de falsos positivos, y entre las herramientas más utilizadas se encuentran AMBER y CHARMM. Esto permite analizar que aminoácidos contribuyen más a la estabilidad del complejo proteína-ligando



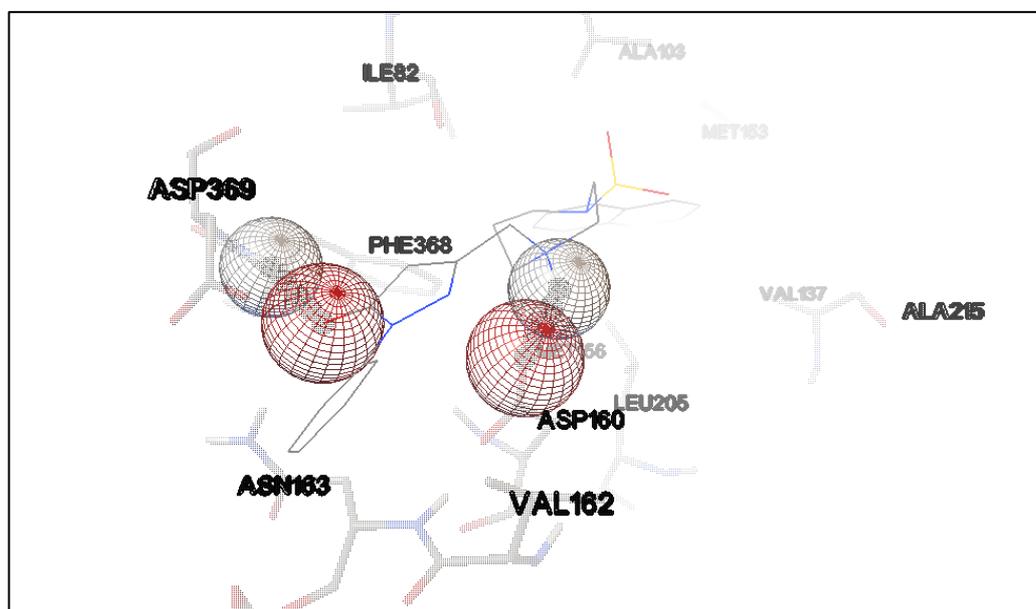
*Ilustración 4. Análisis de las interacciones Fasudil-ROCK1. Los residuos que interactúan mediante enlaces de hidrógeno en la conformación 1, se indican con una esfera azul (aceptor) y roja (donador).*

AutoDockTools permite obtener imágenes de cómo, cada una de las poses generadas, interactúa en el sitio activo. Señala qué enlaces varían, qué nuevos enlaces serían más probables, cuáles son los residuos que más estabilidad aportan a la interacción proteína-ligando... Las ilustraciones 5, 6 y 7 son un ejemplo de ello. En estas imágenes se puede observar que aminoácidos del sitio activo con el ligando.

En este caso, las imágenes muestran los enlaces de hidrógeno más probables, señalándolos con esferas rojas al átomo donador y con esferas azules al átomo aceptor.

La imagen 5 muestra dos enlaces de hidrógeno: el primero, de menor energía, aporta más estabilidad a la unión del anillo de isoquinolina en el bolsillo hidrofóbico, N-H donador del residuo 156 de metionina, al N aceptor del anillo isoquinoleina; el segundo, de mayor energía, entre N<sup>+</sup> - H donador de anillo homopiperazina, al O<sup>-</sup> - C aceptor del residuo 160 de ácido aspartico. Esta interacción pertenece a la conformación 1 entre fasudil y ROCK1. Esta interacción ya es mencionada en la literatura como responsable del aumento en la estabilidad al formarse el complejo fasudil-ROCK1<sup>1,10</sup>. El resto de conformaciones fasudil-ROCK1 presentan 2 enlaces d hidrógeno, mantienen al menos una de estas interacciones.

