Universidad Andrés Bello

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

DISEÑO Y RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVOS AGONISTAS AFINES AL CANAL TRPC6 CON POTENCIAL TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

Unidad de Investigación para optar al Título de Químico Farmacéutico

Nicolás Ignacio Silva Silva

Director:

Jaime Mella Raipán

Viña del Mar, Chile

Junio 2023

Universidad Andrés Bello

Facultad de Medicina

Escuela de Química y Farmacia

DISEÑO Y RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE NUEVOS AGONISTAS AFINES AL CANAL TRPC6 CON POTENCIAL TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

Nicolás Ignacio Silva Silva

COMISIÓN CORRECTORA:

Profesor Corrector: Dr. Pablo Aránguiz Urroz

Profesor Corrector: Dr. Yeray Rodríguez Núñez

Viña del Mar, Chile

Junio 2023

COMISIÓN CORRECTORA

Dr. Pablo Aránguiz Urroz

Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

Diplomado en Investigación Clínica y Monitoreo de Ensayos Clínicos, Universidad de Chile.

Doctor en Farmacología, Universidad de Chile.

Profesor de Fisiopatología y Semiología, Farmacología Humana I y Farmacología Humana II, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello.

Dr. Yeray Rodríguez Núñez

Químico, Universidad del Atlántico, Colombia.

Máster en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Doctor en Ciencias, mención Investigación y Desarrollo de productos bioactivos, Universidad de Talca.

Profesor asistente Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas.

Dr. Jaime Mella Raipán

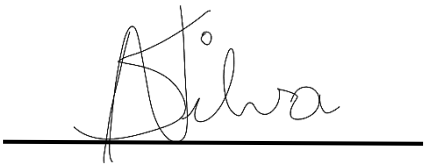
Químico Farmacéutico, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Doctor en Química, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Profesor de Farmacoquímica I y II, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Respecto al trabajo de titulación presentado para su defensa y evaluación, se declara la originalidad del mismo, entendiéndose de que no se han utilizado fuentes sin citarlas debidamente.



Nicolás Ignacio Silva Silva

Autor



Jaime Alberto Mella Raipán

Director

Viña del Mar, 2023

DEDICATORIA

A mis padres Gloria y Alex, quienes con su cariño, sabiduría y sacrificio me posibilitaron cumplir un sueño más, a mis hermanos Alex y Diego, que siempre estuvieron para animarme en los malos momentos, y a mi novia Ignacia, quién me acompañó y motivó día a día en todo este proceso. Gracias por hacerme una mejor persona y por creer siempre en mí.

AGRADECIMIENTOS

Durante mi estancia en la universidad estuvieron presentes grandes personas que, desde su vereda, contribuyeron a mi formación personal y profesional. Por esto deseo expresar mi más profunda y sincera gratitud a aquellos actores cuyo apoyo fue fundamental para culminar este importante capítulo de mi vida.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi familia y a mi pareja por su inquebrantable apoyo y amor incondicional. Desde el principio de mi trayectoria universitaria, siempre estuvieron ahí para motivarme, alentarme y brindarme su respaldo en cada paso que daba. Sus palabras de aliento y sus sacrificios incansables han sido el pilar que me ha impulsado a alcanzar mis metas.

A mi maestro y mentor, Dr. QF. Jaime Mella, por confiar en mí desde el principio, quien a través de su gran entusiasmo, pasión y dedicación fue una fuente inagotable de inspiración, y mediante su experiencia y sabiduría logró entregarme los conocimientos necesarios para realizar esta investigación. Agradezco su disponibilidad y orientación constante, ya que sus comentarios y sugerencias fueron esenciales para el éxito de mi investigación.

Además, quiero agradecer a todos mis profesores y profesoras, cuyas enseñanzas y pasión por sus respectivas disciplinas han dejado una huella indeleble en mi formación. Sus valores, compromiso y amor por la educación sin duda facilitaron mi proceso de aprendizaje, permitiéndome crecer a nivel intelectual, pero más importante, a nivel personal. Un agradecimiento especial para el profesor Dr. QF. Pablo Aránguiz, quien con su calidez logró transmitirme sus conocimientos y motivarme en la persecución de mis objetivos.

A todas las instituciones que, desde diferente perspectiva, han contribuido a enriquecer mi formación. A la Universidad Andrés Bello por brindarme la oportunidad de acceder a una educación de calidad, dándome los recursos necesarios para desarrollarme académicamente. A la Universidad de Valparaíso y al equipo de trabajo del laboratorio de química medicinal, por facilitarme sus dependencias y entregarme las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación.

Por último, pero no menos importante, agradecer a mis amigos y compañeros en este viaje, Belén, Romina, Javiera, Danitza, Javier y Aldebarán, por su constante retroalimentación positiva que me potenció a ser una mejor versión de mí y por brindarme su apoyo cuando más lo necesité.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN 2

1.1 Antecedentes generales 2

1.2 Causas de TEA 2

1.3 Problema de investigación 4

1.4 Hipótesis 4

2. OBJETIVOS 6

2.1 Objetivo general 6

2.2 Objetivos específicos 6

3. MARCO TEÓRICO 8

3.1 Bioquímica del canal TRPC6 8

3.2 Canal TRPC6 y su relación con TEA 8

3.3 Características estructurales del canal TRPC6 9

3.4 Agonistas conocidos del canal TRPC6 12

4. METODOLOGÍA 15

4.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*) 15

4.2 Estudios de Dinámica Molecular 17

4.3 Cálculos de energía MMGBSA 19

4.4 Análisis Retrosintético: 19

4.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas: 19

4.6 Predicción de Toxicidad: 19

5. RESULTADOS 21

5.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*) 21

5.1.1 *Screening* inicial 21

5.1.2 Estrategia de diseño de nuevos derivados potenciados 22

5.1.3 *Docking* de nuevos derivados y agonista de referencia 23

5.2 Estudios de Dinámica Molecular 25

5.2.1 Conformación del complejo BT11-hTRPC6 25

5.2.2 RMSD Proteína-Ligando 27

5.2.3 Contactos Proteína-Ligando 28

5.2.4 Contactos Ligando-Proteína 30

5.2.5 Gráficos SASA del Ligando 31

5.2.6 Perfil de torsión del derivado BT11 32

5.2.7 Cambios en el diámetro del poro a través del tiempo de simulación 33

5.3 Cálculos de energía MMGBSA 34

5.4 Análisis Retrosintético 35

5.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas 38

5.6 Predicción de Toxicidad 40

6. DISCUSIÓN 42

6.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*) 42

6.2 Estudios de Dinámica Molecular 44

6.3 Cálculos de energía MMGBSA 54

6.4 Análisis Retrosintético 55

6.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas 57

6.6 Predicción de Toxicidad 59

7. CONCLUSIONES 62

8. LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO 65

9. FUTURAS DIRECCIONES 67

10. ABREVIATURAS 70

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

12. ANEXOS 84

Anexo 1: Valores XP GScore de los estudios de *docking* del *screening* inicial. 84

Anexo 2: Valores XP GScore de los estudios de *docking* de agonistas de referencia y nuevos derivados…… 85

Anexo 3: Datos del diámetro del poro de cada sistema, obtenidos por los estudios de dinámica molecular..... 87

Anexo 4: Contactos Proteína-Ligando del agonista GSK1702934A reportados por Yang et al. [56]……. 93

Anexo 5: Farmacóforo general para el bloqueo del canal hERG [107]. 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cascada de señalización del canal TRPC6 activado por hiperforina……9

Figura 2. Representación gráfica del canal TRPC6……11

Figura 3. Canal TRPC6 con sus respectivos sitios de unión a lípidos y antagonistas……11

Figura 4. Canal TRPC6 con sus respectivos sitios de unión a agonistas……12

Figura 5. Mapa superficial de la cavidad en complejo con el agonista AM-0883……...13

Figura 6. Estructuras químicas de los agonistas conocidos para el canal TRPC6, con su respectivo EC50 medido directamente en el canal……13

Figura 7. Núcleos estructurales de las 5 generaciones de moléculas probadas en el *screening* inicial……..17

Figura 8. Aminoácidos encargados del filtro de selectividad y de la compuerta intracelular del poro…….18

Figura 9. *Docking* entre el compuesto de partida (4-13) y el sitio activo para agonistas del canal hTRPC6……..21

Figura 10. Estrategia de diseño de nuevos derivados a partir del compuesto 4-13……...22

Figura 11. Estructura y numeración del compuesto *hit* BT11…….....22

Figura 12. *Docking* de los ligandos en el sitio de unión a agonistas del canal hTRPC6, formado entre la hélice del poro de la cadena A y el segmento S6 de la cadena B……..23

Figura 13. Conformación del complejo BT11-hTRPC6 al inicio y final de la dinámica molecular……...….25

Figura 14. Gráficos de RMSD respecto al *frame* inicial durante el tiempo de simulación del agonista GSK y de los derivados BT11, T18, INV29 y SOH95……...27

Figura 15. Fracción de interacciones por residuo del agonista GSK y de los derivados BT11, T18, INV29 y SOH95……..28

Figura 16. Gráficos de los contactos totales entre ligando y proteína para el agonista GSK y los derivados BT11, T18, INV29 y SOH95……..29

Figura 17. Tiempos de permanencia de las interacciones más relevantes para GSK, BT11, T18, INV29 y SOH95……..30

Figura 18. Gráfico SASA a lo largo de la simulación del agonista GSK y de los derivados BT11, T18, INV29 y SOH95…….31

Figura 19. Perfil de torsión durante la simulación del ligando BT11……..32

Figura 20. Gráficos del diámetro promedio del poro a través del tiempo de simulación para el sistema sin ligando, con el agonista GSK y con los derivados BT11, T18, INV29 y SOH95……...33

Figura 21. Esquema retrosintético para obtener el compuesto BT11……..35

Figura 22. Hidroxilación del compuesto de partida ácido 4-bromobenzoico…….....35

Figura 23. Protección de los grupos hidroxilo y ácido carboxílico y formación de anilina…….36

Figura 24. Acoplamiento de los 3 equivalentes sintéticos para obtener el derivado BT11……..36

Figura 25. Ruta sintética para obtener el compuesto *hit* BT11 (ácido 3-(2-naftamido)-4-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-5-hidroxibenzoico) a partir del compuesto de partida ácido 4-bromobenzoico……...37

Figura 26. Modelo ‘’Huevo-Duro’’ de absorción intestinal y permeabilidad de BHE para los 9 compuestos…….39

Figura 27. Gráfico de radar para la biodisponibilidad de BT11……..40

Figura 28. Relación Estructura-Actividad (REA) de agonistas del canal hTRPC6 derivado de los estudios de *docking* y dinámica molecular……..52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estructuras publicadas del canal hTRPC6 a junio de 2023…….....10

Tabla 2: Resultados de los cálculos de energía MMGBSA para los sistemas con cada uno de los ligando…….....34

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas-farmacocinéticas y reglas de Lipinski del *hit* BT11 y otros derivados planteados como potenciales compuestos optimizados. 38

Tabla 4: Resultados de la predicción de toxicidad de BT11.....40

RESUMEN

Los trastornos del espectro autista (TEA) son trastornos del neurodesarrollo que afectan al 1% de la población mundial. Una potencial diana farmacológica es el canal de calcio TRPC6, cuya expresión se ha visto reducida en pacientes con TEA. Estudios recientes en modelos de moscas demostraron que agonistas de TRPC6 pueden revertir los comportamientos autistas. Actualmente el TEA no tiene cura, y su tratamiento sintomático tiene una baja eficacia y alta incidencia de reacciones adversas a medicamentos. El objetivo de esta investigación ha sido diseñar una serie de moléculas afines al sitio agonista del canal TRPC6, que sean factibles de sintetizar y posean una predicción farmacocinética y de toxicidad favorables, para finalmente establecer una relación estructura-actividad para el diseño de nuevos agonistas. Se realizó un diseño *de novo*, ejecutando estudios de *docking* para identificar las interacciones ligando-proteína, dinámica molecular para evaluar su estabilidad y efecto agonista sobre la expansión del poro, cálculos MMGBSA para estimar la afinidad del ligando, un análisis retrosintético de Corey para trazar una ruta de síntesis para el compuesto *hit*, y el uso de plataformas web para predecir las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y de toxicidad. Según los resultados, el compuesto *hit* BT11, un derivado de ácido benzoico, estableció 7 interacciones en los estudios de *docking*, con una gran estabilidad en el tiempo, logrando una expansión del poro significativa ($p < 0,0001$) y lineal ($R^2 = 0,8332$) a lo largo de toda la simulación y con la mayor afinidad estimada (-68,28 kcal/mol). Modificaciones en su estructura afectaron la estabilidad del complejo, disminuyendo su efecto agonista. BT11 es además factible de sintetizar mediante un acoplamiento organometálico. Posee propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas dentro de los rangos deseables, pero que necesitan ser optimizadas. Posee un bajo riesgo de inhibir al canal hERG debido a su grupo ácido, y aunque existe el riesgo de ser mutágeno, este puede reducirse o eliminarse. En conclusión, BT11 formó un complejo estable con el sitio activo, ejerciendo un efecto agonista al expandir el poro. El farmacóforo esencial para la actividad consiste en un ácido benzoico, un sistema aromático de 2 anillos conectado directamente y un anillo aromático unido por un conector carbonílico. Su síntesis permitiría su aplicación en futuros estudios. Es posible optimizar su farmacocinética sin eliminar la actividad. Además, el grupo ácido ejerce un efecto protector ante la inhibición del canal hERG. Estos hallazgos sustentan la realización de nuevos estudios en la búsqueda de un tratamiento efectivo y seguro para TEA.

Palabras claves: TEA, autismo, TRPC6, agonista, ácido benzoico, REA, estudios de *docking*, dinámica molecular, MMGBSA.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders that affect 1% of the global population. One potential pharmacological target is the TRPC6 calcium channel, whose expression has been found to be reduced in patients with ASD. Recent studies in fly models have demonstrated that TRPC6 agonists can reverse autistic behaviors. Currently, there is no cure for ASD, and symptomatic treatment has low efficacy and a high incidence of adverse drug reactions. The objective of this research was to design a series of molecules targeting the agonist site of the TRPC6 channel, which are feasible to synthesize and possess favorable pharmacokinetic and toxicity predictions, in order to establish a structure-activity relationship for the design of new agonists. A *de novo* design was conducted, performing docking studies to identify ligand-protein interactions, molecular dynamics to evaluate stability and agonistic effect on pore expansion, MMGBSA calculations to estimate ligand affinity, a Corey retrosynthetic analysis to outline a synthesis route for the hit compound, and the use of web platforms to predict physicochemical, pharmacokinetic, and toxicity properties. According to the results, the hit compound BT11, a derivative of benzoic acid, established 7 interactions in docking studies, exhibiting excellent stability over time, significant ($p < 0.0001$) and linear ($R^2 = 0.8332$) pore expansion throughout the simulation, and the highest estimated affinity (-68.28 kcal/mol). Structural modifications affected the complex stability, reducing its agonistic effect. BT11 can be feasibly synthesized through an organometallic coupling. It possesses physicochemical and pharmacokinetic properties within desirable ranges, but they need to be optimized. It has a low risk of inhibiting the hERG channel due to its acid group, and although there is a risk of mutagenicity, it can be reduced or eliminated. In conclusion, BT11 formed a stable complex with the active site, exerting an agonistic effect by expanding the pore. The essential pharmacophore for activity consists of a benzoic acid, a directly connected 2-ring aromatic system, and an aromatic ring connected by a carbonyl linker. Its synthesis would enable its application in future studies. Pharmacokinetics can be optimized without eliminating activity. Furthermore, the acid group exerts a protective effect against hERG channel inhibition. These findings support further studies in the search for an effective and safe treatment for ASD.

Keywords: ASD; autism; TRPC6; agonist; benzoic acid; SAR; docking studies; molecular dynamics; MMGBSA.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

Los Trastornos del Espectro Autista (TEA) son trastornos del neurodesarrollo caracterizados por generar déficits persistentes en la comunicación e interacción social en múltiples contextos, intereses restringidos y presencia de patrones repetitivos y estereotipados de comportamiento [1]. A menudo, pueden venir acompañados por condiciones secundarias tales como trastorno de déficit atencional con hiperactividad (TDAH), trastorno oposicionista desafiante (TOD), conductas autolesivas, tendencias suicidas, agresividad e incluso epilepsia, así como también pueden relacionarse a otros trastornos psiquiátricos como ansiedad generalizada y depresión mayor [2–4]. Se estima que la prevalencia de TEA es del 1% de la población mundial [5], lo que también se ve reflejado en los niños [6], afectando mayormente al sexo masculino, en una razón masculino:femenino de 4:1 [7].

En Chile, según la Guía de Práctica Clínica: ‘’Detección y Diagnóstico Oportuno de los Trastornos del Espectro Autista (TEA)’’, elaborada por el MINSAL el año 2011, no existe un registro del diagnóstico de TEA [8], por lo que es necesario hacer estimaciones. Una de ellas, realizada por el doctor Mauricio Gómez Chamorro del Departamento de Salud Mental, DIPRECE, de la Subsecretaría de Salud Pública (MINSAL), y mencionada en una exposición realizada el 9 de agosto del 2017, señala que, basándose en datos del *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos, en Chile habría 50.500 niños (menores de 18 años) con TEA [9]. Otra estimación general podría hacerse considerando que se mantiene la prevalencia mundial del 1% [5], y apoyándose en el último censo realizado el año 2017 (17.574.003 habitantes) [10], habría un total de 175.740 personas viviendo con este trastorno. De hecho, debido al gran impacto del TEA en la sociedad chilena, el 10 de marzo del presente año fue publicada la ley 21545, que ‘’establece la promoción de la inclusión, la atención integral, y la protección de los derechos de las personas con trastorno del espectro autista en el ámbito social, de salud y educación’’, o también llamada ‘’ley TEA” [11].

1.2 Causas de TEA

A lo largo de los años, se han propuesto diversas causas y factores de riesgo que contribuirían a la aparición de estos trastornos, considerados en 3 ejes principales que son los factores ambientales,

genéticos y la interacción genética-ambiental. Entre los factores ambientales están las deficiencias nutricionales maternas, exposición a sustancias tóxicas como contaminación ambiental, humo del tabaco, alcohol o drogas recreacionales [12], uso crónico de antidepresivos [13] e infecciones maternas [14] durante el embarazo, que pueden causar alteraciones en procesos del neurodesarrollo como la diferenciación celular, la sinaptogénesis y la mielinización del axón [12]. Además, el TEA tiene un gran componente genético, con una heredabilidad estimada de más del 80% según estudios realizados en gemelos [15], debido a la mutación o variación del número de copias de múltiples genes que codifican proteínas fundamentales para el neurodesarrollo, tales como FMR1 o TSC1/2, causantes de los 2 síndromes genéticos principales asociados a TEA, síndrome X frágil (SXF) y esclerosis tuberosa (ET), respectivamente; genes implicados en la sinapsis neuronal como neuroliginas (NLGN3, 4 y 4Y); la familia SHANK (SHANK1, 2 y 3) y neurexinas (NRXN1 y 3); relacionados a la arquitectura de la cromatina como MECP2, a la homeostasis del calcio como CACNA1C, CACNA1F, KCNMA1 y SCN2A, a los neurotransmisores e incluso mutaciones en el ADN mitocondrial [16,17], entre muchos otros, ya que, a la fecha, se estima que hay más de 100 genes de riesgo que contribuirían al desarrollo de TEA [18]. Por último, debido a factores relacionados a la interacción de los genes con el ambiente, que mediante modificaciones epigenéticas como metilación, acetilación o fosforilación del ADN regulan la expresión génica y permiten un correcto desarrollo de la red neuronal, las cuales se han visto alteradas en individuos con TEA [17,19,20].

En los últimos años, gracias a la continua investigación para comprender mejor la fisiopatología de este trastorno, han aparecido nuevos genes y proteínas de riesgo que debido a mutaciones pueden favorecer la aparición de TEA, siendo alternativas novedosas como posibles dianas farmacológicas. Dentro de estos, podemos mencionar aquellos que codifican para proteínas como el Receptor Proteico Tirosina Fosfatasa tipo D (PTPRD por sus siglas en inglés), posiblemente involucrado en la regulación del crecimiento axonal y de neuritas [21]; variantes en el gen del transportador SLC6A4 de serotonina (5-HT), causantes de comportamientos autistas debido a una hiperserotoninemia [22], que pueden ser rescatados por el uso de antagonistas 5-HT_{2A} y 5-HT_6 en modelos animales [23–25]; una hiperactivación del receptor metabotrópico glutamatérgico mGluR5 debido a una falta de regulación por una FMRP mutada, proteína causante del SXF y comportamientos autistas [16,17], los que se han visto atenuados por el uso de inhibidores alostéricos [26,27]; o el gen del canal catiónico de potencial receptor transitorio de la subfamilia

C, miembro 6 (TRPC6, por sus siglas en inglés), ya que mutaciones en su localización en el cromosoma 11q22 que llevan a su disrupción, generan una disminución de la fosforilación del factor de transcripción nuclear CREB debido a una disminución de la función del canal, teniendo efectos perjudiciales en el neurodesarrollo, lo que se ha visto significativamente relacionado a pacientes con TEA [28], y del cual recientemente se conoció su estructura tridimensional completa [29], siendo una nueva esperanza para la búsqueda de posibles alternativas de tratamiento para esta condición.

1.3 Problema de investigación

Debido a la fisiopatología compleja y multifactorial de TEA no se ha podido desarrollar un medicamento que restaure el comportamiento normal de estos individuos, por lo que la farmacoterapia ha quedado relegada al tratamiento de los síntomas que pueden acompañar esta condición, como, por ejemplo, la hiperactividad motora y déficit atencional que se ha tratado con metilfenidato, el uso de antidepresivos para reducir los comportamientos repetitivos y estereotipados, antipsicóticos para tratar comportamientos agresivos y autolesivos y cicloserina para mejorar la interacción social [30]. Sin embargo, el uso de estos medicamentos en pacientes con TEA ha demostrado tener una baja eficacia en comparación a otras condiciones neurológicas para las cuales están indicados, a la vez que tienen una alta incidencia de reacciones adversas a medicamentos (RAM) [30].

En base al problema de investigación nos hacemos las siguientes preguntas: ¿Es viable diseñar nuevas moléculas heterocíclicas con afinidad significativa para el sitio de unión a agonistas del canal TRPC6, que sean factibles de sintetizar y posean un perfil farmacocinético y de toxicidad predicho que sea apto para su uso en seres humanos? ¿Es posible proponer una relación estructura-actividad para el desarrollo de nuevos agonistas para el canal TRPC6?

1.4 Hipótesis

Basándonos en los antecedentes expuestos anteriormente, hipotetizamos que es posible diseñar nuevas moléculas heterocíclicas con afinidad significativa para el sitio de unión a agonistas del canal TRPC6, que sean factibles de sintetizar y posean un perfil farmacocinético y de toxicidad predicho apto para su uso en seres humanos, además de proponer una relación estructura-actividad para el desarrollo de nuevos agonistas para este canal.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Diseñar una nueva serie de moléculas con potencial afinidad para el canal TRPC6, dado por un buen puntaje y perfil de interacciones entre ligando y sitio activo de unión a agonistas según estudios de *docking* y dinámica molecular, que sean factibles de sintetizar y además posean una predicción farmacocinética y de toxicidad apta para su uso en seres humanos, para finalmente establecer una relación estructura-actividad que ayude al desarrollo de nuevos agonistas.

2.2 Objetivos específicos

1) Analizar la estructura tridimensional del canal TRPC6, su sitio de unión a agonistas y los residuos aminoacídicos que lo conforman.
2) Diseñar una nueva serie de moléculas heterocíclicas basado en el análisis estructural de agonistas de referencia.
3) Ejecutar estudios de *docking* para el screening inicial de un set de moléculas y para el ciclo de prueba y rediseño molecular, con el fin de obtener un puntaje de interacciones que será usado como criterio de selección de los mejores candidatos.
4) Ejecutar estudios de dinámica molecular a los mejores candidatos y otros derivados modificados para obtener parámetros de su comportamiento en el sitio activo a lo largo del tiempo de simulación.
5) Plantear una ruta sintética para el mejor compuesto obtenido.
6) Predecir el perfil farmacocinético y de toxicidad del mejor compuesto obtenido y otros derivados modificados.
7) Proponer una relación estructura-actividad para agonistas del canal TRPC6 basado en los resultados de los estudios realizados.

MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Bioquímica del canal TRPC6

El gen TRPC6 codifica para un canal catiónico permeable a Ca^{2+} y en menor medida a Na^{+} [31]. Este canal puede ser activado por receptores acoplados a proteína G ya que el diacilglicerol (DAG) actúa como agonista directo [32], además, posee sitios de unión a receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) en la porción C-terminal, donde compite con la calmodulina que también se une a esta secuencia peptídica en una manera dependiente de Ca^{+2} [33]. Su activación conlleva a un aumento de la $[Ca^{+2}]_{IC}$, el cual se une a la calmodulina que decodifica el aumento transitorio del calcio en cambios bioquímicos mediante la activación de CAMKIV y Ras, esta última, a su vez, activa las vías MEK/ERK y PI3K/AKT [34–36]. Las 3 vías activadas tienen como objetivo común la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB, el cual regula la transcripción de genes que favorecen el crecimiento, sobrevivencia y diferenciación celular, además de promover la plasticidad neuronal, teniendo un efecto neuroprotector [37]. Su activación en el sistema nervioso central (SNC) mejora la plasticidad neuronal al actuar como intermediario en la guía del cono de crecimiento axonal [38], crecimiento dendrítico y formación de sinapsis excitatorias [39–41], y sobrevivencia celular [42,43], procesos que se han visto involucrados en la etiología de TEA [44–47]. Además, la hiperforina, principio activo principal de la hierba de San Juan y agonista del canal TRPC6 [48], induce el crecimiento de neuritas en células PC12 [48] y genera cambios en la morfología de la espina dendrítica en neuronas CA1 y CA3 del hipocampo [41], mediante la activación de las 3 vías señaladas anteriormente, MEK/ERK, PI3K/AKT y CAMKIV con posterior fosforilación del factor de transcripción nuclear CREB (**Figura 1**) [49].

3.2 Canal TRPC6 y su relación con TEA

La mutación y disrupción del gen TRPC6 en un individuo con TEA no sindrómico, junto con otras mutaciones encontradas en un número significativo de individuos con estos trastornos producen una reducción de su expresión, lo que resulta en la disminución de la fosforilación del factor CREB [28]. Esto causa alteraciones funcionales y morfológicas en las neuronas humanas, que se ven reflejadas en un crecimiento dendrítico y axonal defectuoso, acortamiento de neuritas, disminución de la arborización dendrítica y reducción de la densidad de la espina dendrítica [28]. Interesantemente, la mayoría de estas alteraciones pueden ser rescatadas usando hiperforina [28].

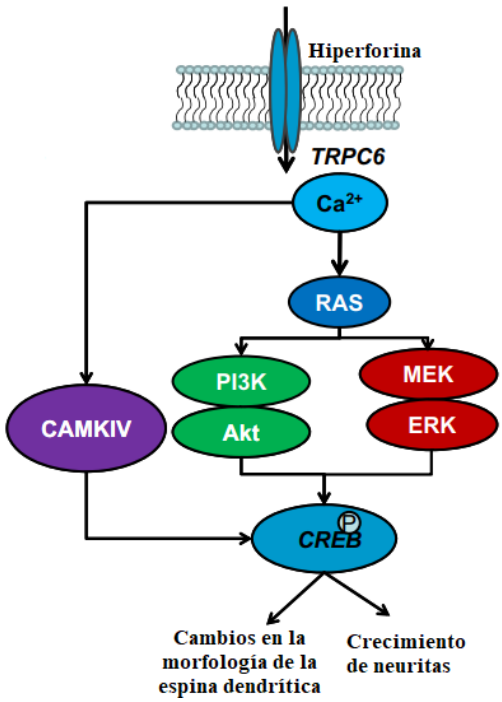


Figura 1. Cascada de señalización del canal TRPC6 activado por hiperforina. **Adaptado desde:** Heiser et al. [49].

En esta misma línea, recientemente se observó que la hiperforina puede rescatar una serie de comportamientos asociados a TEA, tales como una interacción social defectuosa, hiperactividad, alteración en la homeostasis del sueño y deficiencias en la memoria y aprendizaje, de acuerdo a un estudio realizado en un modelo de moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con un gen TRPγ mutante, homólogo al gen TRPC6 humano [50].

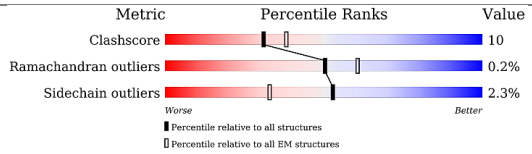
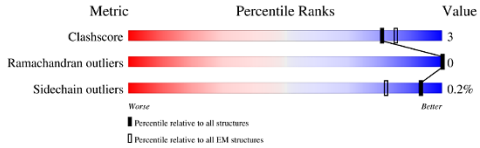
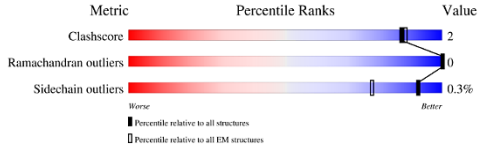
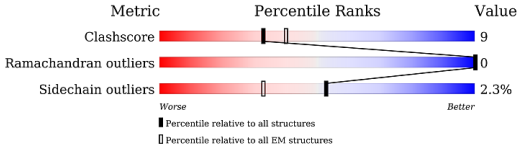
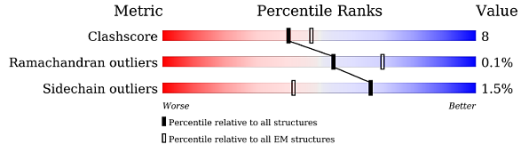
3.3 Características estructurales del canal TRPC6

Recién en el año 2018 se publicó la primera estructura tridimensional del canal TRPC6 humano, (hTRPC6) obtenida experimentalmente mediante la técnica de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM, por sus siglas en inglés) [29]. Desde entonces, otras estructuras en complejos con diferentes ligandos han sido publicadas, las cuales se resumen en la **Tabla 1**.

Su estructura consta de 4 subunidades equivalentes de 931 aminoácidos cada una, constituyendo un complejo homotetramérico que contiene el poro formado por seis hélices transmembrana [29]. Los aminoácidos hidrofóbicos encargados de sellar el poro son la Leu723, Ile727 y Phe731 con sus respectivas cadenas laterales, ubicados al final del segmento S6 en la porción intracelular, mientras que aquellos encargados de actuar como filtro de selectividad son la Phe683 y Gly684 con los carbonilos de su respectiva cadena principal, localizados después de la hélice del poro (HP), los

cuales son capaces de coordinarse con un catión [51]. En la **Figura 2** se presenta su estructura general.

Tabla 1: Estructuras publicadas del canal hTRPC6 a junio de 2023, obtenidas mediante Cryo-EM. **Fuente:** *Protein Data Bank* (PDB) [52–54].

PDB ID	Ligando	Resolución (Å)	Validación wwPDB	Año	Fuente
5YX9	Ninguno	3.80		2018	[29]
6UZA	Antagonista AM-1473	3.08		2020	[51]
6UZ8	Agonista AM-0883	2.84		2020	[51]
7DXG	Antagonista SAR7334	2.90		2022	[55]
7DXF	Antagonista BTDM	2.90		2022	[55]

Se conocen 3 sitios generales de unión a ligandos; uno para lípidos (**Figura 3**), los cuales se unen estableciendo contactos con las hélices S3-S6 y la hélice del poro en la parte externa de la membrana, mientras que, en la parte interna, uno es capaz de unirse a la cavidad formada por los segmentos S1, S4 y el codo pre-S1 y otro al sitio entre los segmentos S4 y el conector S4-S5, los que parecen ser hemisuccinato de colesterol y fosfatidilcolina, respectivamente, y se cree que podrían tener un rol modulador similar a lo visto en canales TRPV, aunque no está muy claro [51], además, es probable que la activación mediada por DAG sea por estimulación del sitio para lípidos cercano al poro [56]; posee un sitio de unión a antagonistas (**Figura 3**) orientado hacia el dominio

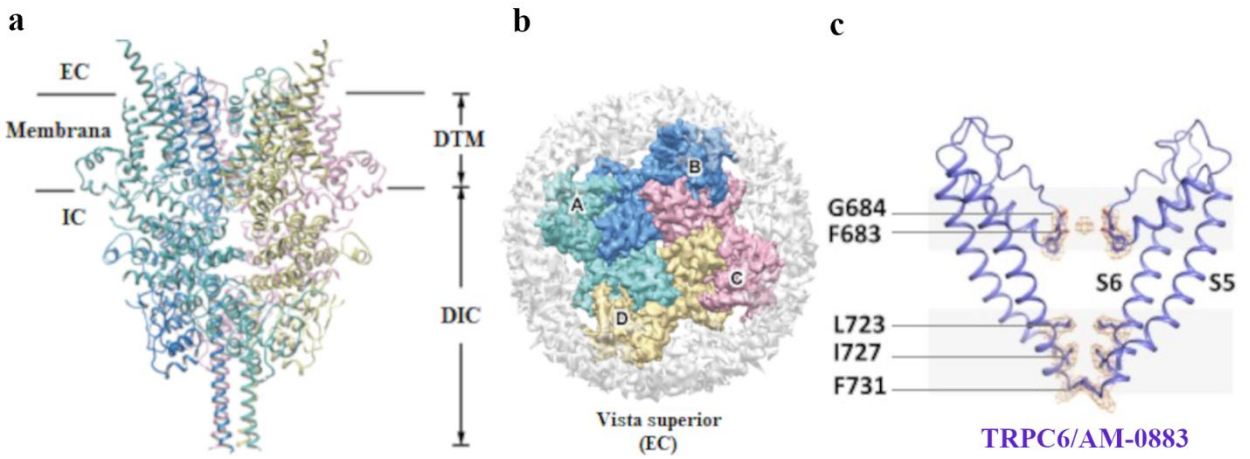


Figura 2. Representación gráfica del canal TRPC6. **a.** Mapa de densidad Cryo-EM de la estructura general del canal. **b.** Vista superior del canal, desde la porción extracelular. **c.** Dominio del poro (S5-S6) del canal en complejo con el agonista AM-0883. Los residuos que forman el filtro de selectividad y la compuerta intracelular se muestran como barras. **Adaptado desde:** Tang et al. [29] (**a,b**) ; Bai et al. [51] (**c**).

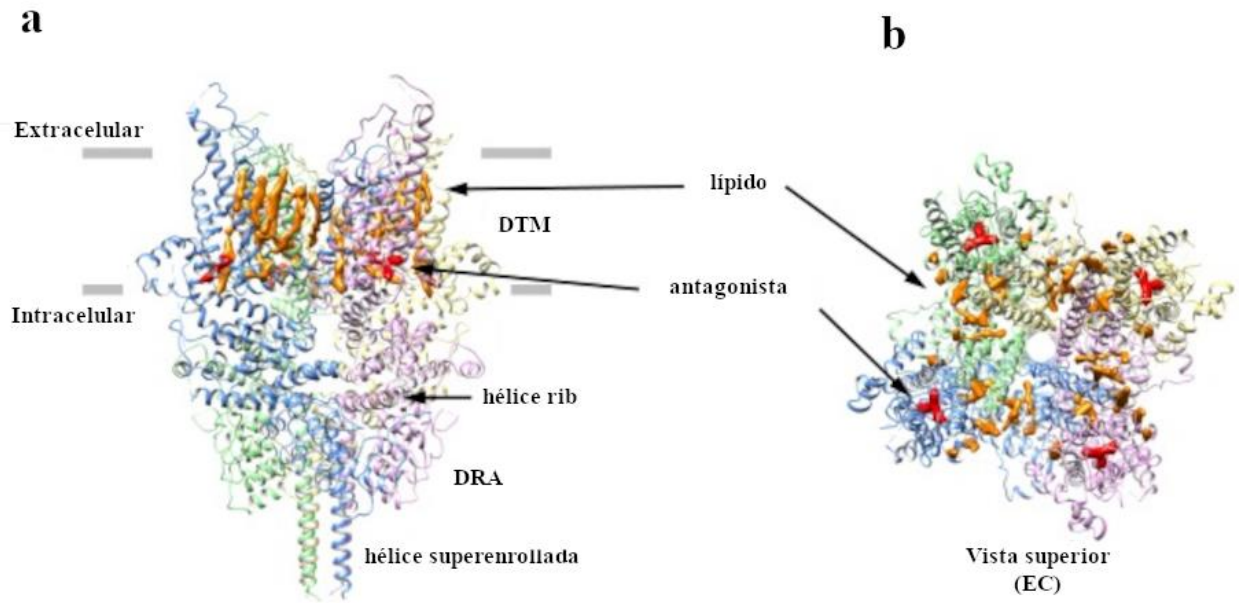


Figura 3. Canal TRPC6 con sus respectivos sitios de unión a lípidos y antagonistas. **a,b.** Modelo estructural del canal unido a lípidos (naranja) y al antagonista AM-1473 (rojo), en una vista frontal (**a**) y superior (**b**). **Adaptado desde:** Bai et al. [51].

citoplasmático y constituido por los segmentos S1-S4, la hélice TRP y el loop reentrante, con los residuos Lys442 e His446 de S1, Glu509 de S2, Asn527 y Asp530 de S3, Arg609 y Tyr612 de S4, Tyr753 de la hélice TRP y Arg758 del loop reentrante [51]; y por último, un sitio de unión a agonistas (**Figura 4**) ubicado en el dominio extracelular, formado por la hélice del poro de una

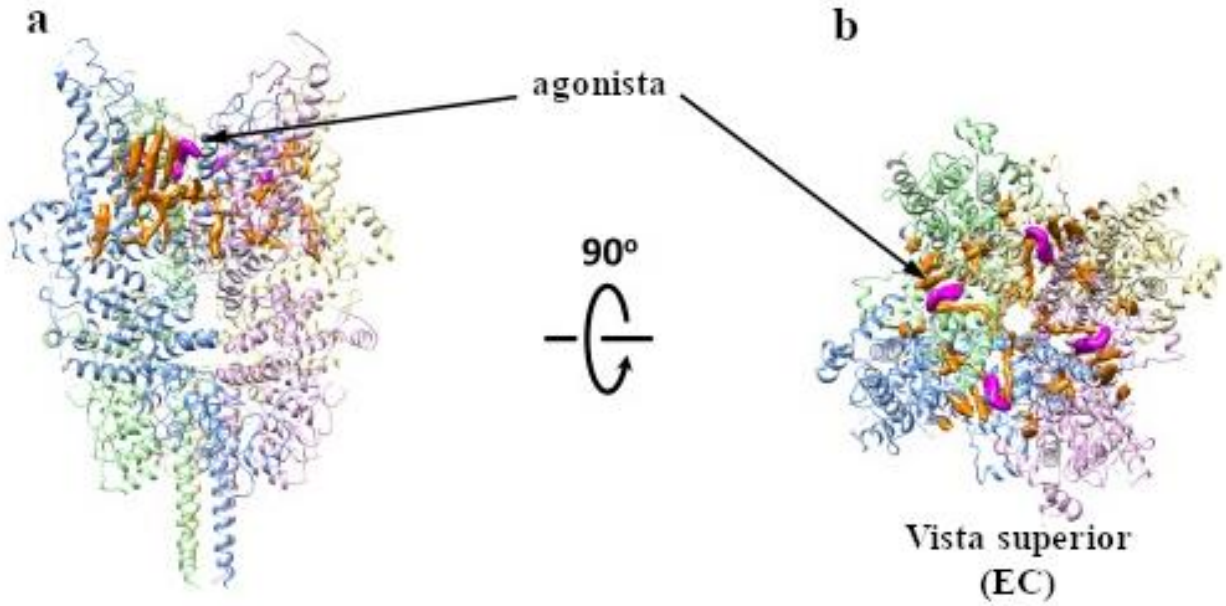


Figura 4. Canal TRPC6 con sus respectivos sitios de unión a agonistas. **a,b.** Modelo estructural del canal unido al agonista AM-0883 (magenta) en una vista frontal (**a**) y superior (**b**). **Adaptado desde:** Bai et al. [51].

subunidad y el segmento S6 de la subunidad adyacente, con los residuos Glu672, Phe675, Phe679 y Trp680 de la hélice del poro y Asn702, Tyr705, Val706 y Val710 del segmento S6 [51], además de otros residuos capaces de interaccionar por su cercanía espacial como Glu673 y Lys676 de la hélice del poro y Lys698, Glu701 y Val713 del segmento S6 [56]. Por lo tanto, cada canal es capaz de unir hasta 4 agonistas en forma simultánea. En la **Figura 5** se presenta la superficie de la cavidad unida al agonista AM-0883 en la estructura obtenida mediante Cryo-EM [51].

3.4 Agonistas conocidos del canal TRPC6

Si bien hay múltiple evidencia que respalda que hay un aumento de actividad del canal TRPC6 al ser tratado con hiperforina [41,43,48], se desconoce el mecanismo exacto por el cual lo logra [57], y debido a su estructura es poco probable que se una al sitio de unión a agonistas. Además de esta, se conocen otras moléculas capaces de unirse al sitio activo para agonistas y activar el canal TRPC6. Estos son AM-0883 [51], GSK1702934A (GSK) y M085 [56], presentados en la **Figura 6** con sus respectivos EC_{50} medidos directamente en el canal.

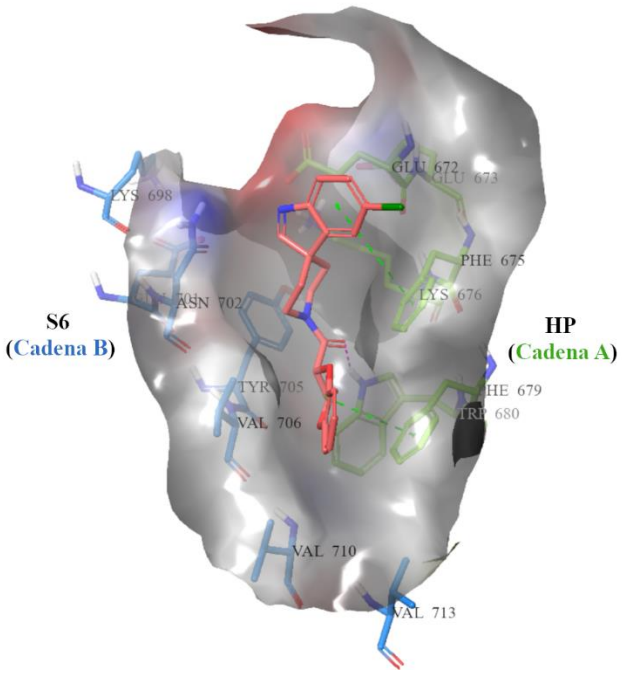
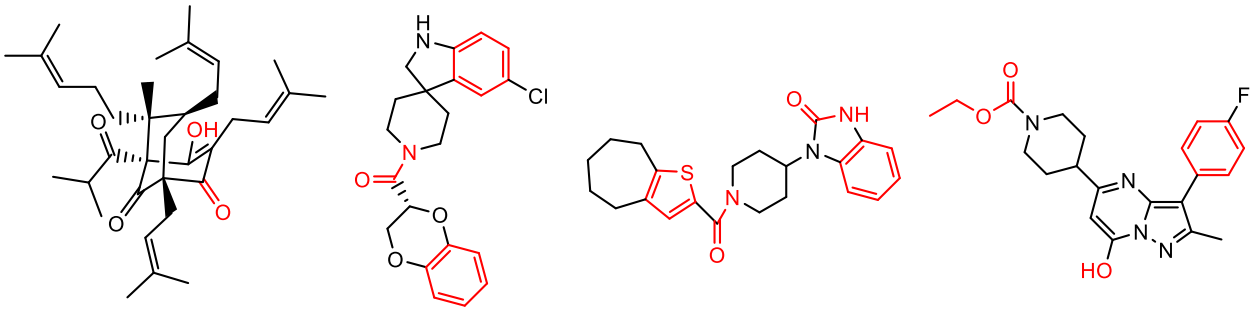


Figura 5. Mapa superficial de la cavidad en complejo con el agonista AM-0883 (rojo). Se presenta el sitio de unión formado por la hélice del poro (HP) de la cadena A (verde) y el segmento S6 de la cadena B (azul). PDB ID: 6UZ8 [51].