La imagen 6 muestra dos enlaces de hidrogeno: el primero, entre el anillo de homopiperazina y el residuo ASP 160; el segundo, de menor energía al anterior, entre N - H donador del residuo 369 de acido aspartico, al O = C aceptor del anillo de pirazolin-5-ona. Esta interacción pertenece a la conformación 1 entre fasudil-edaravone y ROCK1.



*Ilustración 6. Análisis de las interacciones Fasudil-Edaravone-ROCK1. Los residuos que interactúan mediante enlaces de hidrógeno en la conformación 1, se indican con una esfera azul (aceptor) y roja (donador)*

La imagen 7 muestra dos enlaces de hidrógeno: el primero, entre el residuo ASP 369 y el anillo de pirazolin-5-ona; y el segundo, entre el residuo MET 156 y anillo de isoquinolina. Esta interacción pertenece a la conformación 2 entre fasudil-edaravone y ROCK1.

En cierta medida, las imágenes 6 y 7, reflejan que la interacción del anillo de isoquinolina en el bolsillo hidrofóbico pierde protagonismo, para ganar mayor relevancia la interacción entre el resto de la molécula y los residuos ácidos responsables de la acción catalítica de la enzima.

Al igual que el resto de resultados con AutoDockTool, la información obtenida del docking son estimaciones y predicciones empleando el algoritmo genético de Lamarckiano, y los

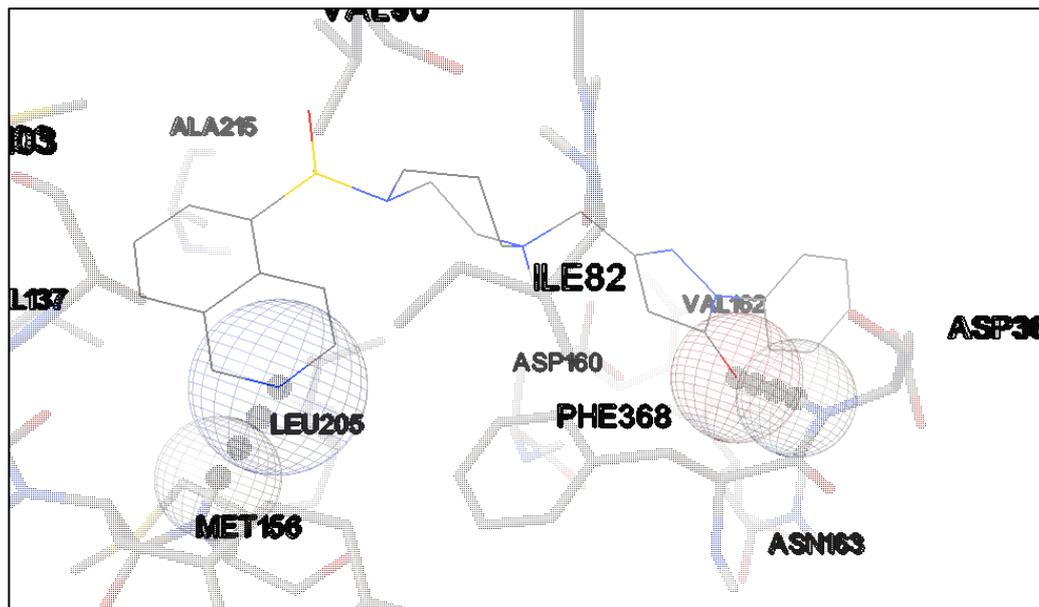


Ilustración 7. Análisis de las interacciones Fasudil-Edaravone-ROCK1. Los residuos que interactúan mediante enlaces de hidrógeno en la conformación 2, se indican con una esfera azul (aceptor) y roja(donador)

resultados deben interpretarse como una aproximación teórica, que requiere confrontar los resultados con más datos bibliográficos.

La inhibición de fasudil y de fasidil-edaravone con ROCK1, es en cierta medida, similar. En términos de disminución de la energía del sistema, los resultados son muy similares, pero al analizar en detalle el docking se aprecian diferencias notables. Ambas moléculas actúan en el mismo sitio activo, estabilizando el estado nativo de la ROCK1.

Los dominios catalíticos de las proteínas ROCK1 y ROCK2 son casi idénticos, por lo que si ROCK1 es inhibido, ambas moléculas mantendrán actividad frente a ROCK2. Se necesitarían estudios docking específicos para validar este supuesto.

#### Actividad antioxidante del híbrido fasudil-edaravone

Una vez verificado que la nueva molécula propuesta retiene la actividad inhibitoria de la ROCK1. El desarrollo de este candidato necesita más evidencias que avalen su potencial como fármaco multitarget para modificar el desarrollo de la EA.

Para confirmar que el híbrido de Edaravona conserva la actividad antioxidante de la edaravona, se propone medir la degradación oxidativa de una molécula fluorescente, como la fluoresceína <sup>18</sup>, después de haber sido mezclada con generadores de radicales libres tales como compuestos azoderivados. En este ensayo se compararía la actividad de edaravona y el híbrido fasudil-edaravona para cuantificar si la capacidad de capturar radicales libres se mantiene o si es incluso superior.

#### Ensayo de permeabilidad de membrana

Ambos compuestos poseen propiedades farmacocinéticas opuestas, mientras fasudil es muy hidrosoluble, edaravona es un compuesto de muy difícil absorción oral y que actualmente se administra vía intravenosa. Esta nueva entidad química tiene un gran potencial, pero se necesita comprobar si la absorción, distribución, metabolismo y eliminación es comparable a la de los compuestos por separado.

## 8 Conclusiones

Este estudio aporta datos sobre la capacidad inhibidora del híbrido fasudil-edaravona. Este hipotético nuevo fármaco podría aunar los efectos inhibidores de la ROCK y los efectos antioxidantes de edaravona. El descenso en la energía del sistema proteína ligando, indica que la proteína tenderá a permanecer más tiempo en su estado nativo inactivo, ejerciendo un efecto inhibidor de la vía RhoA/ROCK. El efecto antioxidante debe comprobarse experimentalmente. También se debería verificar la permeabilidad en membrana del nuevo híbrido, ya que fasudil es una molécula hidrosoluble, mientras que edaravona es lipófila.

Debido a su naturaleza de objetivos múltiples, los inhibidores de ROCK1 y ROCK2 requieren más estudios y ensayos para lograr una tolerancia óptima y evitar efectos secundarios no deseados.

No obstante, una estrategia terapéutica basada en la inhibición de ROCK, a la que se añaden otras funciones como captador de radicales libres, tiene un potencial muy prometedor, ya que una cantidad creciente de evidencias implica a la enfermedad de Alzheimer como una enfermedad con una etiología múltiple.

¿Qué tan prometedoras son las herramientas de modelado molecular? ¿Cuáles son sus limitaciones? En el futuro, ¿serán claves en el desarrollo de nuevos medicamentos?

Los programas de modelado molecular están diseñados para predecir el comportamiento de un compuesto dentro de un ambiente químico concreto idealizado, virtual, por lo que si el desarrollo de fármacos se lleva forzando las limitaciones de estas herramientas, las herramientas de modelado molecular fallarán. Es importante que el software creado se valide y refine continuamente de acuerdo con los nuevos datos y la comprensión de la causa de los casos aparentes de "fallos" <sup>6</sup>. Teniendo en cuenta todo lo anterior, no es sorprendente que la aceptación de estas herramientas predictivas siga siendo difícil, pero la comprensión y estudio de los problemas permite abordar errores de manera adecuada.

Uno de las principales limitaciones, es el uso de modelos de proteínas con una resolución mayor a 3 Å, las cuales solo representan los contornos básicos de la cadena proteica, y la estructura atómica debe inferirse. En este estudio hemos empleado como modelo una proteína humanizada ROCK1 con resolución de 3,2 Å.