Hiperforina
EC_{50}: Desconocido

AM-0883
EC_{50}: 45,5 ± 10 nM

GSK1702934A
EC_{50}: 0,45 ± 0,03 µM

M085
EC_{50}: 2,94 ± 0,70 µM

Figura 6. Estructuras químicas de los agonistas conocidos para el canal TRPC6, con su respectivo EC_{50} medido directamente en el canal [51,56]. Se destacan en rojo los grupos funcionales importantes en la unión al sitio activo.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal de la Universidad de Valparaíso. Se empleó la suite Maestro Schrödinger versión 2020-3, con los respectivos softwares incluidos en esta. Se utilizaron técnicas de diseño *de novo* basado en receptor, estudios de *docking in silico* y dinámica molecular (DM) con el fin de obtener nuevas moléculas con potencial agonista del canal TRPC6, se calculó la energía MMGBSA como una estimación de la afinidad del complejo ligando-proteína, además de un análisis retrosintético y una predicción computacional del perfil farmacocinético y de toxicidad.

4.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*)

Se trabajó con la estructura Cryo-EM del hTRPC6 obtenida desde el *Protein Data Bank* (PDB) [52–54], con el PDB ID 6UZ8 [51], que corresponde a la proteína homotetramérica, desde el aminoácido 85 hasta el 931 (de un total de 931) para cada subunidad (A-B-C-D), en complejo con el agonista AM-0883, a una resolución de 2,84 Å y con el mejor perfil de validación PDB. Primero se limpió la estructura, eliminando los lípidos y 3 de 4 agonistas unidos, dejando solamente aquel unido a las cadenas A y B para utilizarlo como centro de referencia para el *docking*. Luego se preparó con el módulo *Protein Preparation Wizard* [58]. Se preprocesó con el algoritmo Epik [59,60] para generar los probables estados de ionización de los residuos aminoacídicos a un pH de 7,4 ± 0,1 (simulando al fisiológico) y se completaron las cadenas laterales faltantes con la función *Prime* [61,62], dado que estaban presentes en la secuencia al importar la proteína. Para optimizar la orientación de los enlaces a hidrógeno de los residuos con grupos funcionales hidroxilo (Ser, Thr y Tyr), tiol (Cys), amida (Asn y Gln) e imidazol (His), se usó el algoritmo PROPKA a un pH de 7,4. Finalmente, se minimizó la estructura con un valor de convergencia de RMSD de 0,3 Å utilizando el campo de fuerza OPLS3e [63,64], además, se refinó manualmente la estructura eliminando cualquier otra molécula exógena acoplada, ya sea de agua u otro solvente o contaminante.

Cada uno de los ligandos fue preparado utilizando la herramienta *LigPrep* [65]. Para generar los confórmeros de mínima energía se usó el campo de fuerza OPLS3e [63,64]. Se generaron los posibles estados de ionización de cada ligando a un pH de 7,4 ± 0,1 mediante el algoritmo Epik [59,60]. Finalmente, cada uno de ellos fue revisado manualmente para comprobar que la

optimización haya ocurrido de forma correcta, verificando especialmente la estereoquímica y los electrones de valencia.

Se ejecutó el *docking* mediante la herramienta *Induced Fit Docking* [66,67] aplicando un protocolo estándar (hasta 20 poses por cada ligando), usando el campo de fuerza OPLS3e [63,64], tomando como centro de referencia para el *dockeo* al ligando AM-0883 unido a la cavidad formada entre la hélice del poro de la cadena A y el segmento S6 de la cadena B, *dockeando* ligandos de tamaño similar a este. Se permitió la adecuación conformacional de anillos cuya energía se encontró dentro de 2,5 kcal/mol sobre la conformación de mínima energía, se penalizaron los enlaces amida que no fueran *cis* o *trans* y se aumentó la planicidad de grupos pi-conjugados como anillos aromáticos. El *docking* se realizó con el software *Glide* [68–70] usando un factor de escala de van der Waals para receptor y ligando de 0,50, permitiendo una adecuada flexibilidad y así *dockear* en las mejores poses, con un máximo de 20 poses por ligando. Los residuos encontrados a menos de 5 Å de la pose de cada ligando fueron refinados. Se *redockearon* poses cuya energía se encontró bajo el límite de 30 kcal/mol sobre la energía de la mejor pose y que estuvieran dentro de las 20 mejores poses. El cálculo de la función de asignación de *scoring* se realizó con un modo de extra-precisión (XP) [70] y sus respectivos descriptores, donde a menor valor (más negativo), mejor puntaje.

Se hizo un *screening* inicial a un total de 103 moléculas obtenidas desde los archivos del grupo de investigación, distribuidas en 5 grandes núcleos diferentes (**Figura 7**), pero con similitudes estructurales, elegidas según el cumplimiento de los siguientes criterios de selección:

1. Múltiples anillos aromáticos (3-5).
2. Conector polar (éster, amida, sulfonamida, éter o amina).
3. Masa molecular <500 Da.

A partir de los resultados obtenidos, se inició un ciclo de rediseño y prueba de nuevos derivados con el objetivo de establecer nuevas interacciones en el sitio activo, considerando su conformación en la cavidad y su distancia con respecto a otros aminoácidos cercanos, *dockeando* 95 moléculas más. Además, se *dockearon* los 4 agonistas conocidos para el canal con fines comparativos, llegando a un total de 202 compuestos.

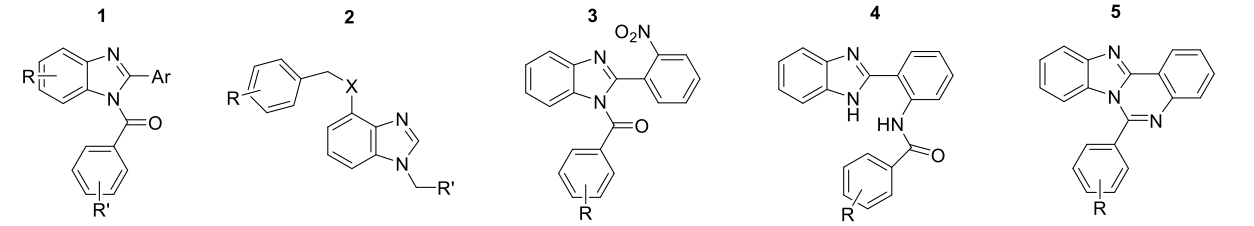


Figura 7. Núcleos estructurales de las 5 generaciones de moléculas probadas en el *screening* inicial. Se probaron un total de 103 moléculas.

4.2 Estudios de Dinámica Molecular

Los estudios de dinámica molecular se realizaron utilizando como estado inicial (t = 0) la mejor pose (de puntaje más negativo) de cada compuesto obtenida mediante el *docking*. Se ejecutaron a los 4 mejores derivados, al agonista de mejor puntaje en el *docking* (GSK) y al sistema proteico sin ligandos. Previamente, se preparó el sistema con el módulo *System Builder* incorporado en *DESMOND* [71], utilizando un volumen de caja cúbica minimizado pero suficiente para contener la proteína, usando como solvatación el modelo acuoso TIP3P, agregando una membrana lipídica mediante el modelo POPE (310K), es decir, a 36,85°C (simulando la temperatura corporal) y ajustando la posición de la membrana de forma automática, asegurándose que esta cubriera el dominio transmembrana, según la posición descrita en la literatura [51], además, se añadieron iones en la solución, agregando Na^+ para neutralizar la carga negativa neta del sistema y NaCl 0,15 M (equivalente a 0,9%) para simular las condiciones fisiológicas. Esta preparación usó el campo de fuerza OPLS3e [63,64]. Posteriormente, se realizó la dinámica molecular con el módulo *Molecular Dynamics*, también implementado en *DESMOND* [71], para una simulación de alto rendimiento, utilizando un tiempo total de simulación de 100 ns, intervalo de registro de 100 ps, número de *frames* aproximado de 1000, un modelo de ensamble NPT (a temperatura y presión constantes) a una temperatura de 310 K (36,85°C) y presión de 1,01325 bar (1 atm), simulando la temperatura fisiológica y presión atmosférica a nivel del mar, respectivamente. Se usó el módulo *Simulation Interaction Diagram* (SID) implementado en *DESMOND* [71] para analizar las interacciones entre los ligandos y hTRPC6. Los resultados reportados fueron los gráficos de RMSD (Desviación cuadrática media, por sus siglas en inglés) de proteína y ligando respecto a su posición inicial, las interacciones relevantes entre el ligando y cada residuo del sitio activo con su tiempo de

permanencia (expresado como % del tiempo total de simulación) durante la simulación, la trayectoria del sistema a lo largo de la simulación, entre otros.

Con el fin de evidenciar el aumento del diámetro del poro durante la simulación se midieron las distancias entre los 5 aminoácidos claves para su funcionamiento, aquellos encargados de actuar como filtro de selectividad a cationes (Phe683 y Gly684 con los carbonilos de su cadena principal) y los responsables de sellar el poro (Leu723, Ile727 y Phe731 con sus cadenas laterales), tomando como puntos de referencia a los mismos átomos para cada aminoácido (señalados en la **Figura 8**), midiendo ambos diámetros (entre las cadenas A-C y B-D) al inicio (t = 0) y cada 10 ns de simulación (equivalentes a 100 *frames*), para finalmente graficar el diámetro promedio del poro (Å) versus el tiempo de simulación (ns). Se consideró como control negativo a la dinámica del sistema sin ningún ligando y como control positivo a la del sistema con el agonista GSK.

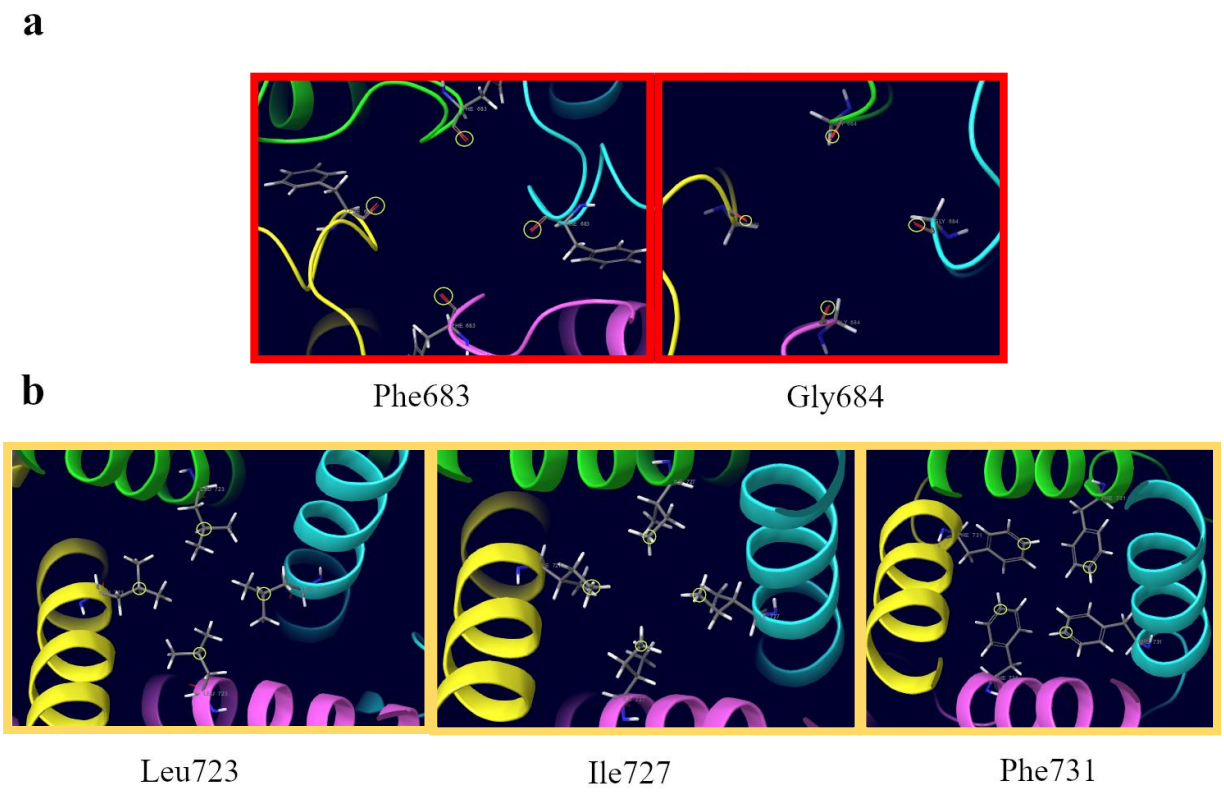


Figura 8. Aminoácidos encargados del filtro de selectividad (**a**) y de la compuerta intracelular (**b**) del poro. Los átomos considerados para las mediciones del diámetro del poro están encerrados en amarillo. Se muestran las cadenas A, B, C y D en los colores verde, celeste, magenta y amarillo, respectivamente.

Para el análisis de resultados se utilizó estadística descriptiva, donde las variables cuantitativas fueron descritas de acuerdo a su distribución determinada por medio del test de Kolmogórov-Smirnov (test KS). En este caso, las variables paramétricas fueron descritas como media y desviación estándar. Para la correlación de las variables se utilizó la prueba de correlación de Pearson. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para todos los cálculos se usó el software estadístico GraphPad Prism versión 9.5.1 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EUA, www.graphpad.com.

4.3 Cálculos de energía MMGBSA

Para estimar la energía libre de unión del complejo proteína-ligando y, por consiguiente, su afinidad [72], se ejecutaron cálculos de MMGBSA implementado en *Prime* [61,62] a la estructura en el *frame* inicial (t = 0) y en los últimos 10 frames (99,10 – 100 ns), con un modelo de solvatación VSGB y campo de fuerza OPLS3e [63,64], con flexibilidad de los residuos encontrados dentro de 4,0 Å de distancia respecto al ligando y minimizando todos los átomos de cada residuo. El resto de las opciones se dejaron por defecto. Finalmente, se comparó la energía libre de unión del estado inicial versus el promedio de los últimos 10 *frames*.

4.4 Análisis Retrosintético:

El análisis de factibilidad sintética se llevó a cabo realizando una búsqueda en la literatura de síntesis de compuestos similares, para establecer una ruta retrosintética para la mejor molécula obtenida. Se empleó la estrategia clásica de análisis retrosintético de Corey [73].

4.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas:

Para predecir las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas (ADME) se utilizó la plataforma suiza SwissADME [74], mientras que para predecir el potencial para convertirse en fármaco (*druglikeness* por su nombre en inglés) se usaron las reglas de Lipinski [75]. Estas herramientas se aplicaron a la molécula más prometedora y algunos derivados diseñados en la búsqueda de mejorar dichos parámetros.

4.6 Predicción de Toxicidad:

Para predecir la toxicidad del compuesto más prometedor se usó la plataforma coreana PreADMET [76] con su módulo *Toxicity Prediction*, el cual predijo el resultado esperado en una serie de pruebas de toxicidad comúnmente realizadas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*)

5.1.1 *Screening* inicial

Luego de procesar y analizar los resultados del *screening* inicial (**Anexo 1**), se optó por elegir a la molécula número 13 de la 4° generación (**4-13**), con un valor XPGScore de -9,246 kcal/mol, como el compuesto de partida para diseñar mejores derivados (**Figura 9**).

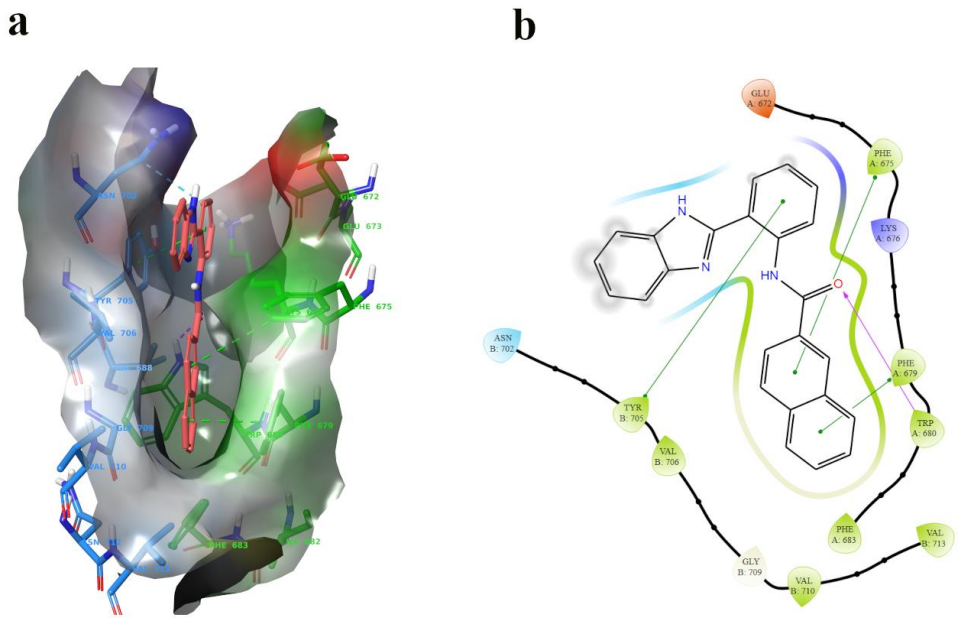


Figura 9. *Docking* entre el compuesto de partida (**4-13**) y el sitio activo para agonistas del canal hTRPC6. **a.** Pose en 3D del acoplamiento del compuesto **4-13** en la cavidad formada por la HP de la cadena A (verde) y el segmento S6 de la cadena B (azul). El compuesto adopta una conformación coplanar. **b.** Diagrama 2D de interacciones entre el compuesto **4-13** y el sitio activo. Se establecieron 3 interacciones de *pi-stacking* (verde) entre los anillos de benceno y naftaleno del compuesto con los residuos Phe675 y Phe679 de la cadena A, y Tyr705 de la cadena B, además de 1 puente de hidrógeno (magenta) entre el oxígeno del conector carbonílico del compuesto y el Trp680 de la cadena A. Se muestran los residuos dentro de 4 Å de distancia respecto al ligando.

5.1.2 Estrategia de diseño de nuevos derivados potenciados

Basado en la conformación del ligando en el sitio activo y su distancia respecto a otros residuos, se inició un ciclo de diseño y prueba de nuevos derivados hasta llegar al primer compuesto prometedor BT11, a partir del cual se diseñaron 3 nuevos derivados, T18, INV29 y SOH95, para estudiar el impacto de los cambios estructurales en la unión al sitio activo (**Figura 10**).

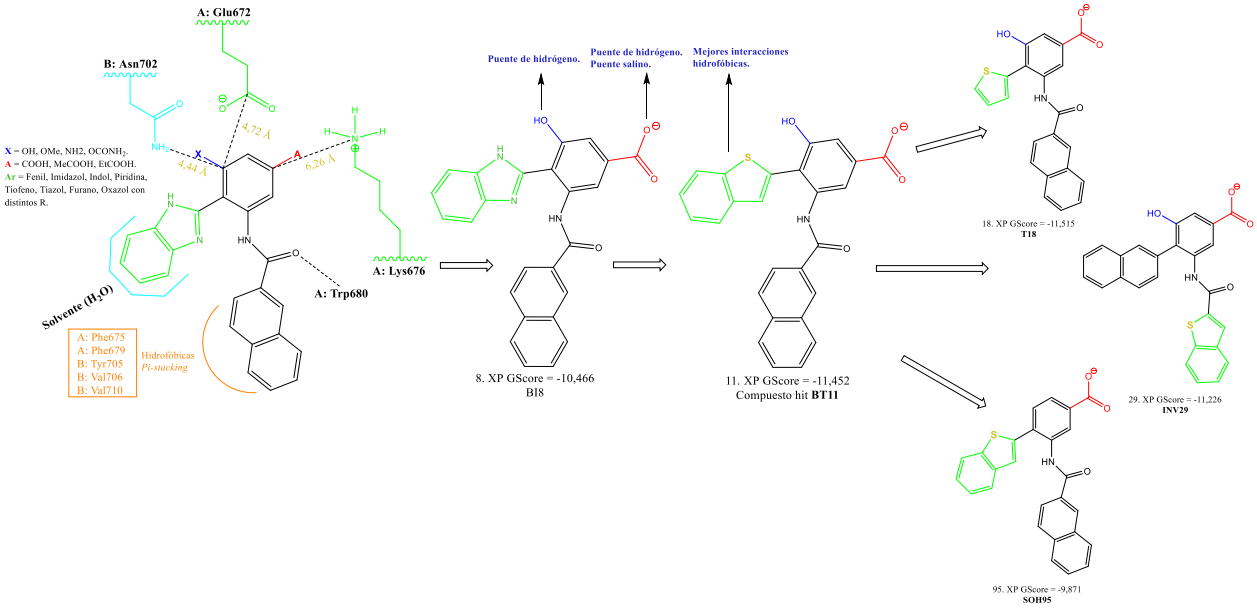
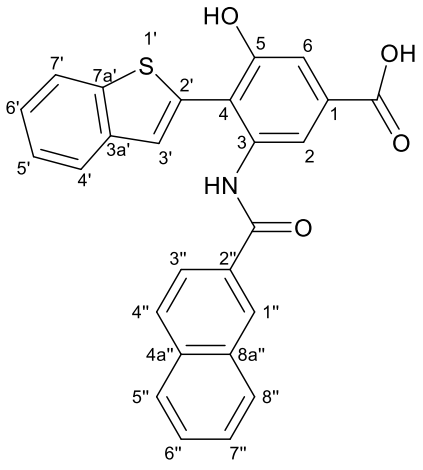


Figura 10. Estrategia de diseño de nuevos derivados a partir del compuesto **4-13**. Se presenta el *hit* **BT11** y sus derivados **T18** (sin el benceno unido al tiofeno), **INV29** (sistemas de dos anillos aromáticos invertidos) y **SOH95** (carente del grupo -OH en posición 5), con sus respectivos puntajes en kcal/mol.

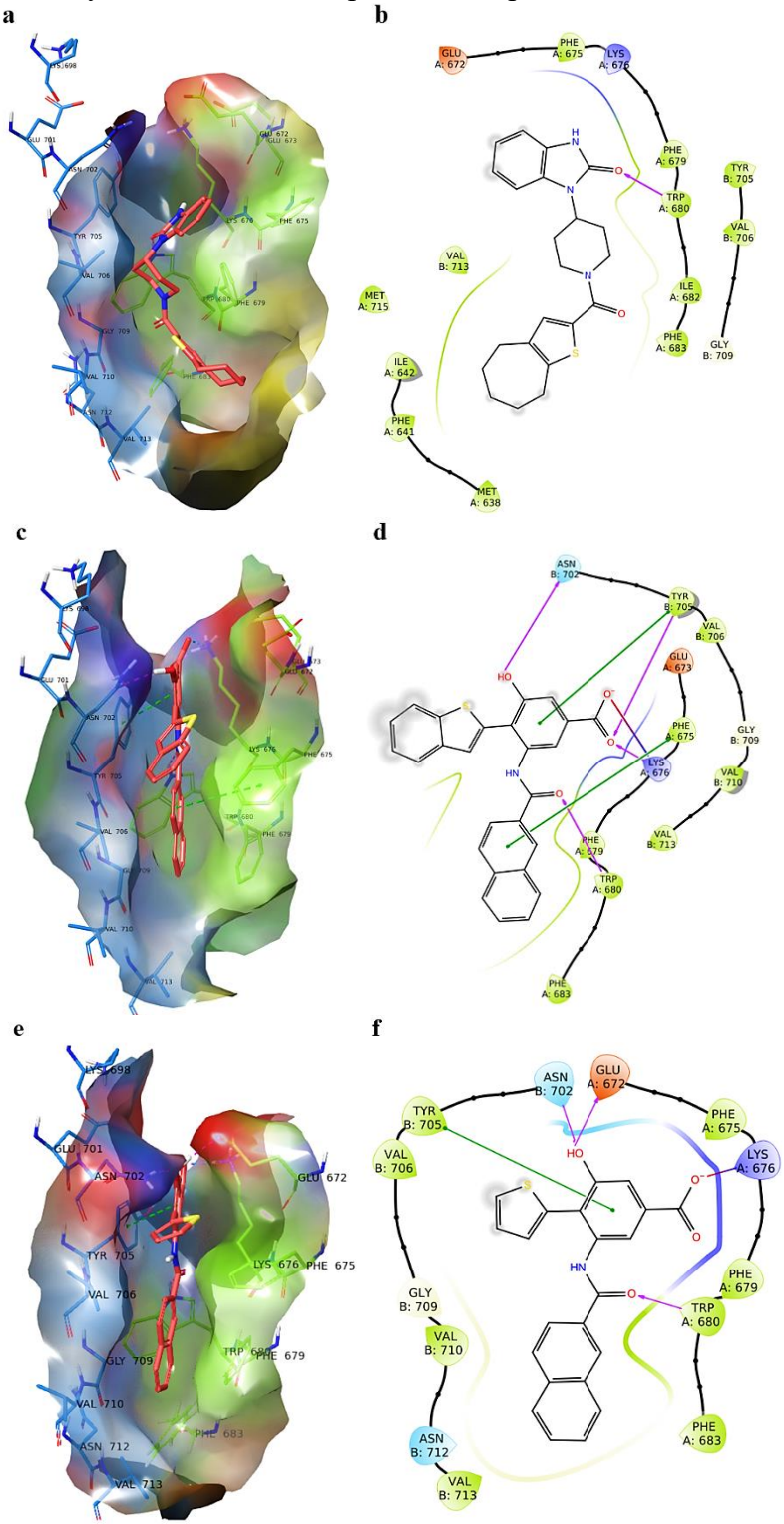


BT11
Ácido 3-(2-naftamido)-4-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-5-hidroxibenzoico

Figura 11. Estructura y numeración del compuesto *hit* **BT11**.

5.1.3 *Docking* de nuevos derivados y agonista de referencia

A continuación, se presenta la conformación de unión de los compuestos BT11, T18, INV29 y SOH95, además del agonista GSK, al sitio de unión para agonistas (**Figura 12**). Los resultados del resto de agonistas y otros derivados importantes se presentan en el **Anexo 2**.



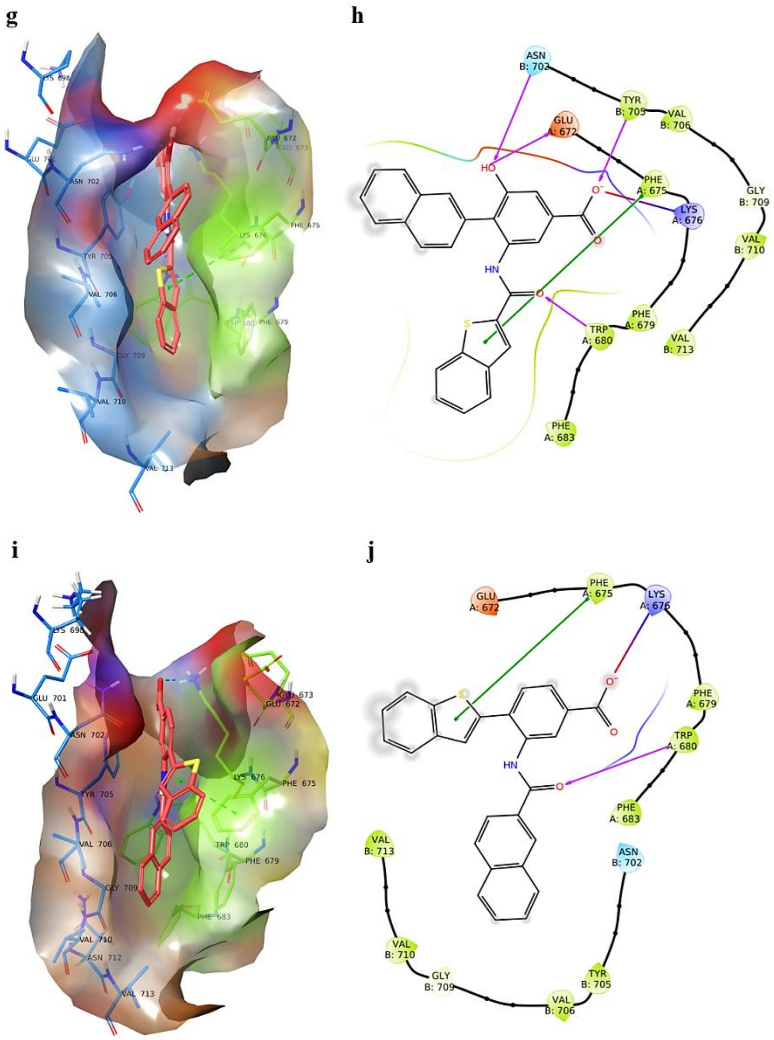
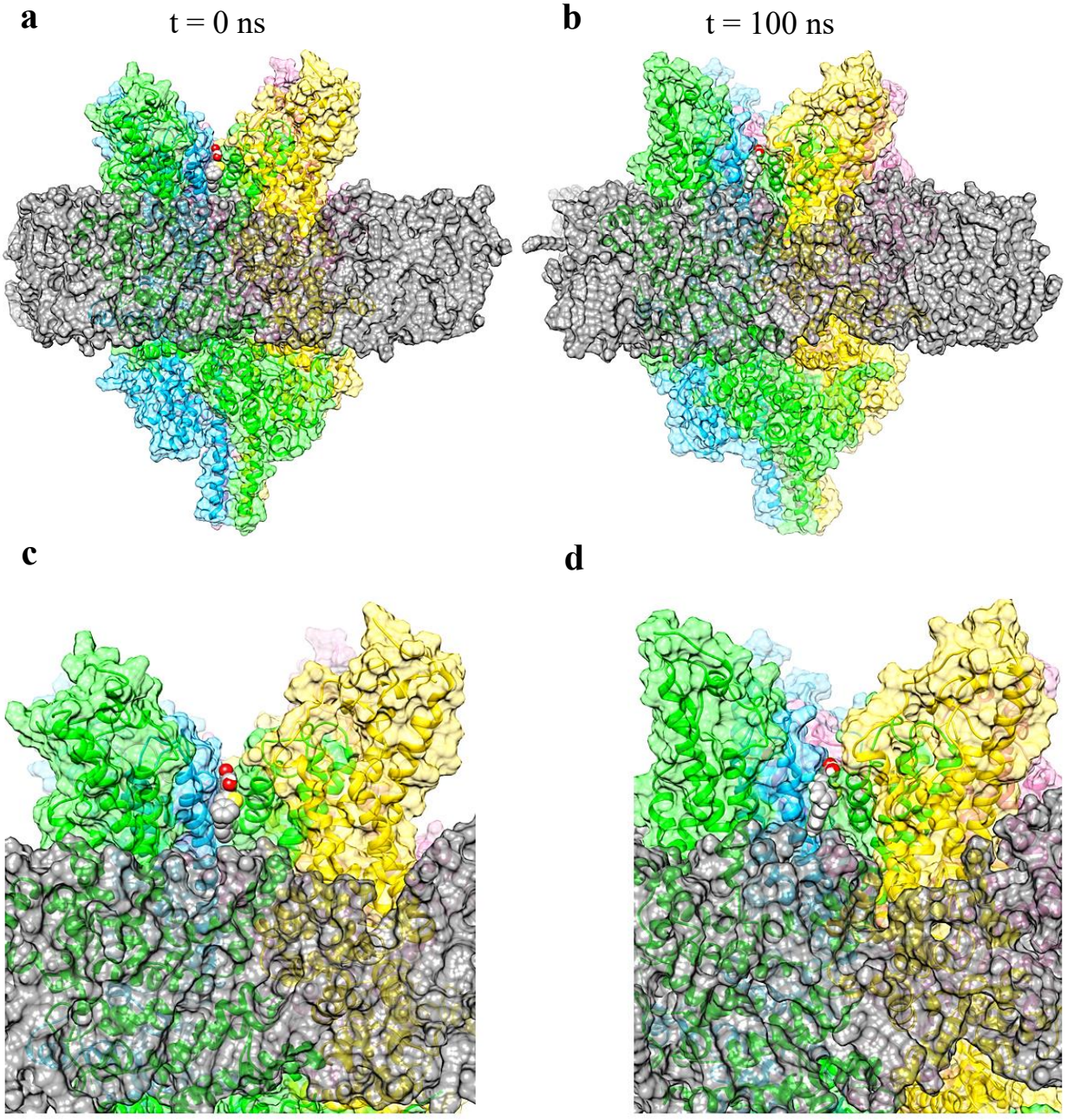


Figura 12. *Docking* de los ligandos en el sitio de unión a agonistas del canal hTRPC6, formado entre la hélice del poro de la cadena A (verde) y el segmento S6 de la cadena B (azul). Las interacciones de puente de hidrógeno, puente salino y *pi-stacking* se representan en color magenta, celeste (azul/rojo en diagrama 2D) y verde, respectivamente. **a.** Pose en 3D del acoplamiento del agonista GSK. Este adopta una conformación estirada dentro de la cavidad, con el sistema cicloheptano-tiofeno orientado hacia la porción hidrofóbica del sitio y la benzoimidazolona hacia la región más polar. **b.** Diagrama 2D de interacciones del agonista GSK. Se estableció un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la imidazolona y el A:Trp680, además de interacciones hidrofóbicas no mostradas. **c.** Pose en 3D del acoplamiento del derivado BT11. Los grupos naftaleno y ácido benzoico quedan insertos en la cavidad en una posición coplanar, mientras que el benzotiofeno adopta un ángulo de aproximadamente 90°. **d.** Diagrama 2D de interacciones de BT11. Se establecieron 4 puentes de hidrógeno con A:Lys676, A:Trp680, B:Asn702 y B:Tyr705, 1 puente salino con A:Lys676 y 2 *pi-stacking* con A:Phe675 y B:Tyr705. **e.** Pose en 3D de T18. Adopta una conformación similar a BT11. **f.** Diagrama 2D de interacciones de T18. Se establecieron 3 puentes de hidrógeno con A:Glu672, A:Trp680 y B:Asn702, 1 puente salino con A:Lys676 y 1 *pi-stacking* con B:Tyr705. **g.** Pose en 3D de INV29. Adopta una conformación similar al resto, pero con un ángulo <90° en el grupo naftaleno. **h.** Diagrama 2D de interacciones de INV29. Se establecieron 4 puentes de hidrógeno con A:Glu672, A:Trp680, B:Asn702 y B:Tyr705, 1 puente salino con A:Lys676 y 1 *pi-stacking* con A:Phe675. **i.** Pose en 3D de SOH95. Adopta una conformación similar a BT11. **j.** Diagrama 2D de interacciones de SOH95. Se estableció solo 1 puente de hidrógeno con A:Trp680, 1 puente salino con A:Lys676 y 1 *pi-stacking* con A:Phe675.

5.2 Estudios de Dinámica Molecular

5.2.1 Conformación del complejo BT11-hTRPC6

En la **Figura 13** se presenta la conformación del complejo BT11-hTRPC6 antes de iniciar la dinámica (t = 0 ns) y una vez finalizada (t = 100 ns).



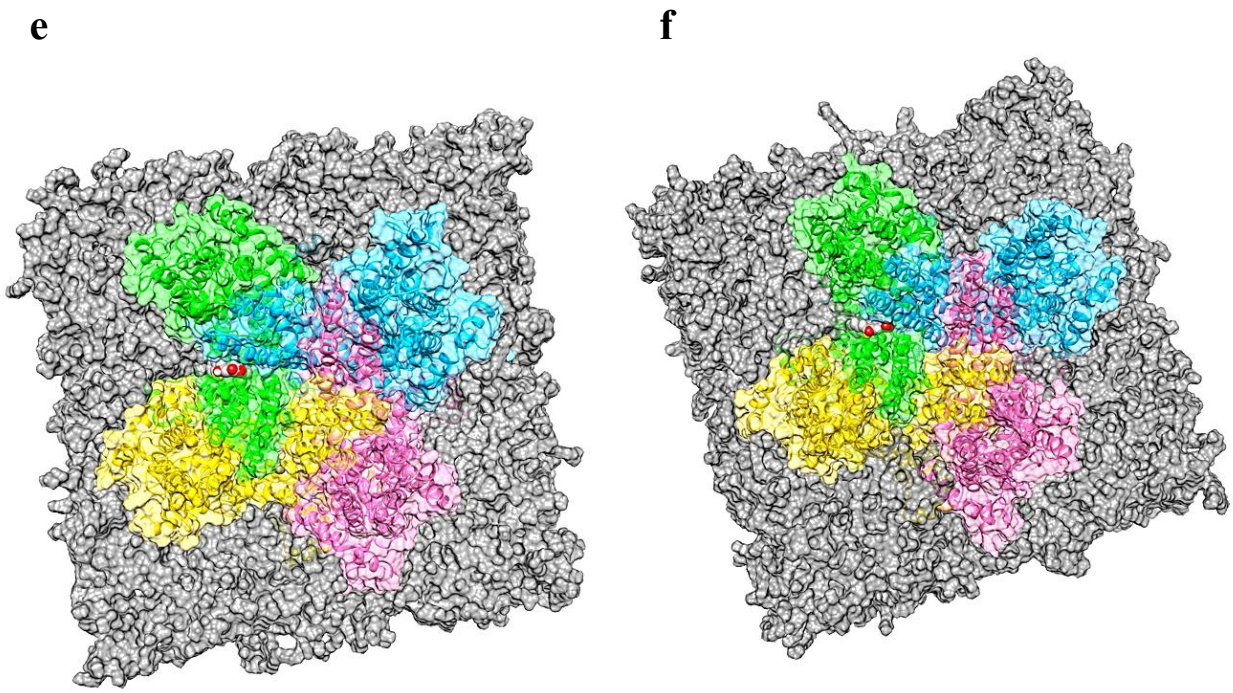


Figura 13. Conformación del complejo BT11-hTRPC6 al inicio (**a, c** y **e**) y final (**b, d** y **f**) de la dinámica molecular en una vista panorámica (**a,b)**, cercana (**c,d**) y superior (**e,f**). Se presentan las cadenas A, B, C y D en los colores verde, celeste, rosado y amarillo, respectivamente. El ligando BT11 se muestra como esferas y está unido al sitio activo formado por las cadenas A y B. Se puede observar que este persisitó en el sitio activo en una conformación similar a la inicial hasta el término del tiempo de simulación.

5.2.2 RMSD Proteína-Ligando

A continuación, se presentan los gráficos de RMSD (de las siglas en inglés para Desviación Cuadrática Media) a lo largo de la simulación, obtenidos en los estudios de DM (**Figura 14**).

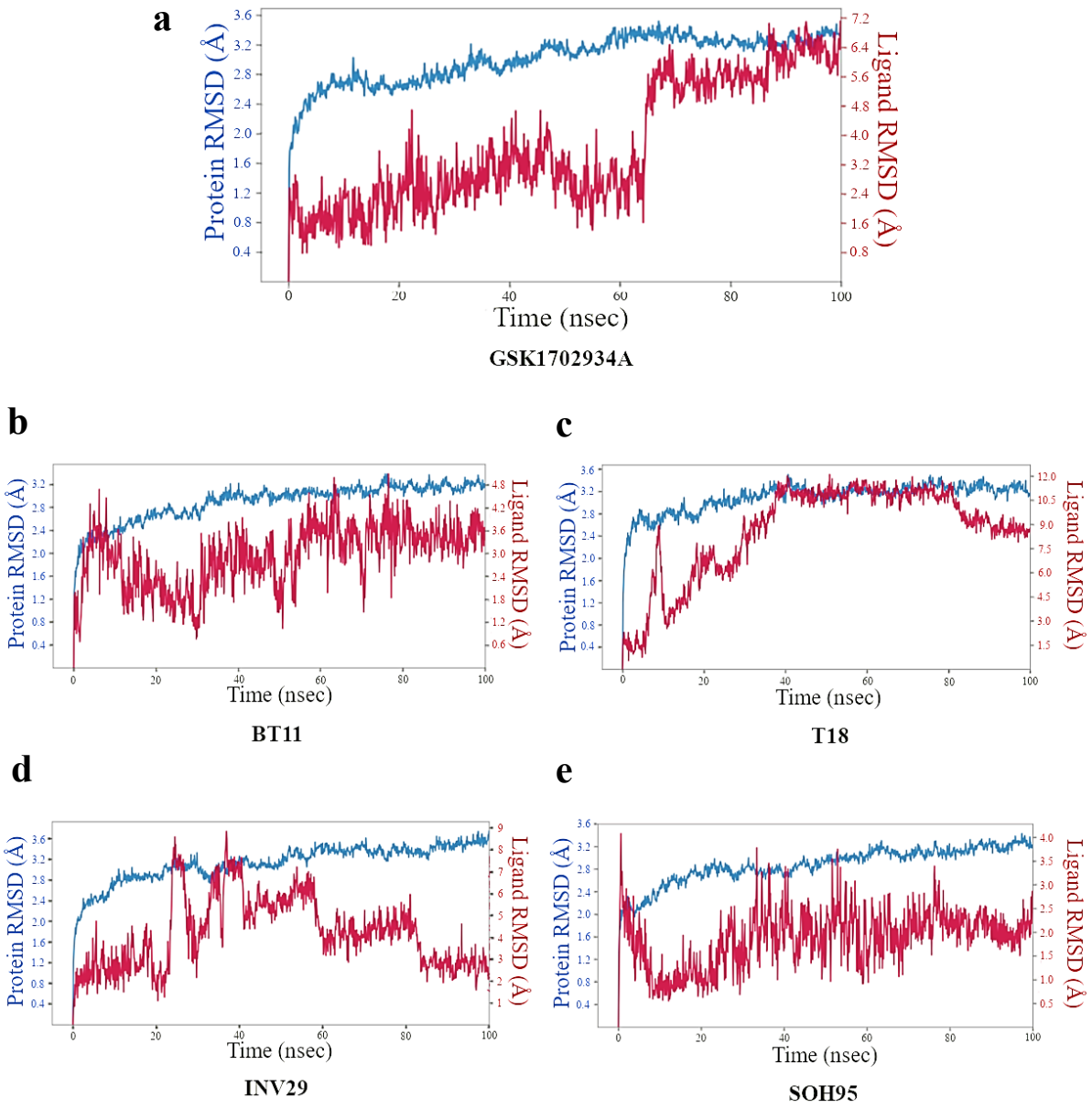


Figura 14. Gráficos de RMSD respecto al frame inicial durante el tiempo de simulación del agonista GSK (**a**) y de los derivados BT11 (**b**), T18 (**c**), INV29 (**d**) y SOH95 (**e**). El eje Y izquierdo representa el RMSD del canal hTRPC6 solo (azul) y el derecho el RMSD del complejo hTRPC6-agonista (rojo), mientras que el tiempo de simulación se muestra en el eje X. Todos presentaron una adecuada estabilización en el RMSD de la proteína a partir de los 10 ns. Los compuestos BT11 y SOH95 presentan la menor fluctuación de RMSD en complejo con hTRPC6, siendo comparables al RMSD de la proteína, indicando que se estabilizaron en el sitio activo durante toda la simulación. El agonista GSK presenta una fluctuación drástica a partir de los 65 ns. El compuesto T18 presenta una fluctuación superior a 3 desde los 5 ns, indicando que fue desplazado del sitio activo. De forma similar, el compuesto INV29 presentó una gran fluctuación de 20 a 80 ns, siendo estabilizado posteriormente.

5.2.3 Contactos Proteína-Ligando

En la **Figura 15** se presentan los gráficos de cada ligando con la fracción de interacciones por residuo en toda la simulación.