Tampoco es adecuado realizar un docking con una molécula distinta de con la que fue cristalizada, ya que esto podría afectar al resultado.

Por último, las puntuaciones de acoplamiento y las afinidades de unión experimentales todavía están mal correlacionadas. Cada algoritmo de acoplamiento usa una función de puntuación en combinación con un método de búsqueda distinto, lo que no permitiría una correcta comparación. No hay posibilidad de comparar resultados entre diferentes programas.

Nuevas utilidades están surgiendo como servidores accesibles a todos los investigadores, que permiten explorar y comprobar, estimaciones de como se comportaría su molécula al metabolizarse, que enzimas serían las más propensas a metabolizarla y como podría interactuar con otras terapias.

Otras aplicaciones, utilizan estos algoritmos de acoplamiento para estudiar de forma el comportamiento de los complejos RNA-proteína o RNP<sup>3</sup>. El RNA juega un papel poco estudiado por su difícil manejo en el laboratorio, muy baja estabilidad, por lo que emplear

estas herramientas para sería muy útil. Este tipo de acoplamientos moleculares, interacciones RNP-DNA son mucho más complejos y requieren de programas mucho más complejos y algoritmos de acoplamiento muy refinados y específicos.

Las perspectivas son muy favorables y cada día la implementación de estas herramientas está más normalizado y extendida.

## 9 Agradecimientos

Al departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. En especial a mi tutor, Giorgio Giorgi, por su paciencia y dedicación.

## 10 Bibliografía

1. Shah S, Savjani J. A review on ROCK-II inhibitors: From molecular modelling to synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. mayo de 2016;26(10):2383-91.

2. Dubey H, Gulati K, Ray A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. *NeuroToxicology*. mayo de 2018;66:58-65.

3. Nithin C, Ghosh P, Bujnicki J. Bioinformatics Tools and Benchmarks for Computational Docking and 3D Structure Prediction of RNA-Protein Complexes. *Genes*. 25 de agosto de 2018;9(9):432.

4. Bachurin SO, Makhaeva GF, Shevtsova EF, Boltneva NP, Kovaleva NV, Lushchekina SV, et al. Conjugates of methylene blue with  $\gamma$ -carboline derivatives as new multifunctional agents for the treatment of neurodegenerative diseases. *Sci Rep [Internet]*. 19 de marzo de 2019 [citado 3 de mayo de 2019];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6424957/>

5. Qiang X, Li Y, Yang X, Luo L, Xu R, Zheng Y, et al. DL-3-n-butylphthalide-Edaravone hybrids as novel dual inhibitors of amyloid- $\beta$  aggregation and monoamine

oxidases with high antioxidant potency for Alzheimer's therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 de febrero de 2017;27(4):718-22.

6. Gupta M, Sharma R, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry*. octubre de 2018;76:210-7.

7. Kumar M, Bansal N. Fasudil hydrochloride ameliorates memory deficits in rat model of streptozotocin-induced Alzheimer's disease: Involvement of PI3-kinase, eNOS and NF $\kappa$ B. *Behavioural Brain Research*. octubre de 2018;351:4-16.

8. Takata M, Tanaka H, Kimura M, Nagahara Y, Tanaka K, Kawasaki K, et al. Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis: Fasudil and amyotrophic lateral sclerosis. *Br J Pharmacol*. septiembre de 2013;170(2):341-51.

9. Ravikumar B, Aittokallio T. Improving the efficacy-safety balance of polypharmacology in multi-target drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. febrero de 2018;13(2):179-92.

10. Yamaguchi H, Kasa M, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. Molecular Mechanism for the Regulation of Rho-Kinase by Dimerization and Its Inhibition by

Fasudil. Structure. marzo de 2006;14(3):589-600.

11. P.m V, A.a S, L.r Y, A.n K, V.v V, V.g K, et al. Neural network modeling of multitarget RAGE inhibitory activity. Biomed khimiya. 2019;65(2):91-8.

12. Saha S, Priyadharshini A, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Chandraleka S, Chandramohan G, et al. Preclinical evaluation and molecular docking of 4-phenyl-1-Naphthyl phenyl acetamide (4P1NPA) from Streptomyces sp. DPTB16 as a potent antifungal compound. Computers in Biology and Medicine. mayo de 2012;42(5):542-7.

13. Poli G, Martinelli A, Tuccinardi T. Reliability analysis and optimization of the consensus docking approach for the development of virtual screening studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2 de noviembre de 2016;31(sup2):167-73.

14. Lai AY, McLaurin J. Rho-associated protein kinases as therapeutic targets for both vascular and parenchymal pathologies in Alzheimer's disease. J Neurochem. marzo de 2018;144(5):659-68.

15. Koch JC, Tatenhorst L, Roser A-E, Saal K-A, Tönges L, Lingor P. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. Pharmacol Ther. 2018;189:1-21.

16. Parikh A, Kathawala K, Li J, Chen C, Shan Z, Cao X, et al. Self-nanomicellizing solid dispersion of edaravone: part II: in vivo assessment of efficacy against behavior deficits and safety in Alzheimer's disease model. DDDT. julio de 2018;Volume 12:2111-28.

17. Nogueira MS, Koch O. The Development of Target-Specific Machine Learning Models as Scoring Functions for Docking-Based Target Prediction. J Chem Inf Model. 25 de marzo de 2019;59(3):1238-52.

18. Fumoto T, Naraoka M, Katagai T, Li Y, Shimamura N, Ohkuma H. The Role of Oxidative Stress in Microvascular Disturbances after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. Transl Stroke Res [Internet]. 9 de enero de 2019 [citado 1 de julio de 2019]; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s12975-018-0685-0>

19. Cosconati S, Forli S, Perryman AL, Harris R, Goodsell DS, Olson AJ. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. Expert Opinion on Drug Discovery. junio de 2010;5(6):597-607.

20. Doig AJ, del Castillo-Frias MP, Berthoumieu O, Tarus B, Nasica-Labouze J, Sterpone F, et al. Why Is Research on Amyloid- $\beta$  Failing to Give New Drugs for Alzheimer's Disease? ACS Chem Neurosci. 19 de julio de 2017;8(7):1435-7.

## ANEXO 1. DATOS DOCKING FASUDIL VS ROCK1; FASUDIL EDARAVONE VS ROCK1

	binding energy	ligand efficiency	inhib constant	nM	intermolecular energy	vdw hb desolv energy
ligand1_1	-9,74	-0,49	72,11	nM	-10,34	-7,66
ligand1_2	-9,65	-0,48	84,41	nM	-10,25	-7,50
ligand1_3	-9,63	-0,48	86,68	nM	-10,23	-7,50
ligand1_4	-9,22	-0,46	173,07	nM	-9,82	-7,28
ligand1_5	-9,21	-0,46	177,13	nM	-9,81	-7,29
ligand1_6	-9,21	-0,46	178,40	nM	-9,80	-7,25
ligand1_7	-9,2	-0,46	181,28	nM	-9,79	-7,24
ligand1_8	-9,19	-0,46	183,11	nM	-9,79	-7,24
ligand1_9	-9,18	-0,46	187,24	nM	-9,77	-7,25
ligand1_10	-8,81	-0,44	349,40	nM	-9,41	-7,94
promedios	-9,304	-0,465	167,283		-9,901	-7,415
desviacion	0,28	0,01	79,36		0,28	0,24
varianza	0,08	0,00	6298,67		0,08	0,06
ligand2_1	-11,09	-0,34	7,48	nM	-12,58	-10,37
ligand2_2	-11,01	-0,33	8,44	nM	-12,51	-11,04
ligand2_3	-10,85	-0,33	11,22	nM	-12,34	-10,68
ligand2_4	-10,43	-0,32	22,75	nM	-11,92	-10,34
ligand2_5	-9,83	-0,30	62,32	nM	-11,32	-9,94
ligand2_6	-9,65	-0,29	83,79	nM	-11,15	-9,76
ligand2_7	-9,41	-0,29	125,96	nM	-10,90	-8,73
ligand2_8	-8,69	-0,26	429,08	nM	-10,18	-8,73
ligand2_9	-7,9	-0,24	1,61	nM	-9,40	-7,79
ligand2_10	-6,33	-0,19	23,05	nM	-7,82	-6,22
promedios	-9,519	-0,289	77,57		-11,012	-9,36
desviación	1,52	0,05	129,96		1,52	1,50
varianza	2,32	0,00	16890,40		2,32	2,24