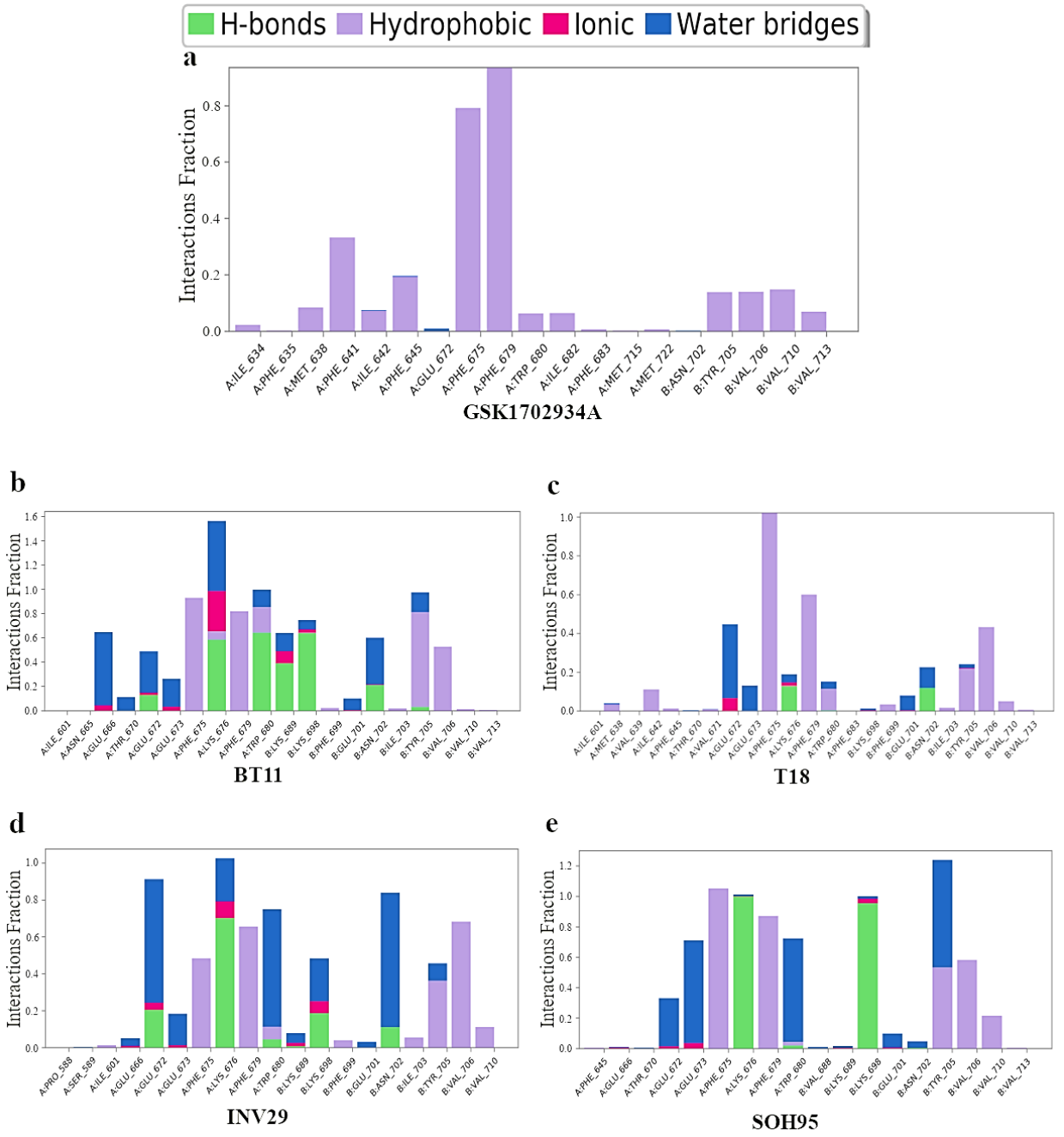


Figura 15. Fracción de interacciones por residuo del agonista GSK (**a**) y de los derivados BT11 (**b**), T18 (**c**), INV29 (**d**) y SOH95 (**e**). El compuesto BT11 se estabiliza principalmente mediante puentes de hidrógeno y puentes salinos (barras verde y magenta, respectivamente), además de interacciones hidrofóbicas (barras violetas), mientras que el agonista GSK solo establece interacciones de este último tipo. Al modificar la molécula se afectó negativamente las interacciones, perdiendo principalmente el puente de hidrógeno con A:Trp680, fundamental en el anclaje al sitio activo.

Además, en la **Figura 16** se presentan los gráficos de los contactos totales entre ligando y proteína a través del tiempo de simulación.

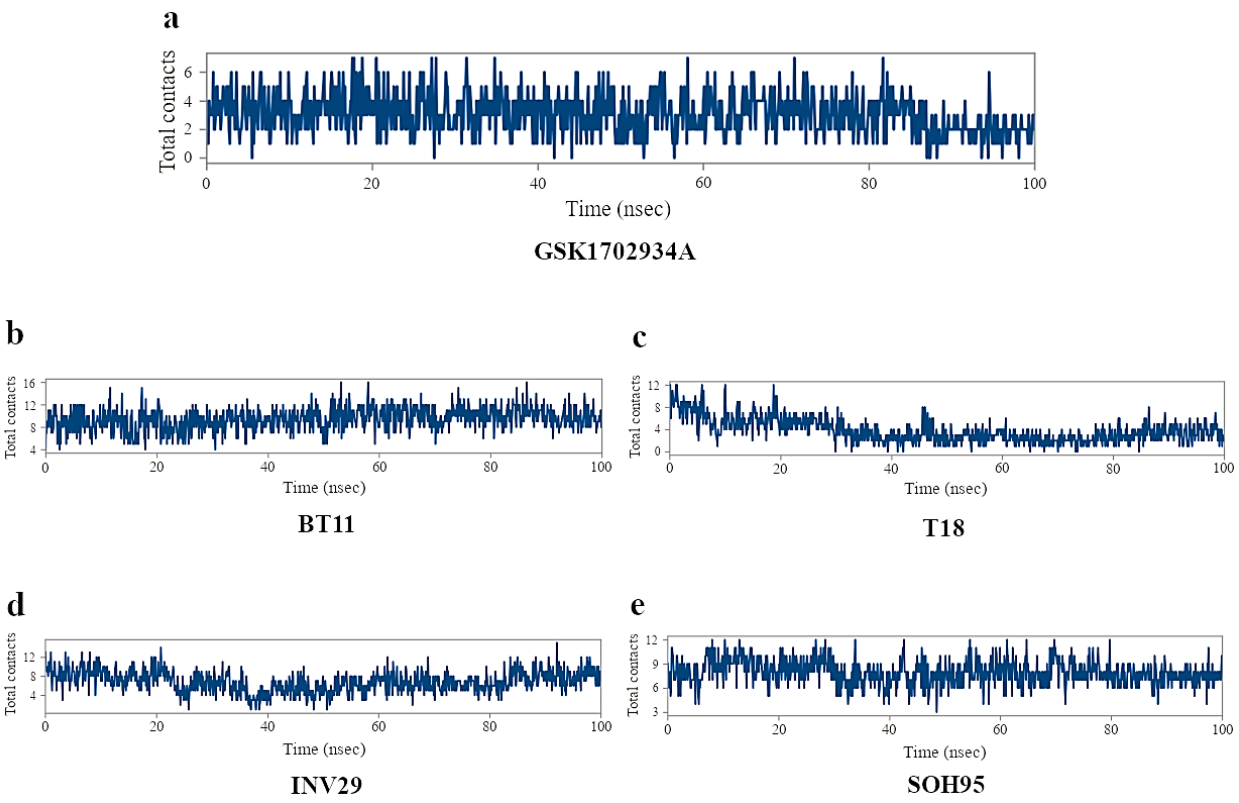


Figura 16. Gráficos de los contactos totales entre ligando y proteína para el agonista GSK (**a**) y los derivados BT11 (**b**), T18 (**c**), INV29 (**d**) y SOH95 (**e**). El compuesto BT11 estableció un promedio de 10 contactos totales mientras que GSK solo un promedio de 4. Al modificar la estructura se perdieron ciertos contactos, teniendo un promedio de 8 contactos para INV29 y SOH95 y de 4 para T18.

5.2.4 Contactos Ligando-Proteína

En la **Figura 17** se presentan los tiempos de permanencia de las interacciones más relevantes durante la simulación.

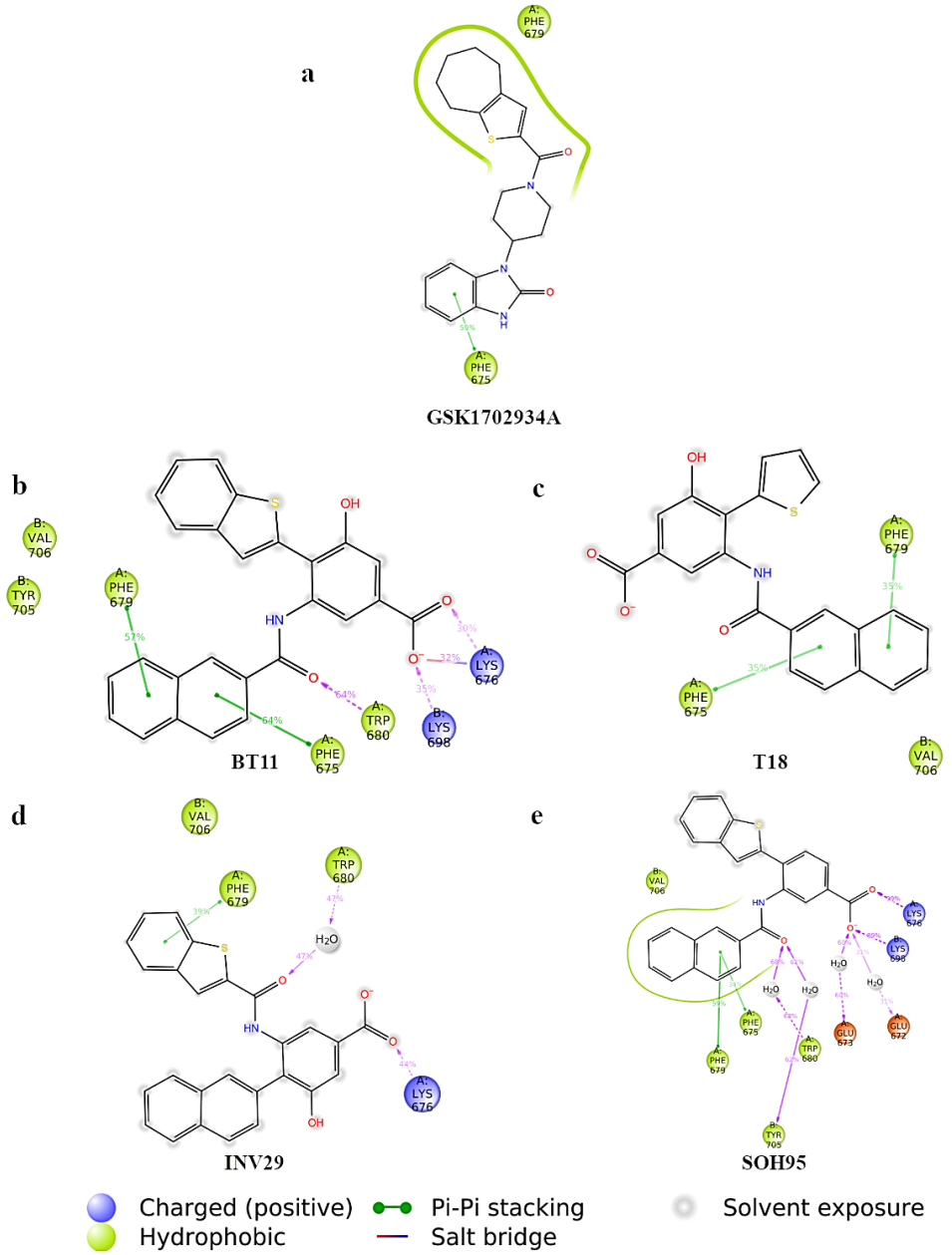


Figura 17. Tiempos de permanencia de las interacciones más relevantes para GSK (**a**), BT11 (**b**), T18 (**c**), INV29 (**d**) y SOH95 (**e**). Se muestran solo las interacciones por residuo que persistieron durante más del 30% del tiempo total de simulación (100 ns). El agonista GSK solo estableció interacciones hidrofóbicas, formando un *pi-stacking* con A:Phe675 que permaneció el 50% del tiempo, mientras que el derivado BT11 logró establecer tres interacciones significativas con A:Lys676 y B:Lys698, que en conjunto suman casi un 100% de tiempo de permanencia, además de un puente de hidrógeno con A:Trp680 el 64% del tiempo, un pi-stacking con A:Phe679 el 57% del tiempo y otro con A:Phe675, en un tiempo mayor al establecido por GSK. Las modificaciones realizadas al compuesto BT11 afectaron negativamente el patrón de interacciones.

5.2.5 Gráficos SASA del Ligando

A continuación, se presentan los gráficos SASA (de las siglas en inglés para Área Superficial Accesible al Solvente) del ligando durante el tiempo de simulación (**Figura 18**).

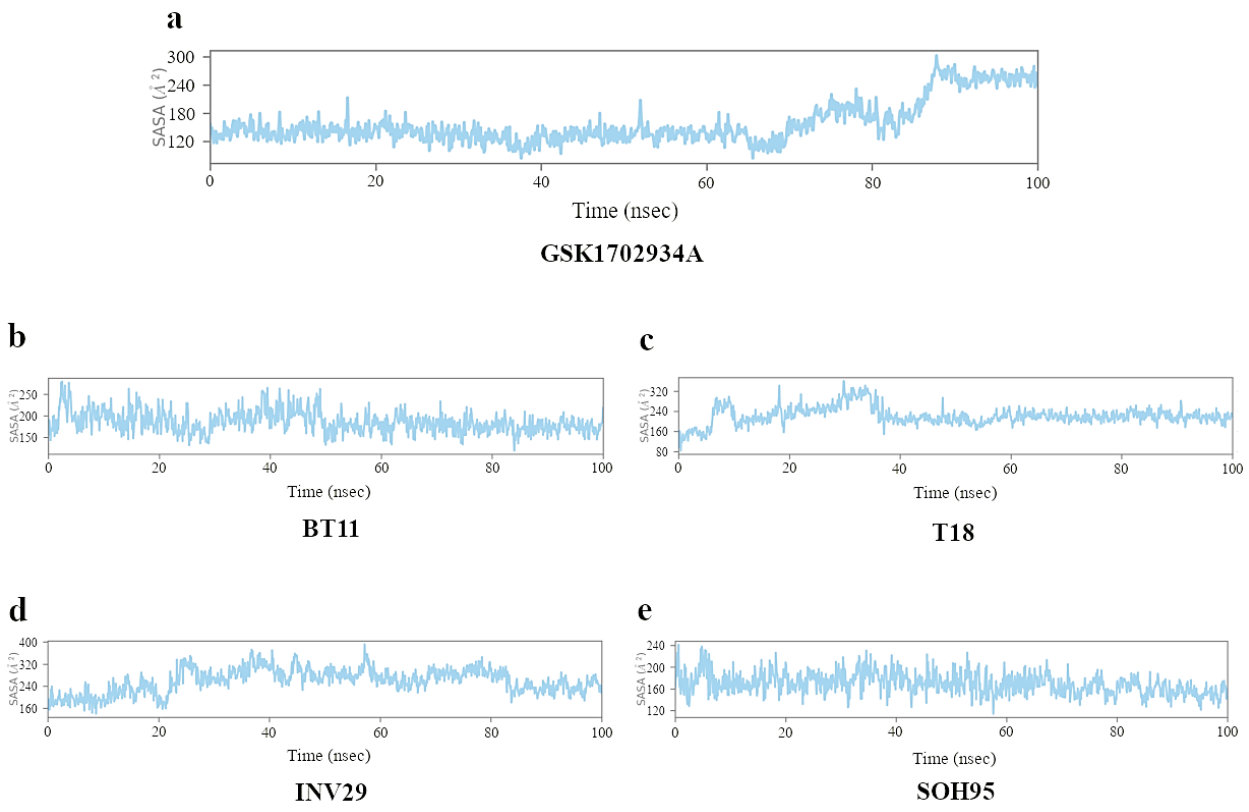


Figura 18. Gráfico SASA a lo largo de la simulación del agonista GSK (**a**) y de los derivados BT11 (**b**), T18 (**c**), INV29 (**d**) y SOH95 (**e**). El derivado BT11 muestra el mejor patrón de flujo de agua, disminuyendo la superficie expuesta al solvente a partir de los 50 ns aproximadamente, mientras que para el agonista GSK, esta aumenta a partir de los 60 ns. Al modificar la estructura de BT11 se vio principalmente un aumento del contacto con agua, a excepción del derivado SOH95, que se mantuvo relativamente invariable o incluso con una leve disminución.

5.2.6 Perfil de torsión del derivado BT11

En la **Figura 19** se presenta el perfil de torsión del ligando BT11, que representa la evolución conformacional de cada enlace rotable a través del tiempo de simulación.

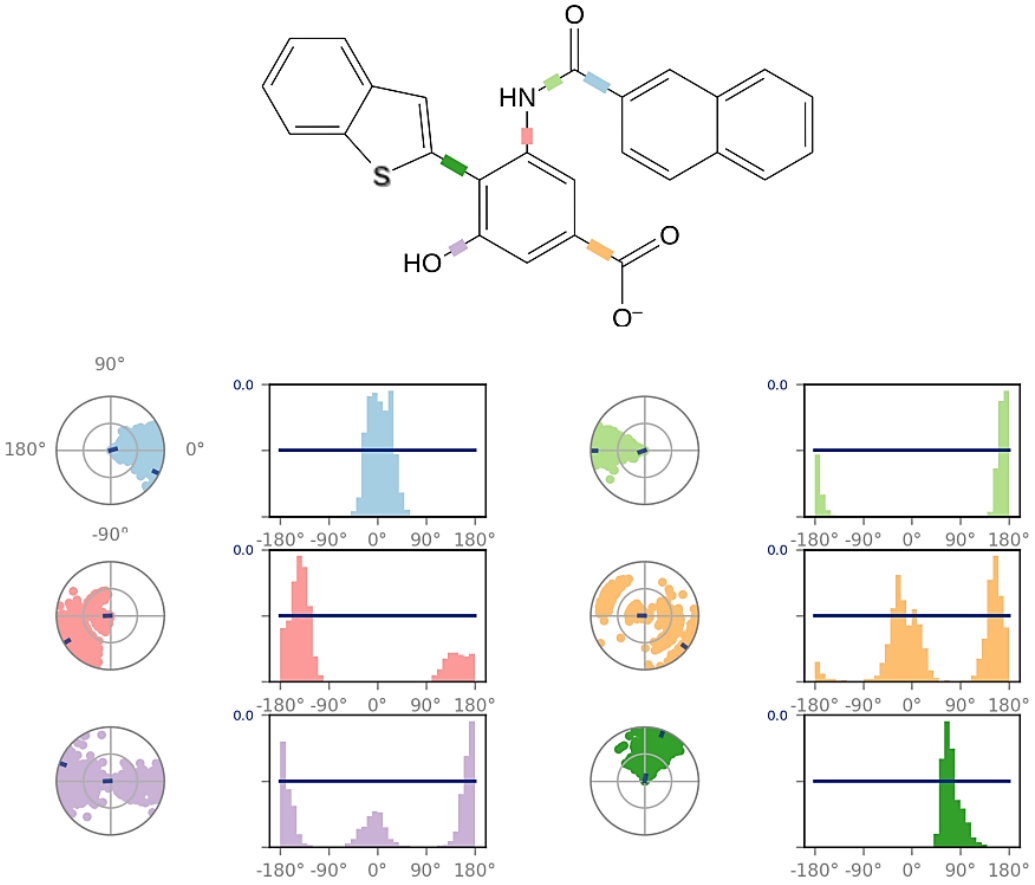


Figura 19. Perfil de torsión durante la simulación del ligando BT11. Los enlaces rotables se muestran coloreados. Los gráficos radiales describen la conformación de torsión en el transcurso de la simulación. Los gráficos de barra muestran la densidad de probabilidad de la torsión. El enlace unido al sistema benzotiofeno (verde oscuro) adopta un ángulo de 90° casi en la totalidad de la simulación, confirmando que la conformación vista en el *docking* es estable.

5.2.7 Cambios en el diámetro del poro del hTRPC6 a través del tiempo de simulación

En la **Figura 20** se presentan los gráficos del diámetro promedio del poro versus el tiempo de simulación para todos los sistemas. Se utilizó como control negativo al sistema sin ligando y como control positivo al sistema con el agonista GSK.

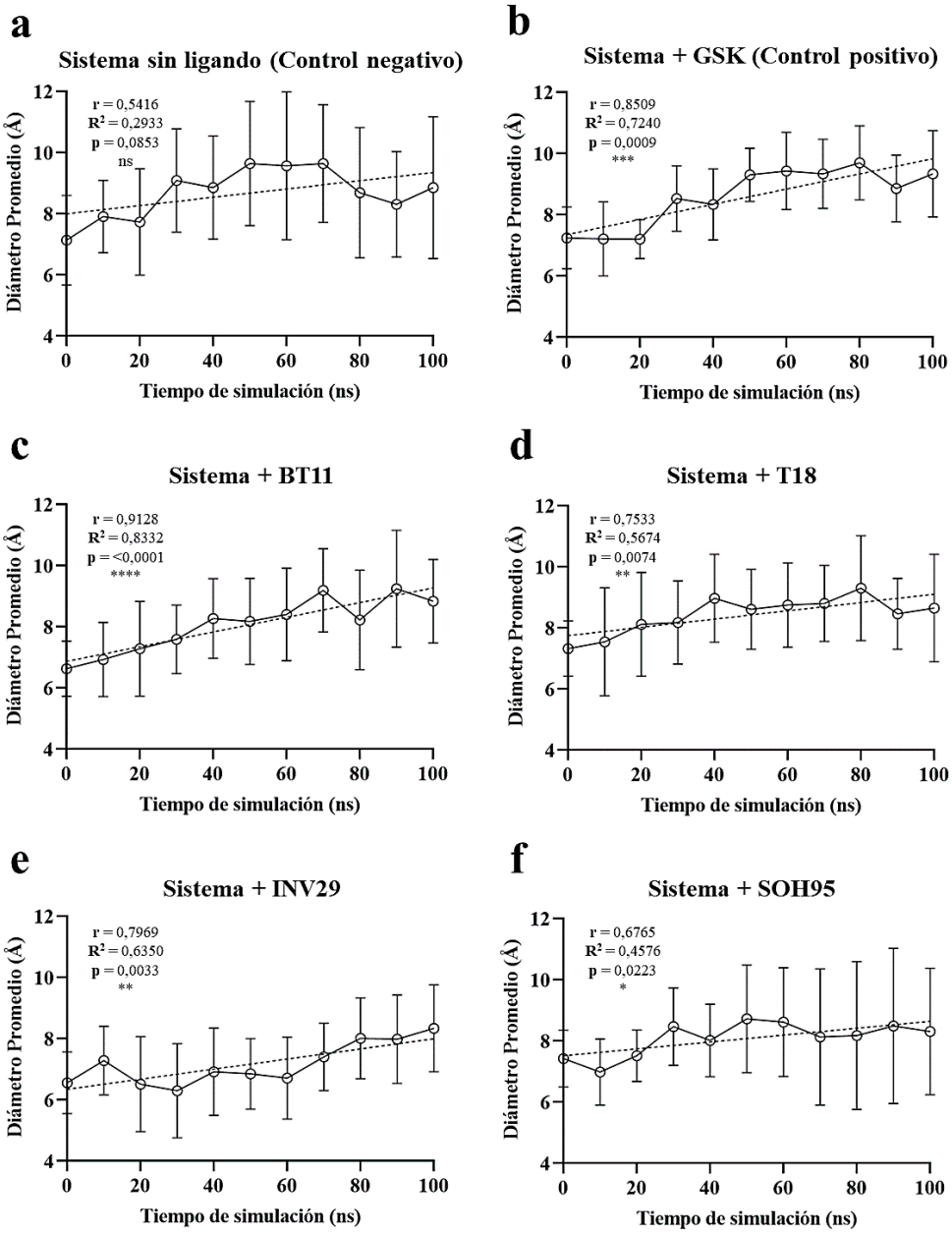


Figura 20. Gráficos del diámetro promedio del poro a través del tiempo de simulación para el sistema sin ligando (**a**), con el agonista GSK (**b**) y con los derivados BT11 (**c**), T18 (**d**), INV29 (**e**) y SOH95 (**f**). Además, se presentan los resultados del análisis de correlación entre ambas variables. Un valor de $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo. El control negativo no posee una correlación estadísticamente significativa, mientras que el compuesto BT11 presenta la correlación con la mayor significancia estadística, siendo incluso superior al agonista GSK, mostrando una tendencia lineal de apertura del poro. Las modificaciones estructurales de este compuesto afectaron negativamente la correlación, aunque sin perderla por completo.

5.3 Cálculos de energía MMGBSA

A continuación, se presentan los resultados de los cálculos de energía de unión MMGBSA para cada uno de los ligandos (**Tabla 2**).

Tabla 2: Resultados de los cálculos de energía MMGBSA para los sistemas con cada uno de los ligandos. El derivado BT11 tuvo una energía comparable a GSK, sin embargo, logró una mayor estabilización puesto que redujo la energía final del sistema. En el caso de los derivados modificados también se vio afectada negativamente su energía, siendo incluso peor que en el estado inicial, exceptuando SOH95, que tuvo una leve estabilización.

	GSK	**BT11**	**T18**	**INV29**	**SOH95**
N° Frame	**MMGBSA dG Bind (kcal/mol)**	**MMGBSA dG Bind (kcal/mol)**	**MMGBSA dG Bind (kcal/mol)**	**MMGBSA dG Bind (kcal/mol)**	**MMGBSA dG Bind (kcal/mol)**
1	-63,06	-48,72	-60,70	-64,05	-52,28
992	-49,57	-73,92	-41,89	-50,78	-54,82
993	-58,62	-66,07	-43,76	-45,95	-54,37
994	-55,75	-61,92	-45,94	-59,65	-57,02
995	-56,36	-73,01	-46,10	-45,96	-55,14
996	-50,28	-70,92	-41,25	-49,34	-53,11
997	-43,71	-68,41	-42,10	-52,25	-53,53
998	-48,91	-76,19	-42,43	-48,94	-54,34
999	-57,33	-69,50	-43,18	-56,68	-55,93
1000	-57,12	-63,17	-43,19	-47,38	-53,57
1001	-53,65	-59,67	-41,45	-57,44	-52,67
Inicial	**-63,06**	**-48,72**	**-60,70**	**-64,05**	**-52,28**
Promedio Final [992-1001]	**-53,13**	**-68,28**	**-43,13**	**-51,44**	**-54,45**

5.4 Análisis Retrosintético

A continuación, se muestran los sintones y sus respectivos equivalentes sintéticos para el compuesto *hit* BT11 (**Figura 21**).

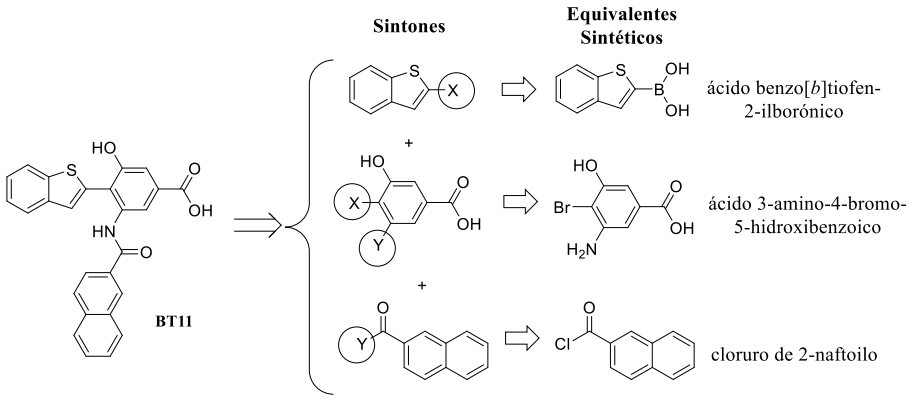


Figura 21. Esquema retrosintético para obtener el compuesto BT11. La estructura se puede descomponer en tres fragmentos importantes (sintones), que corresponden a un benzotiofeno, un ácido benzoico polifuncionalizado y un acilnaftaleno, y sus equivalentes sintéticos son el ácido benzo[*b*]tiofen-2-ilborónico, ácido 3-amino-4-bromo-5-hidroxibenzoico y cloruro de 2-naftoilo, respectivamente. El ácido 3-amino-4-bromo-5-hidroxibenzoico no está disponible comercialmente, pero se puede sintetizar mediante las reacciones clásicas de compuestos aromáticos a partir de un reactivo disponible comercialmente.

Para lograr unir estos 3 fragmentos, es posible comenzar desde el reactivo ácido 4-bromobenzoico, disponible comercialmente, para llegar al equivalente sintético deseado mediante reacciones clásicas de compuestos aromáticos, como se indica en la **Figura 22**.

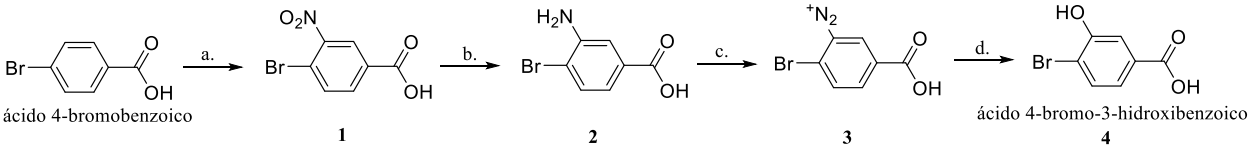
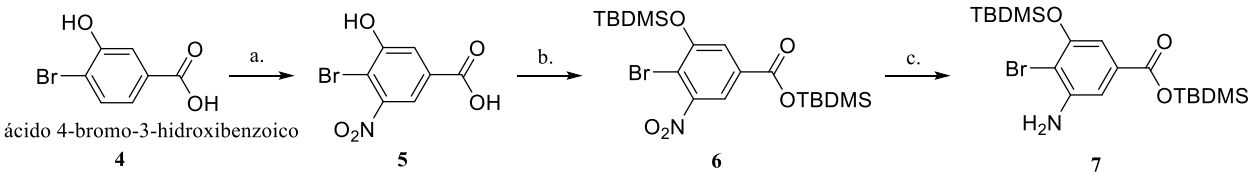


Figura 22. Hidroxilación del compuesto de partida ácido 4-bromobenzoico. Pasos: **a.** HNO_3/H_2SO_4, ta, 3h. **b.** Zn, NH_4Cl, MeOH, 60°C, 2h. **c.** $NaNO_2$, HCl, 0°C, 6h. **d.** $CuSO_4$, H_2O, Cu_2O, ta, 6h. La secuencia consiste en la nitración del compuesto de partida para generar **1**, que es reducido a su respectiva anilina **2**. La anilina es entonces convertida a la sal de diazonio **3**, que finalmente es hidroxilada mediante una reacción de tipo Sandmeyer, para dar el fenol correspondiente **4**.

Una vez obtenido el compuesto **4**, es necesario generar una nueva anilina que pueda reaccionar con el cloruro de 2-naftoilo y así formar el conector amida, previa protección de los grupos hidroxilo y ácido carboxílico. En la **Figura 23** se muestra la ruta planteada.

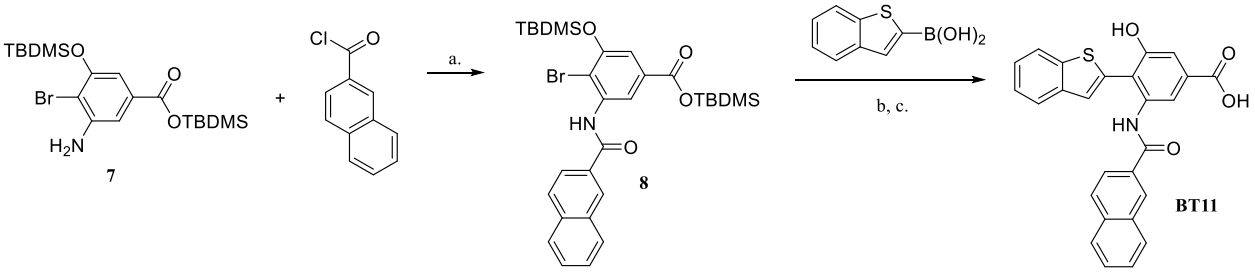


ácido 4-bromo-3-hidroxibenzoico

4 **5** **6** **7**

Figura 23. Protección de los grupos hidroxilo y ácido carboxílico y formación de anilina. Pasos: **a.** HNO_3/H_2SO_4, ta, 3h. **b.** TBDMS-Cl, DMF, imidazol, 50°C, 6h. **c.** H_2, Pd/C, MeOH, ta, 2h. De forma similar a la secuencia anterior, se comienza con una nitración del compuesto **4** en posición meta respecto al ácido carboxílico para dar el compuesto **5**. En este paso, se protegen los grupos hidroxilo y ácido carboxílico con TBDMS-Cl para evitar que interfieran en la acilación y/o posterior reacción de Suzuki, originando el compuesto **6** que finalmente sufrirá la reducción del grupo nitro mediante H_2 en Pd/C, para formar la anilina correspondiente que actuará como nucleófilo en la acilación posterior.

En la última etapa, se procede al acoplamiento de los 3 fragmentos (equivalentes sintéticos) y a la desprotección de los grupos hidroxilos para obtener el compuesto BT11, tal como se muestra en la **Figura 24**.



7 **8**

Figura 24. Acoplamiento de los 3 equivalentes sintéticos para obtener el derivado BT11. Pasos: **a.** K_2CO_3, THF, 50°C, 12h. **b.** $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3, 50°C, 6h. **c.** Bu_4NF, THF, ta, 6h, H_2O. Subsecuentemente, la anilina del compuesto **7** es acilada con cloruro de 2-naftoilo para generar el compuesto acilado **8**, que posteriormente es acoplado al ácido benzo[*b*]tiofen-2-ilborónico mediante una reacción de Suzuki en medio básico. Finalmente, se realiza la desprotección de los grupos hidroxilo y ácido carboxílico para dar el compuesto final **BT11**.

Finalmente, en la **Figura 25** se presenta toda la ruta sintética para obtener el compuesto **BT11**.

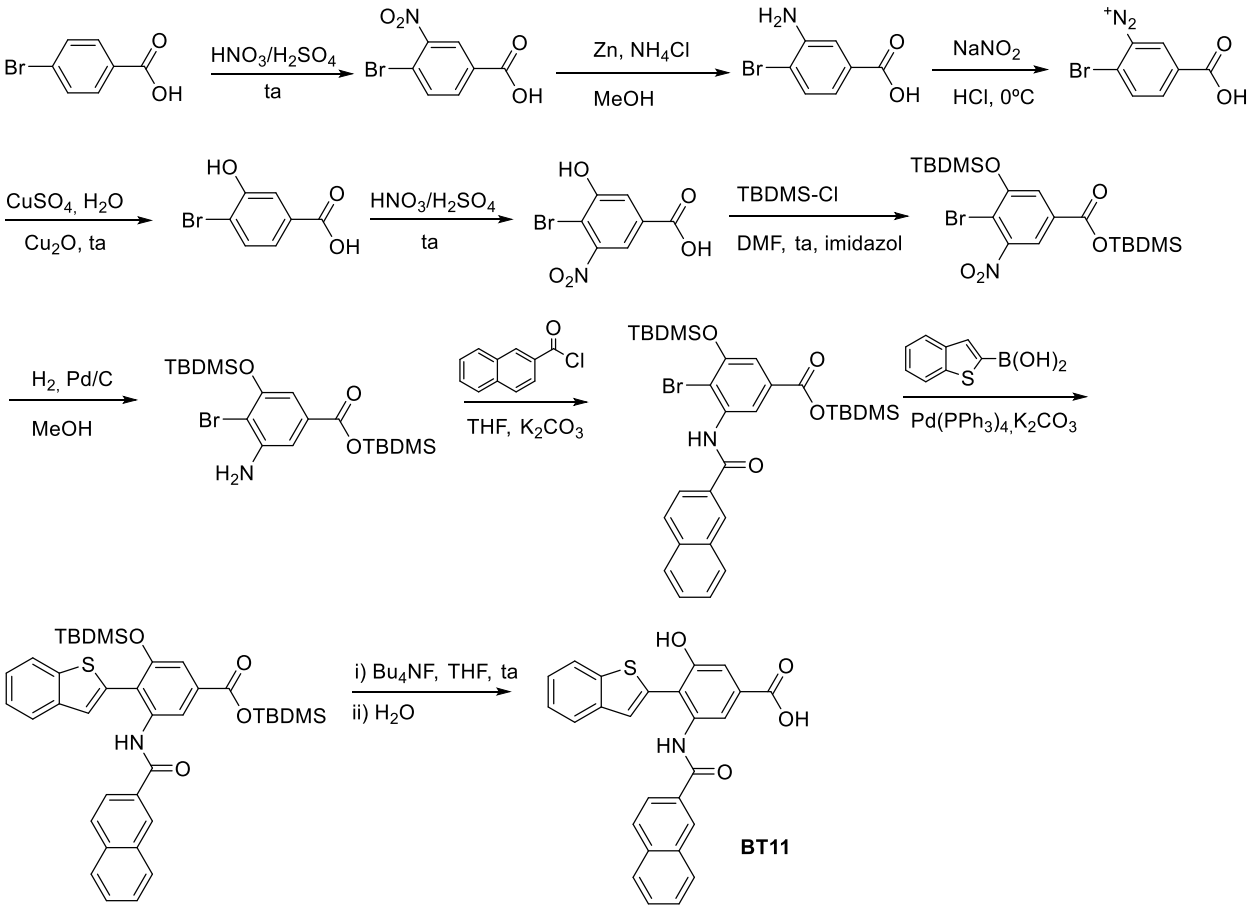
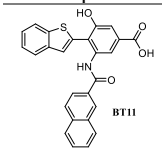
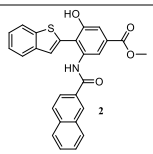
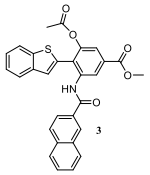
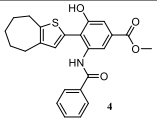
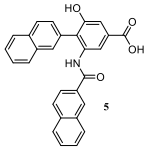
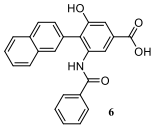


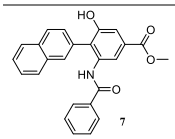
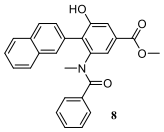
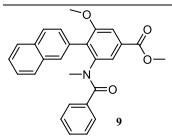
Figura 25. Ruta sintética para obtener el compuesto *hit* **BT11** (ácido 3-(2-naftamido)-4-(benzo[*b*]tiofen-2-il)-5-hidroxibenzoico) a partir del compuesto de partida ácido 4-bromobenzoico.

5.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas

En la **Tabla 3** se presentan las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del *hit* BT11, además de otros derivados probados en la búsqueda de optimizar dichas propiedades sin afectar la actividad biológica.

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas-farmacocinéticas y reglas de Lipinski del *hit* **BT11** y otros derivados planteados como potenciales compuestos optimizados.

	Propiedades Fisicoquímicas-Farmacocinéticas y Reglas de Lipinski							
Propiedad	**MM (g/mol)**	**APH**	**DPH**	**cLogP**	**Solubilidad en agua**	**TPSA (Å^2)**	**NER**	**Modelo ''Huevo Duro''**
Valor deseable [75,77–79]	**≤ 500**	**≤ 10**	**≤ 5**	**≤ 5**	———	**≤ 140** (alta BD oral) **≤ 90** (permeabilidad de BHE)	**≤ 10**	Absorción GI: **Alta** Permeabilidad de BHE: **Si**
Compuesto								
	439,48	4	3	5,01	Pobremente soluble	114,87	5	Absorción GI: Baja Permeabilidad de BHE: No
	453,51	4	2	5,37	Pobremente soluble	103,87	6	Absorción GI: Baja Permeabilidad de BHE: No
	495,55	5	1	5,65	Insoluble	109,94	8	Absorción GI: Baja Permeabilidad de BHE: No
	421,51	4	2	4,79	Pobremente soluble	103,87	6	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: No
	433,45	4	3	4,98	Pobremente soluble	86,63	5	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: No
	383,40	4	3	4,09	Pobremente soluble	86,63	5	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: No

	397,42	4	2	4,52	Pobremente soluble	75,63	6	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: No
	411,45	4	1	4,61	Pobremente soluble	66,84	6	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: No
	425,48	4	1	4,94	Pobremente soluble	55,84	7	Absorción GI: Alta Permeabilidad de BHE: Si

MM: Masa Molar; APH: Número de Aceptores de Puente de Hidrógeno; DPH: Número de Dadores de Puente de Hidrógeno; cLogP: LogP consenso (promedio del LogP medido por los 5 métodos); TPSA: Área de Superficie Polar Topológica (*Topological Polar Surface Area*); NER: Número de Enlaces Rotables.

En la **Figura 26** se presenta el modelo ‘’Huevo-Duro’’ (BOILED-Egg [79]) para los 9 compuestos señalados anteriormente.

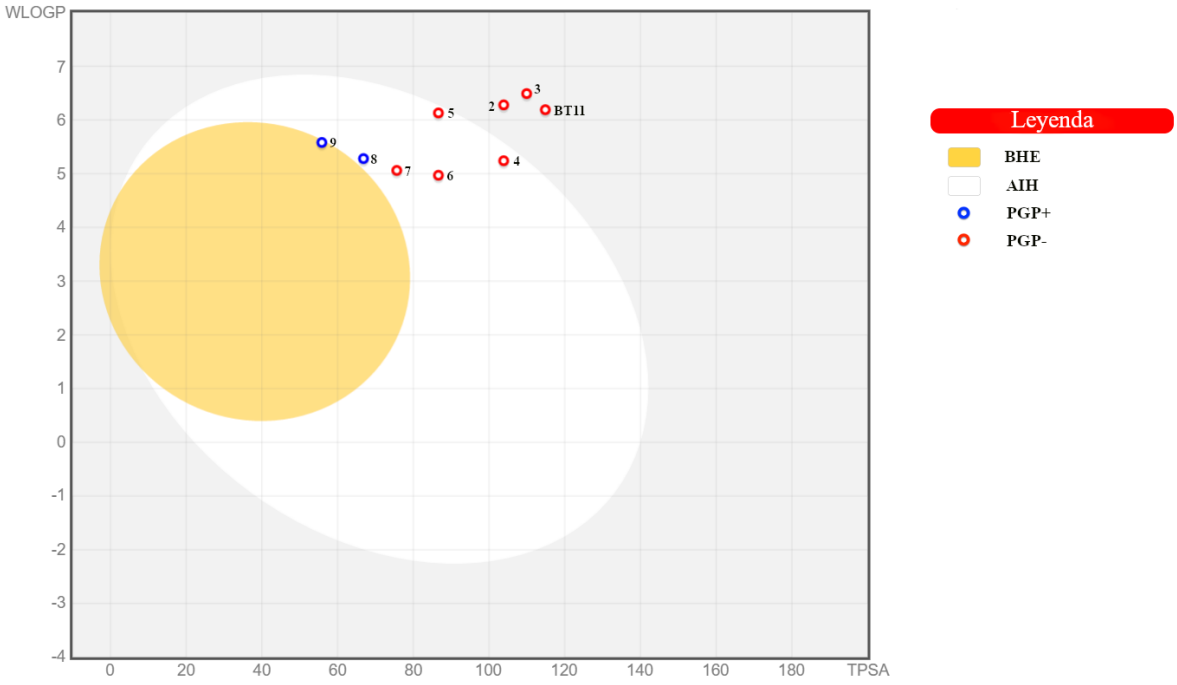


Figura 26. Modelo ‘’Huevo-Duro’’ de absorción intestinal y permeabilidad de BHE para los 9 compuestos. Sólo el compuesto 9 puede permear la BHE, mientras que los compuestos 4 al 9 tienen una alta absorción intestinal. BHE: Barrera Hematoencefálica; AIH: Absorción Intestinal Humana; PGP+: es sustrato de PGP; PGP-: no es sustrato de PGP. **Adaptado desde:** Daina et al. [79].

Por último, se presenta el gráfico de radar para la biodisponibilidad (BD) del compuesto BT11 (**Figura 27**).

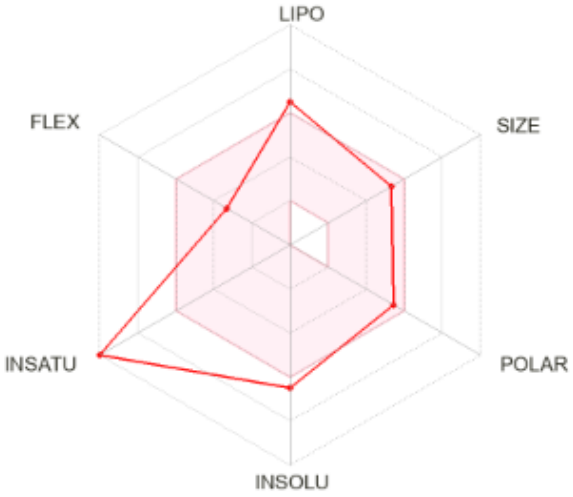


Figura 27. Gráfico de radar para la biodisponibilidad de BT11. El área de color rosa indica el rango de valores óptimos para cada propiedad relacionada a la biodisponibilidad oral. Las propiedades predichas se muestran en líneas rojas. Los valores de lipofilicidad (LIPO), solubilidad (INSOLU) e insaturaciones (INSATU) están por fuera del rango establecido, afectando la biodisponibilidad oral, mientras que los de flexibilidad (FLEX), tamaño (SIZE) y polaridad (POLAR) se encuentran dentro del rango. **Referencia:** Daina et al. [79].