analisis Tstudent	0,6706	0,0000	0,0823	0,0478	0,0026
-------------------	--------	--------	--------	--------	--------

	electrostatic energy	total internal	torsional energy	Unbound Extended Energy	filename	cIRMS	refRMS	rseed1	rseed2
ligand1_1	-2,68	-0,52	0,60		-0,52 dock01.dlg	0,00	145,11	None	None
ligand1_2	-2,75	-0,57	0,60		-0,57 dock01.dlg	0,88	145,20	None	None
ligand1_3	-2,73	-0,57	0,60		-0,57 dock01.dlg	0,88	145,21	None	None
ligand1_4	-2,54	-0,64	0,60		-0,64 dock01.dlg	1,25	144,91	None	None
ligand1_5	-2,52	-0,67	0,60		-0,67 dock01.dlg	1,24	144,92	None	None
ligand1_6	-2,55	-0,65	0,60		-0,65 dock01.dlg	1,25	144,89	None	None
ligand1_7	-2,55	-0,65	0,60		-0,65 dock01.dlg	1,26	144,89	None	None
ligand1_8	-2,55	-0,67	0,60		-0,67 dock01.dlg	1,24	144,92	None	None
ligand1_9	-2,53	-0,66	0,60		-0,66 dock01.dlg	1,22	144,98	None	None
ligand1_10	-1,46	-0,70	0,60		-0,70 dock01.dlg	0,00	144,36	None	None
promedios	-2,486	-0,63	0,6		-0,63	0,922	144,939		
desviacion	0,37	0,06	0,00		0,06	0,51	0,24		
varianza	0,14	0,00	0,00						
ligand2_1	-2,20	0,03	1,49		0,03 dock02.dlg	0,00	146,82	None	None
ligand2_2	-1,46	-0,92	1,49		-0,92 dock02.dlg	1,41	146,25	None	None
ligand2_3	-1,65	-0,90	1,49		-0,90 dock02.dlg	1,33	146,41	None	None
ligand2_4	1,58	-1,09	1,49		-1,09 dock02.dlg	0,91	146,92	None	None
ligand2_5	-1,38	-1,63	1,49		-1,63 dock02.dlg	0,00	145,54	None	None
ligand2_6	-1,38	-1,74	1,49		-1,74 dock02.dlg	0,18	145,50	None	None
ligand2_7	-2,18	-1,44	1,49		-1,44 dock02.dlg	0,00	145,42	None	None
ligand2_8	-1,44	-0,68	1,49		-0,68 dock02.dlg	1,78	146,22	None	None
ligand2_9	-1,61	-1,84	1,49		-1,84 dock02.dlg	0,00	146,45	None	None
ligand2_10	-1,59	-0,85	1,49		-0,85 dock02.dlg	1,29	146,50	None	None
promedios	-1,331	-1,106	1,49		-1,106	0,69	146,203		
desviación	1,07	0,57	0,00		0,57	0,72	0,54		
varianza	1,14	0,33	0,00						

analisis Tstudent	0,0078	0,0274	0,0000
-------------------	--------	--------	--------

Tabla 1. Datos de los resultados del acoplamiento molecular obtenidos con AutoDockTool 1.5.6.