5.6 Predicción de Toxicidad

Tabla 4: Resultados de la predicción de toxicidad de BT11 mediante la plataforma web PreADMET [76].

Prueba	Descripción	Valor
Toxicidad aguda en algas.	Toxicidad aguda en algas.	0.00153585
Prueba de Ames.	La prueba de Ames es un método simple para probar la mutagenicidad de un compuesto. Utiliza varias cepas de la bacteria Salmonella typhimurium que portan mutaciones en genes implicados en la síntesis de histidina, por lo que requieren histidina para crecer. Se prueba la capacidad de los mutágenos para causar el crecimiento en un medio libre de histidina [80–82].	Mutágeno
Carcinogenicidad en ratón.	Bioensayo de carcinogenicidad a 2 años en ratón.	Negativo
Carcinogenicidad en rata.	Bioensayo de carcinogenicidad a 2 años en rata.	Negativo
Toxicidad aguda en dafnia.	Toxicidad aguda en dafnia (crustáceo).	0.00170013
Inhibición de hERG.	Inhibición in vitro del canal hERG.	Alto riesgo
Toxicidad aguda en medaka.	Toxicidad aguda en peces (medaka).	1.11718e-005
Toxicidad aguda en minnow.	Toxicidad aguda en peces (minnow).	8.94975e-005
Prueba de Ames TA100 (+S9).	Resultado de la prueba de Ames *in vitro* en la cepa TA100 (activación metabólica por homogeneizado de hígado de rata).	Negativo
Prueba de Ames TA100 (-S9).	Resultado de la prueba de Ames *in vitro* en la cepa TA100 (sin activación metabólica).	Negativo
Prueba de Ames TA1535 (+S9).	Resultado de la prueba de Ames *in vitro* en la cepa TA1535 (activación metabólica por homogeneizado de hígado de rata).	Negativo
Prueba de Ames TA1535 (-S9).	Resultado de la prueba de Ames *in vitro* en la cepa TA1535 (sin activación metabólica).	Negativo

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Estudios de Acoplamiento Molecular Inducido (*Docking*)

Para evidenciar las posibles interacciones entre el ligando y el sitio activo se realizaron estudios de *docking* utilizando como control al agonista reconocido GSK, siguiendo el protocolo mencionado en la metodología.

En primer lugar, para definir el núcleo estructural utilizado como punto de partida se realizó un *screening* inicial, donde se obtuvo que el compuesto 4-13 tuvo un XP GScore de -9,246 kcal/mol, ubicado entre los mejores, además de adoptar una buena conformación ya que logró anclarse por el A:Trp680 descrito previamente como fundamental para la unión al sitio activo [51,56] y establecer tres *pi-stacking* con A:Phe675, A:Phe679 y B:Tyr705, teniendo una disposición totalmente coplanar que lo ayuda a insertarse dentro de la cavidad (**Figura 9**). Si bien los compuestos de la 5° generación alcanzaron valores menores a -10, esta unión fue poco específica puesto que se establecieron solo interacciones de *pi-stacking* debido al anillo extra y a la pérdida del carbonilo, lo que además aumenta la lipofilia en una forma desfavorable, siendo una molécula poco selectiva capaz de unirse a múltiples dianas biológicas.

Una vez que se observó la conformación espacial del compuesto 4-13 dentro de la cavidad, se midieron las distancias entre los carbonos del benceno y los aminoácidos orientados hacia ellos que estuvieran cercanos en el espacio (**Figura 10**), quedando el carbono en posición 5 a una distancia de 4,44 Å hasta la B:Asn702 y a 4,72 Å hasta el A:Glu672, mientras que el carbono en posición 1 quedó a 6,26 Å de la A:Lys676. Considerando esto, se agregaron diversos grupos funcionales para alcanzar dichos aminoácidos, insertando tanto dadores como aceptores de puentes de hidrógeno en el átomo X, tales como hidroxilo, metoxilo, amina y carbamato, de los cuales el hidroxilo fue el único que logró establecer los dos puentes de hidrógeno con ambos aminoácidos, actuando como dador para el A:Glu672 y como aceptor para el B:Asn702. Posteriormente, se insertó un ácido carboxílico directamente en posición 1, el cual pudo establecer un puente de hidrógeno reforzado por puente salino con la A:Lys676, además de un puente de hidrógeno con el hidroxilo de la B:Tyr705. En los resultados de *docking* también se evidenció que el benceno del sistema benzimidazol quedaba en contacto con el solvente, lo que podría estar afectando el XP GScore puesto que esto no es favorable energéticamente. Buscando evitar el contacto desfavorable

de grupos hidrofóbicos con el agua y así mejorar el puntaje, se probaron derivados con sistemas aromáticos de diferentes polaridades unidos a diversos sustituyentes, principalmente polares, para favorecer su interacción con el agua. Sorprendentemente, se vio una reducción del puntaje al conectar anillos y/o sustituyentes polares, mientras que, a medida que se conectaron anillos con menor polaridad, con sustituyentes apolares o sin sustituyentes, este aumentó considerablemente, lográndose el mayor puntaje al conectar el sistema benzotiofeno para formar el compuesto BT11, a pesar de que la gran mayoría de los compuestos evaluados establecieron las mismas interacciones. Una posible explicación para la mejora considerable del puntaje al conectar un sistema benzotiofeno en dicha posición sería debido a su momento dipolar intermedio de 0,84 D [83], no tan bajo como para sufrir una gran penalización al contactar con el solvente, pero tampoco tan alto como para atraer agua que pueda afectar la unión al sitio activo.

Al comparar las interacciones de BT11 con el agonista GSK se puede ver una diferencia considerable, ya que este último solo presentó el puente de hidrógeno con el A:Trp680 (1,99 Å de distancia) e interacciones hidrofóbicas, con ambos anillos ubicados en los extremos de la molécula en contacto con el solvente (**Figura 12 a** y **b**), mientras que BT11 estableció cuatro puentes de hidrógeno con A:Lys676 (1,97 Å de distancia), A:Trp680 (2,13 Å de distancia), B:Asn702 (1,77 Å de distancia) y B:Tyr705 (1,84 Å de distancia), un puente salino con A:Lys676 (2,98 Å de distancia) y dos *pi-stacking* con A:Phe675 (5,25 Å de distancia) y B:Tyr705 (4,34 Å de distancia), adoptando una conformación similar al compuesto 4-13 pero con el sistema benzotiofeno en un ángulo de 90° respecto al resto de los anillos (**Figura 12 c** y **d**), que se mantuvo en contacto con el solvente, haciendo un efecto de tapón sobre la cavidad. Estos hallazgos resaltan la importancia de tener múltiples anillos aromáticos, un grupo ácido, y dadores y aceptores de puente de hidrógeno en la estructura.

Se realizaron modificaciones estructurales a BT11 con la finalidad de estudiar su impacto en la unión al sitio activo. Al eliminar el benceno que acompaña al tiofeno (T18), si bien se redujo el número de interacciones (se perdió el puente de hidrógeno con A:Lys676 y el *pi-stacking* con A:Phe675), se produjo una leve mejoría en el XP GScore, que alcanzó un valor de -11,515 kcal/mol (**Figura 12 e** y **f**). Esto seguramente se deba al mayor contacto directo entre el tiofeno y el solvente, ya que este tiene un momento dipolar mayor al benceno, lo cual resulta en una mayor estabilidad energética. Al invertir la posición de los sistemas con dos anillos aromáticos (INV29), se observó

una ligera disminución en el puntaje, ya que se eliminó el *pi-stacking* entre el ácido benzoico y la B:Tyr705, además, se incrementó el contacto desfavorable entre el naftaleno y el solvente, resultando en un puntaje de -11,226 kcal/mol (**Figura 12 g** y **h**). Sin embargo, se mantuvo la interacción por *pi-stacking* con los anillos conectados a la amida, sugiriendo que, en esta posición, el intercambio entre un isóstero u otro no afectaría mayormente la actividad. Por último, al eliminar el grupo hidroxilo en posición 5 (SOH95) empeoró significativamente el puntaje, llegando a -9,871 kcal/mol. Esto se debió a la pérdida de las interacciones de puente de hidrógeno con A:Glu672 y B:Asn702 y del *pi-stacking* con B:Tyr705 (**Figura 12 i** y **j**), confirmando que la presencia de este grupo hidroxilo aumenta considerablemente la afinidad y puede repercutir en otras interacciones importantes.

Todos los derivados evaluados adoptaron una conformación similar a BT11 dentro de la cavidad, con el sistema de anillos aromáticos conectado al ácido benzoico en un ángulo de aproximadamente 90° respecto al resto de los anillos, los cuales adoptaron una disposición coplanar insertándose en la cavidad formada por ambas cadenas.

6.2 Estudios de Dinámica Molecular

Para validar los resultados vistos en los estudios de *docking* y determinar si BT11 podría calificar como un potencial *hit* al formar un complejo estable con el canal TRPC6, se ejecutaron estudios de dinámica molecular con el canal inmerso en un sistema que simuló las condiciones fisiológicas, según el protocolo mencionado en la metodología.

El compuesto BT11 permaneció estable en el sitio activo formado por las cadenas A y B durante toda la simulación, en una conformación similar a la vista en el *docking*, con el benzotiofeno en un ángulo de 90° respecto al resto de los anillos y el grupo ácido orientado hacia el poro (**Figura 13**). Al final de la simulación se observó una ligera deformación normal del canal en comparación a su estado inicial, atribuida al movimiento molecular inducido en estos estudios. Esta deformación resultó en una aparente contracción de las cadenas, no obstante, no se observó un cambio significativo en su posición ni en la posición de la membrana, lo que indica que esta última se logró estabilizar, probablemente debido a su interacción con los aminoácidos hidrofóbicos presentes en esa región.

El valor de RMSD de la proteína indica la diferencia promedio de las posiciones de las cadenas principales de una proteína desde su conformación estructural inicial (de referencia) hasta su

posición final, por ende, la estabilidad de su conformación se puede determinar por la medición de las desviaciones producidas durante la simulación. Mientras menor sea la desviación, mayor estabilidad tendrá la estructura [84]. Según la suite Maestro Schrödinger, es importante que el valor de RMSD de la proteína se estabilice alrededor de un valor fijo, formando una meseta, lo que indica que el sistema ha alcanzado un equilibrio favorable y permite validar los resultados, además, señala que un RMSD de entre 1-3 Å es aceptable para proteínas globulares pequeñas. Sin embargo, el canal TRPC6 no se clasifica dentro de esta categoría, ya que es una proteína transmembrana de mayor tamaño, compuesta por 4 cadenas de 931 aminoácidos cada una [29]. Por lo tanto, es de esperar que el canal TRPC6 experimente una desviación mayor a este rango. Todos los valores de RMSD de la proteína (**Figura 14 línea azul**), tanto para GSK (**Figura 14a**) como para cada derivado (**Figura 14b-e**), exhibieron una adecuada estabilización a partir de los 10 ns, alcanzando una meseta que se mantuvo alrededor de un RMSD de aproximadamente de 3,2 Å, en concordancia con lo señalado anteriormente, lo cual indica que el sistema logró alcanzar un equilibrio.

Por otra parte, el valor de RMSD del ligando (**Figura 14 línea roja**) indica qué tan estable es el ligando en el sitio activo de la proteína, midiendo la desviación de los átomos pesados respecto a su posición inicial durante la simulación. Si el valor observado es mucho mayor al RMSD de la proteína, entonces es probable que el ligando se haya separado del sitio activo. El compuesto BT11 en complejo con TRPC6 (**Figura 14b**), mostró una menor fluctuación de RMSD del ligando en comparación al complejo GSK-TRPC6 (**Figura 14a**). La escala del eje va de 0,6 a 4,8 Å para BT11, mientras que para GSK es mucho mayor, estando en un rango de 0,8 a 7,2 Å. Además, GSK presentó una fluctuación drástica de RMSD cercano a los 60 ns, llegando a un valor de 5,6 Å desde el cual continuó subiendo hasta llegar a un valor de casi el doble del RMSD de la proteína, lo que indica que este se separó del sitio activo. Esto indica que BT11 se mantuvo más estable en el sitio activo en comparación con GSK. El compuesto modificado T18 (**Figura 14c**) experimentó la mayor fluctuación de RMSD del ligando, con una escala que va de 1,5 a 12 Å. A los 10 ns sufrió un aumento drástico hasta 9 Å, seguido de un incremento gradual que llegó a un máximo de 11 Å, que se mantuvo desde los 40 hasta los 80 ns, para luego disminuir hasta un RMSD de 8 Å. Estos resultados sugieren que T18 se separó considerablemente del sitio activo, indicando que la eliminación del benceno acompañante del tiofeno fue el cambio estructural que más afectó la unión del ligando al sitio activo. Es interesante destacar que, a pesar de que según los estudios de *docking* esta modificación logró incluso mejorar el puntaje, eso no se vio reflejado en el comportamiento

durante la dinámica, indicando que no existe necesariamente una correlación entre un buen XP GScore y una adecuada estabilidad del ligando en el sitio activo a lo largo del tiempo, lo que tiene sentido dado que en los estudios de dinámica pueden influir otros factores del sistema, como la presencia del solvente y los iones en solución, los cuales pueden interaccionar tanto con el ligando como con la proteína, afectando su estabilidad. El segundo compuesto modificado más afectado fue INV29 (**Figura 14d**), con un eje de RMSD entre 1 a 9 Å. Este compuesto sufrió dos fluctuaciones drásticas entre los 20 y 40 ns hasta un máximo de 8,5 Å, seguido por una reducción escalonada a los 40, 60 y 80 ns, llegando a valores de RMSD de 5, 4 y 3 Å, respectivamente. Aunque inicialmente se observó un aumento en el RMSD, posteriormente tuvo una reducción hasta llegar a un valor estable de 3 Å, el cual se mantuvo hasta el final de la simulación. Este comportamiento indica que el complejo finalmente logró estabilizarse al adoptar una conformación adecuada dentro del sitio activo. Para confirmar esto, se podría realizar una simulación de mayor duración, por ejemplo, extendiéndola hasta 200 ns. Los resultados obtenidos sugieren que el reemplazo isostérico del sistema aromático conectado al ácido benzoico, cambiando el benzotiofeno por un naftaleno, no afectaría significativamente la actividad, en lugar de ello, solo retrasaría el período de estabilización del complejo, lo que tiene sentido ya que solo se reemplazó un grupo apolar por otro de polaridad similar, con pequeñas diferencias electrónicas y de tamaño. Esto hace factible la alternativa de diseñar un derivado con un naftaleno en vez de un benzotiofeno, que, debido a su mayor disponibilidad comercial, podría simplificar la síntesis del compuesto y permitir obtener una mayor diversidad de derivados con distintos sustituyentes en esa posición. A su vez, posibilitaría la realización de estudios posteriores para identificar el equilibrio óptimo entre lipofilicidad e hidrofilicidad para obtener una buena afinidad, por ejemplo, mediante estudios de QSAR (por las siglas en inglés para Relación Estructura-Actividad Cuantitativa). Por último, el compuesto SOH95 (**Figura 14e**) fue el menos afectado por las modificaciones estructurales, mostrando una escala de RMSD entre 0,5 y 4,0 Å y una estabilidad constante a lo largo de la simulación. A los 30 ns, alcanzó una estabilidad con un valor promedio de RMSD cercano a 2 Å, el cual se mantuvo hasta finalizar la simulación, siendo incluso menor que el obtenido por el compuesto *hit* BT11. Esto sugiere que, si bien la eliminación del grupo hidroxilo en posición 5 disminuye la afinidad, este grupo no sería esencial para la actividad ya que su eliminación no es suficiente para afectar la estabilidad del complejo ligando-proteína.

Al analizar los contactos proteína-ligando durante toda la simulación (**Figura 15**), podemos apreciar que GSK (**Figura 15a**) solo estableció interacciones hidrofóbicas (barras violeta) con el sitio activo, mediadas principalmente por A:Phe675 y A:Phe679, que permanecieron sobre un 80% del tiempo de simulación, mientras que BT11 (**Figura 15b**) mostró un mejor perfil de interacciones al ser estabilizado por puentes de hidrógeno, interacciones iónicas (o puentes salinos) e hidrofóbicas (barras verde, magenta y violeta, respectivamente), mediante todos los residuos que componen el sitio activo según la literatura, excepto la B:Val710. Cabe destacar que los contactos proteína-ligando del agonista GSK vistos en este estudio difieren de los presentados por Yang et al. [56], donde además de los contactos hidrofóbicos antes mencionados, se establecieron interacciones hidrofóbicas con A:Lys676, B:Lys698 y B:Tyr705, así como puentes de hidrógeno con A:Trp680 y B:Asn702, que se mantuvieron durante aproximadamente el 80% del tiempo de simulación (**Anexo 4**). Estas diferencias pueden atribuirse principalmente al uso de diferentes campos de fuerza y condiciones de simulación. En primer lugar, ellos utilizaron el campo de fuerza OPLS_2005, el cual se ha asociado con un mayor porcentaje de error en la predicción de la unión proteína-ligando en comparación con el campo de fuerza OPLS3e usado en este estudio [64]. Además, emplearon modelos diferentes, con una membrana POPC a 300 K y un medio acuoso SPC, que tiene un ángulo de enlace HOH de 109,47° que le confiere propiedades estructurales y termodinámicas más lejanas a la realidad en comparación al modelo acuoso TIP3P, cuyo ángulo de 104,52° consigue una geometría molecular más cercana a la vista experimentalmente [85,86]. Esto sumado a una temperatura de 300 K, diferente a los 310 K usados para simular la temperatura fisiológica.

De todos modos, BT11 (**Figura 15b**) logró establecer un mejor perfil de interacciones que incluso aquel reportado anteriormente para GSK (**Anexo 4**), ya que logró interaccionar significativamente con los 3 residuos de lisina presentes, A:Lys676, B:Lys689 y B:Lys698, durante el 100%, 50% y 70% del tiempo de simulación, respectivamente (sin considerar interacciones mediadas por agua). Interesantemente, se formó una interacción con B:Lys689, que no estaba descrita previamente como parte del sitio activo para agonistas, pero que sí tuvo una breve interacción en una fracción menor al 20% del tiempo con el agonista M085 en un estudio previo [56]. Además, BT11 estableció una interacción significativa con el A:Trp680, que entre el puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas sumaron una permanencia de casi un 90% del tiempo. Esta interacción es crucial en el anclaje al sitio activo y su mutación puede eliminar casi por completo la actividad del canal en

presencia de un agonista [51]. Asimismo, formó puentes de hidrógeno con A:Glu672 y B:Asn702 que permanecieron un 15 y 20% del tiempo, respectivamente, siendo la interacción con B:Asn702 más crítica para la actividad biológica, puesto que su mutación también eliminó casi por completo la actividad del canal en presencia de un agonista, mientras que una mutación en el A:Glu672 produjo una reducción significativa de la afinidad del agonista en el sitio activo, aumentando 35 veces su EC_{50} [51]. Por último, BT11 también fue fijado en la cavidad por interacciones hidrofóbicas que perduraron entre un 50% y 90% del tiempo. El compuesto modificado T18 (**Figura 15c**) perdió casi la totalidad de las interacciones hidrofílicas que logró BT11. Solo se formaron puentes de hidrógeno con A:Lys676 y B:Asn702 que perduraron aproximadamente el 15% del tiempo, y un puente salino con A:Glu672 que se mantuvo solo el 10% del tiempo. Si bien T18 mantuvo todas las interacciones hidrofóbicas, su duración fue significativamente menor. Esto sugiere que la presencia de ambos anillos aromáticos unidos al ácido benzoico podría ser esencial, ya que al solo mantener uno se produjo una pérdida significativa de las interacciones, seguramente por desplazamiento del ligando fuera del sitio activo. El compuesto INV29 (**Figura 15d**) conservó gran parte de las interacciones, pero estas sufrieron un cambio negativo en su fracción de tiempo de permanencia. Las interacciones más afectadas fueron los puentes de hidrógeno con A:Trp680 y B:Lys689, los cuales se perdieron casi por completo, mientras que las interacciones hidrofílicas con A:Lys676, B:Lys698 y B:Asn702 sufrieron una reducción menor. Por otro lado, las interacciones con A:Glu672 aumentaron levemente su fracción de permanencia. Finalmente, el compuesto SOH95 (**Figura 15e**) retuvo las interacciones con las lisinas más cercanas en la cavidad (A:Lys676 y B:Lys698) y todas las interacciones hidrofóbicas en una fracción de tiempo cercana al 100% del tiempo para la mayoría de estas. Esto explica la gran estabilidad en el sitio activo vista en los gráficos de RMSD, aunque, como era de esperarse según los estudios de *docking*, se perdieron las interacciones con el A:Glu672 y B:Asn702 que eran establecidas por el hidroxilo en posición 5. Sorprendentemente, esto también afectó la interacción con el A:Trp680, ya que se perdió el puente de hidrógeno, y solo se formó una interacción poco específica mediada por agua. A pesar de esto, la pérdida de estas interacciones no fue suficiente para desplazar al ligando del sitio activo, lo que sugiere que el hidroxilo no es esencial para la actividad, sino que más bien afecta la afinidad del compuesto en la cavidad.

Al analizar los contactos ligando-proteína (**Figura 17**), se observó que GSK (**Figura 17a**) estableció un *pi-stacking* mediante el benceno que acompaña a la benzoimidazolona, con una

permanencia del 50% del tiempo, mientras que BT11 (**Figura 17b**) generó dos interacciones de *pi-stacking* que perduraron un mayor tiempo, a través de ambos anillos del naftaleno que se insertó en forma coplanar en la cavidad. Además, se confirmó que las interacciones con las lisinas estaban mediadas por el carboxilato en posición 1, con un tiempo de permanencia significativo (mayor al 30%), y que el oxígeno carbonílico del ligando actuó como aceptor de puente de hidrógeno para el A:Trp680. Sin embargo, las interacciones formadas por el hidroxilo en posición 5 no aparecen en la imagen, ya que cada una de ellas tuvo una permanencia inferior al 30% del tiempo, pero si se suman, resultan en una permanencia del 35% del tiempo, considerada significativa. También es importante destacar que, en el compuesto BT11, el sistema benzotiofeno estuvo considerablemente expuesto al solvente y no estableció ninguna interacción significativa. El compuesto T18 (**Figura 17c**) conservó únicamente dos interacciones de *pi-stacking* con el naftaleno, y a diferencia del benzotiofeno en BT11, el tiofeno no estuvo expuesto al solvente, lo que podría indicar que este logró hacer ciertas interacciones (con un tiempo de permanencia menor al 30%) que desplazaron a las moléculas de agua, evitando contactar con ellas. Dado que no hubo interacciones significativas mediadas por agua, es más probable que el ligando haya salido parcialmente del sitio activo en lugar de que el agua haya ingresado al mismo. Esta pequeña diferencia tuvo una gran repercusión en el resto de las interacciones, ya que la región del ácido benzoico se alejó lo suficiente como para estar fuera del alcance de los residuos que componen el sitio activo, quedando anclado solamente por el naftaleno. En la dinámica de los compuestos INV29 (**Figura 17d**) y SOH95 (**Figura 17e**) hubo una entrada de moléculas de agua (mucho mayor en SOH95), que establecieron interacciones en el sitio activo, afectando principalmente al puente de hidrógeno con A:Trp680. Sin embargo, estas interacciones no fueron lo suficientemente fuertes como para eliminar las interacciones con las lisinas y, por ende, desplazar al ligando del sitio activo, como ocurrió con el compuesto T18. Nótese que en el caso de INV29, es el naftaleno el que queda expuesto al solvente, desempeñando una función similar a la del benzotiofeno en BT11. Por último, el compuesto SOH95 estableció interacciones con A:Lys676 y B:Lys698 que permanecieron el 99% y 89% del tiempo, respectivamente, Estas interacciones fueron clave para mantener el compuesto anclado en el sitio activo. Lo anterior también explica la diferencia vista en los contactos totales (**Figura 16**), donde GSK (**Figura 16a**) tuvo una escala de 0 a 6 contactos y un promedio de 4, mientras que BT11 (**Figura 16b**) tuvo una escala de 4 a 16 y un promedio de 10, que se mantuvo estable. T18 (**Figura 16c**) sufrió un marcado descenso en los contactos totales, comenzando en 10 contactos hasta llegar

a 4 contactos a los 35 ns, lo que coincide con el valor máximo de RMSD del ligando visto a ese tiempo (**Figura 14c**). Tanto INV29 (**Figura 16d**) como SOH95 (**Figura 16e**) tuvieron un promedio de 8 contactos, sin embargo, INV29 sufrió un descenso inicial hasta 4 contactos a los 40 ns, seguido de un aumento gradual hasta recuperar los 8 contactos al final de la simulación. Esto es consistente con el descenso gradual del RMSD del ligando (**Figura 14d**). Por otro lado, SOH95 mantuvo 8 contactos de forma estable durante toda la simulación, siguiendo la misma tendencia vista en el RMSD del ligando (**Figura 14e**). Todos los resultados son consistentes con los valores vistos de RMSD del ligando, ya que mientras menores fueron las interacciones establecidas y los contactos totales, mayor fue la desviación del RMSD del ligando respecto a su conformación inicial, y viceversa.

En la búsqueda de posibles motivos que expliquen las fluctuaciones de RMSD vistas y, por consiguiente, la pérdida de las interacciones, se analizaron los gráficos del área superficial accesible al solvente (SASA) del ligando (**Figura 18**). El agonista GSK (**Figura 18a**) sufrió un incremento significativo en el SASA a partir de los 60 ns, alcanzando un valor de 240 $Å^2$. Esto indica que hubo una penetración de agua dentro de la cavidad, lo cual es consistente con el aumento del RMSD del ligando al mismo tiempo, mientras que, por el contrario, BT11 (**Figura 18b**) tuvo una disminución del SASA a partir de 50 ns, alcanzando un valor de 180 $Å^2$, el cual se mantuvo estable hasta el final de la simulación sugiriendo que hubo un desplazamiento de las moléculas de agua del sitio activo, lo que también fue consistente con la estabilización del RMSD del ligando vista al mismo tiempo de simulación. El compuesto T18 (**Figura 18c**), que tuvo un incremento casi instantáneo de su RMSD del ligando hasta un máximo a los 40 ns, al mismo tiempo tuvo un aumento del SASA hasta un máximo de 320 $Å^2$ cercano a ese tiempo, a partir del cual se estabilizó en 200 $Å^2$ hasta el final. Sin embargo, considerando el alto valor de RMSD del ligando, es muy probable que el SASA se haya estabilizado posteriormente al desplazamiento del ligando del sitio activo ocurrido a los 40 ns, una vez que este se encontraba fuera de la cavidad. INV29 (**Figura 18d**) tuvo un aumento gradual del SASA hasta un máximo de 320 $Å^2$ a los 45 ns, momento en el cual comenzó a sufrir una caída escalonada a los 45, 55 y 85 ns hasta llegar a 240 $Å^2$, consistente con la disminución del RMSD del ligando. Esto sugiere que el ligando se logró estabilizar en el sitio activo al desplazar a las moléculas de agua. Por último, SOH95 (**Figura 18e**) mantuvo un SASA relativamente estable entre 160 y 200 $Å^2$, teniendo un promedio más bajo que BT11, lo que era de esperarse al carecer del grupo polar hidroxilo capaz de atraer agua. De hecho, al observar

sus contactos ligando-proteína (**Figura 17e**) se puede apreciar una disminución del contacto con el solvente en la región del ácido benzoico en comparación a BT11, aunque esto tendría un efecto desfavorable ya que las moléculas de agua penetraron por la región del conector carbonílico y el ácido carboxílico, contraria a la posición del hidroxilo en BT11. Por lo tanto, el grupo hidroxilo además de aumentar la afinidad por el sitio activo, ejercería un efecto atractor de agua que impediría su penetrancia hacia el interior de la cavidad, evitando su posicionamiento entre el conector carbonílico y el A:Trp680.

En conjunto, estos resultados indican que la inserción del grupo ácido en esa posición fue clave puesto que logró establecer interacciones con las 3 lisinas que formaban parte del sitio activo, las cuales, debido a su alta capacidad rotacional, fueron capaces de alcanzar esa posición y fijar fuertemente la molécula al sitio activo, a pesar de que las otras interacciones se perdieran. También reflejan la importancia del sistema biaromático (benzotiofeno) unido directamente al ácido benzoico, seguramente al ejercer un efecto protector ante la entrada de agua al sitio activo, actuando como un tapón hidrofóbico. Esto mejoró las interacciones al interior de la cavidad, a pesar de que no haya establecido ninguna interacción dentro de la misma, siendo fundamental la adopción de un ángulo cercano a 90° de dicho sistema visto en el perfil de torsión (**Figura 19**) y en los estudios de *docking* (**Figura 12**), lo que genera una mayor cobertura sobre la cavidad comparado a que si este hubiera adoptado una conformación coplanar, similar al resto de los anillos. Además, resaltan el valor de la presencia de los anillos aromáticos en el interior de la cavidad, tanto del ácido benzoico como del sistema conectado a la amida, ya que debido a la gran presencia de residuos apolares y aromáticos capaces de establecer interacciones hidrófobicas y de *pi-stacking*, logró anclar el ligando en el sitio activo. Aunque, aparentemente, la presencia de ambos anillos no sea esencial ya que SOH95 logró interaccionar con solo uno de los anillos, abriendo la posibilidad de conectar diversos sustituyentes en esa posición en la búsqueda de obtener el mejor balance lipofilicidad/hidrofilicidad de dicha región. El conector carbonílico también es fundamental en el anclaje al centro de la cavidad al orientarse hacia el A:Trp680, donde también se podrían probar otros conectores similares, como por ejemplo, un grupo éster, cetona o sulfonamida, aunque debido a las propiedades peculiares del enlace C-N de la amida producto de su resonancia (con características de enlace doble, gran fuerza, sin libre rotación, a una distancia y ángulo característicos), es probable que esta sea la mejor opción para establecer la interacción. Por último, el grupo hidroxilo en posición 5 permite obtener una mayor afinidad debido a sus interacciones

con A:Glu672 y B:Asn702, además de actuar como atrayente de agua evitando su paso hacia el interior de la cavidad, disminuyendo la probabilidad de que esta desplace al ligando fuera del sitio activo. Sin embargo, este no sería esencial para la actividad puesto que el grupo ácido y los anillos aromáticos serían suficientes para lograr estabilizar al ligando.

En base a los resultados de dinámica molecular y estudios de *docking*, se planteó una relación estructura-actividad (REA) para la obtención de nuevos ligandos con actividad agonista del canal TRPC6 (**Figura 28**).

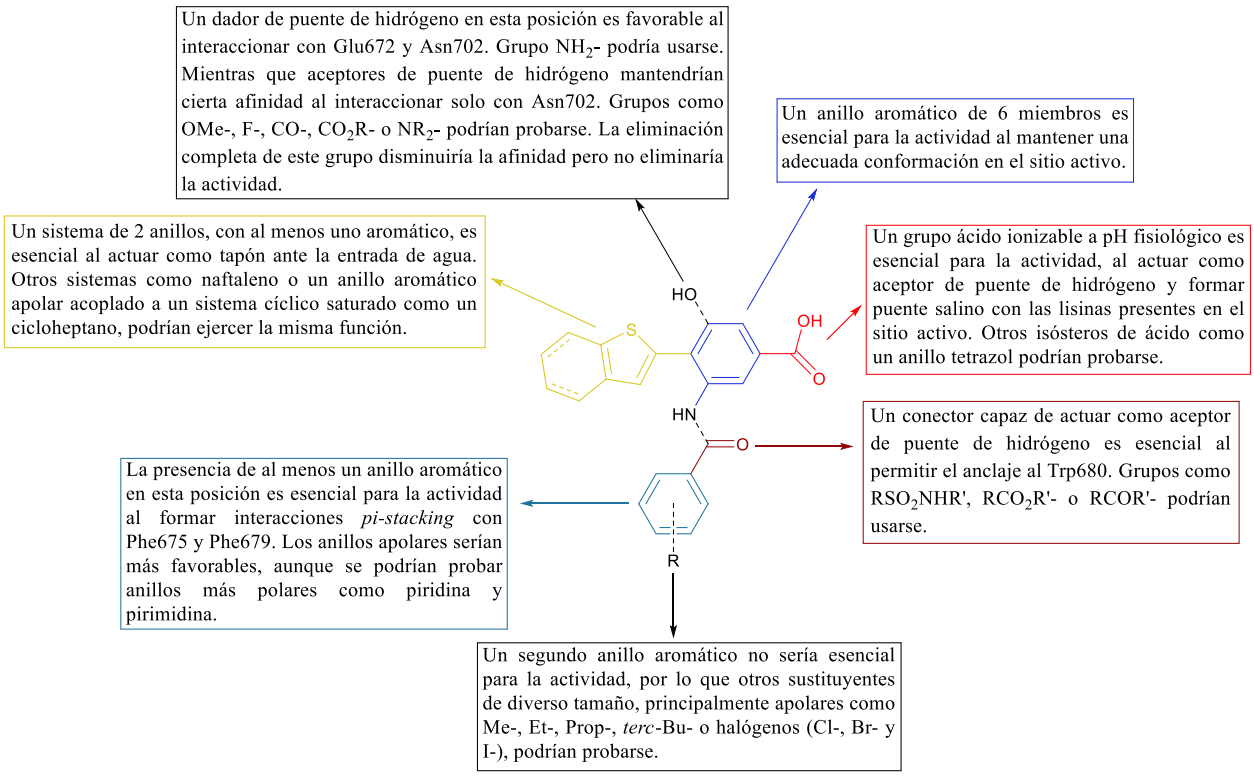


Figura 28. Relación Estructura-Actividad (REA) de agonistas del canal hTRPC6 derivado de los estudios de docking y dinámica molecular. Se resaltan en colores aquellos grupos que forman parte del farmacóforo esencial para la actividad. Los enlaces segmentados señalan las regiones que se pueden modificar sin perder la actividad.

Para determinar si el comportamiento favorable de BT11 visto por los estudios de dinámica molecular se tradujo en una actividad agonista, investigamos el efecto de cada compuesto sobre el diámetro del poro de TRPC6 (**Figura 20**), siguiendo el protocolo señalado en la metodología. Como era de esperarse, el sistema libre de ligando (**Figura 20a**) no tuvo una correlación significativa entre la apertura del poro y el tiempo de simulación ($p = 0{,}0853$), siguiendo un comportamiento no lineal ($R^2 = 0{,}2933$). Esto sugiere que no hubo un estímulo que lograra

estabilizar y mantener la tendencia hacia la apertura del canal, mientras que, por el contrario, GSK (**Figura 20b**) sí logró una apertura significativa durante el tiempo de simulación (p = 0,0009) con una buena linealidad (R^2 = 0,7240). Interesantemente, BT11 (**Figura 20c**) tuvo un mejor desempeño al estabilizar y mantener la tendencia gradual hacia la apertura del canal, con una correlación considerablemente significativa entre el tiempo de simulación y el diámetro del poro (p = <0,0001), y una excelente linealidad (R^2 = 0,8332), siendo incluso superior a los resultados obtenidos con el agonista GSK.

Con la finalidad de evidenciar si el peor comportamiento visto en la dinámica de los derivados tuvo un efecto negativo en la capacidad agonista, se estudió también el efecto de cada uno en la apertura del poro. Todos los derivados lograron una correlación significativa entre la apertura del poro y el tiempo de simulación, aunque con una significancia y linealidad considerablemente menor que BT11, siendo el más perjudicado el compuesto SOH95 (**Figura 20f**) que tuvo la peor linealidad (R^2 = 0,4576) y significancia (p = 0,0223) entre los ligandos, posiblemente asociado a la gran cantidad de agua que logró penetrar en el sitio activo, ya que a pesar de que estas establecieron un gran número de interacciones, es posible que no hayan sido lo suficientemente fuertes energéticamente como para inducir un cambio conformacional en la proteína que lograra expandir el poro, por lo que es fundamental excluirlas de la cavidad y establecer las interacciones directamente, como lo observado en BT11. En esta misma línea, el siguiente derivado más afectado fue T18 (**Figura 20d**) con un valor de p de 0,0074 y un R^2 de 0,5674, cuyos contactos ligando-proteína tuvieron una ausencia de interacciones mediada por agua, siendo más favorable energéticamente. Sin embargo, no es consistente que tenga una mejor linealidad y significancia que SOH95 ya que tuvo un peor perfil de interacciones. Por último, el compuesto INV29 (**Figura 20e**) fue el menos afectado, con un valor de p de 0,0033 y un R^2 de 0,6350, lo que tiene sentido dado que solo hubo un cambio de posición de ambos sistemas aromáticos isósteros. Al analizar su gráfico se puede apreciar una tendencia hacia la apertura del poro a partir de los 60 ns, que se mantuvo hasta el final de la simulación, lo cual coincide con una de las tres caídas y posterior estabilización en el RMSD del ligando.

Estos resultados apoyan la idea de que al modificar la estructura de BT11 se perdió afinidad por el sitio activo, y, por ende, la potencia agonista del compuesto. Sin embargo, es probable que al probar ligandos con menor afinidad puede haber una pérdida de la linealidad entre el comportamiento en

la dinámica y la apertura del poro (como lo visto con SOH95 y T18), por lo que este método solo sirve como una estimación de la capacidad agonista y apoya el hecho de que el compuesto *hit* BT11 tiene un gran potencial agonista del canal TRPC6. Otros factores importantes que podrían haber influido en estos resultados son que, en primer lugar, la dinámica molecular se llevó a cabo utilizando únicamente un ligando de los cuatro posibles por canal. Esto sin duda subestima el efecto de BT11 en la apertura del poro, ya que, si los cuatro ligandos estuvieran unidos a sus respectivos sitios activos ubicados en cada extremo del canal, se esperaría que la energía sumativa induzca un cambio conformacional más pronunciado, permitiendo una mayor apertura del poro. Además, debido a motivos de calidad de la estructura, se trabajó con un código del canal unido a un agonista y en un estado abierto, y aunque fue sometida a una minimización previa para relajar las cadenas laterales, es probable que no se haya relajado completamente, subestimando también la apertura inducida por BT11.

6.3 Cálculos de energía MMGBSA

Para estimar la energía libre de unión del ligando al receptor, y, por consiguiente, su afinidad [72], se calcularon las energías MMGBSA para cada compuesto según la metodología descrita previamente.

En base a los resultados obtenidos (**Tabla 2**), el compuesto *hit* BT11 tuvo una considerable reducción favorable de su energía, desde -48,72 al inicio hasta -68,28 kcal/mol al final de la simulación, siendo el menor valor de todos los sistemas, indicando que este compuesto tiene la mayor afinidad por el canal. En el caso de GSK, si bien sufrió un aumento de la energía en unas 10 kcal/mol, esta siguió siendo favorable, indicando que también tiene cierta afinidad por el canal, menor que BT11, pero mayor que T18 e INV29, los cuales sufrieron un aumento de su energía. La energía de T18 aumentó en 17,57 kcal/mol para llegar a -43,13 kcal/mol, teniendo la menor afinidad de todos los compuestos, mientras que INV29 tuvo un aumento de 12,61 kcal/mol, comparable a GSK, sugiriendo que tuvo una afinidad similar a GSK y mayor que T18. Por último, el compuesto SOH95 tuvo una leve disminución favorable de -2,17 kcal/mol, para llegar a un valor de -54,45 kcal/mol que lo posiciona como el segundo compuesto con mayor afinidad, incluso superando por -1,32 kcal/mol a GSK. Estos resultados van en línea con los obtenidos en los estudios de dinámica molecular, donde BT11 tuvo el mejor comportamiento, seguido por SOH95, GSK, INV29 y finalmente T18, mismo orden encontrado en este estudio.

Cabe destacar que, por temas de gasto computacional, se calculó la energía MMGBSA solo a la proteína y el ligando, sin considerar membrana, solvente ni iones, lo que sin duda hubiera variado los resultados al considerar la energía de todo el sistema. Además, dada las limitaciones del método, no fue posible calcular la energía de la proteína sin ligando, lo que hubiera servido como un control para comparar los cambios de energía al incluir cada uno de los ligandos y evaluar si es que estos tuvieron un efecto favorable en la totalidad de la energía del sistema. Por ende, estos resultados sirven solo como una estimación que apoya los resultados vistos anteriormente para cada uno de los ligandos, pero que continúan con la tendencia claramente favorable hacia la idea de que BT11 tiene un gran potencial como agonista del canal.

6.4 Análisis Retrosintético

En la estructura de BT11 se pueden distinguir tres fragmentos importantes (sintones) (**Figura 21**): un benzotiofeno, un acilnaftaleno y un ácido benzoico. Sus respectivos equivalentes sintéticos corresponderían al ácido benzo[*b*]tiofen-2-ilborónico disponible comercialmente; al cloruro de 2-naftoilo disponible comercialmente; y a un ácido benzoico polifuncionalizado con grupos OH, Br y NH_2, el cual puede sintetizarse mediante las reacciones clásicas de compuestos aromáticos a partir de un reactivo disponible comercialmente.

Para lograr el acoplamiento de los tres fragmentos, es posible comenzar por el reactivo ácido 4-bromobenzoico (**Figura 22**) disponible comercialmente. Para hidroxilar en *meta* respecto al carboxilato, la secuencia consiste en una nitración favorecida en esta posición debido a la suma de los efectos de dirección *orto* del bromo y *meta* del ácido carboxílico, para formar el compuesto 1, que es subsecuentemente reducido a su respectiva anilina con Zn en medio ácido, aunque también podría reducirse con Fe en medio ácido, H_2 en Pd/C o $SnCl_2$, originando el compuesto 2. La anilina 2 es convertida a la sal de diazonio 3, que mediante una reacción de hidroxilación de tipo Sandmeyer catalizada por Cu (I) en un exceso de Cu (II), bajo condiciones suaves y con alto rendimiento [87,88], es convertida finalmente al fenol 4. Para evitar que ocurra una nitración indeseada reportada por el uso de nitrato de cobre (II) [88], se prefiere el uso de sulfato de cobre (II) como la fuente del exceso de Cu (II).

Una vez obtenido el fenol 4, se debe formar un nuevo grupo amino capaz de reaccionar con el cloruro de 2-naftoilo para así formar la amida correspondiente (**Figura 23**). Para esto, la primera reacción es una nitración que se verá favorecida en posición *meta* respecto al carboxilato, siguiendo

el mismo principio mencionado anteriormente para dar el compuesto 5. Si bien la probabilidad de una nitración en *orto* respecto al grupo hidroxilo es baja, principalmente debido al gran impedimento estérico, podría ser un producto indeseable que afecte el rendimiento. Antes de reducir el grupo nitro, el fenol y el ácido carboxílico deben ser protegidos para que no interfieran como nucleófilos en la etapa posterior de acilación de la amina ni en la reacción de acoplamiento tipo Suzuki. Esta protección se puede llevar a cabo con TBDMS-Cl (cloruro de *terc*-butildimetilsilil) e imidazol en DMF (dimetilformamida), mediante la formación de un éter de gran estabilidad en ambos grupos [89,90] para dar el compuesto 6. La siguiente etapa es la reducción del grupo nitro, que debe ser con H_2 en Pd/C ya que cualquier otro agente reductor como Zn, Fe o $SnCl_2$ en medio ácido puede romper los grupos protectores TBDMS. Producto de la reducción se forma la anilina 7 que actuará como nucleófilo en la etapa de acilación posterior. Se prefirió la protección antes de la reducción a anilina para evitar una posible reacción entre esta última con el protector derivado de silicio, que, a pesar de estar poco favorecida, podría reducir el rendimiento de la reacción.

En la última secuencia se procede al acoplamiento de los 3 equivalentes sintéticos (**Figura 24**). El compuesto 7 es acilado con cloruro de 2-naftoilo para generar el compuesto acilado 8, que posteriormente es acoplado al ácido benzo[*b*]tiofen-2-ilborónico mediante una reacción de Suzuki en medio básico [91], para finalmente desproteger los grupos OH con Bu_4NF (fluoruro de tetra-n-butilamonio) como fuente de fluoruro, el cual es la base ‘’dura’’ capaz de formar enlaces fuertes con ácidos ‘’duros’’ como el silicio, según la teoría ácido-base ‘’duro-blando’’ de Pearson [92], rompiendo el enlace silicio-oxígeno. En caso de observar un bajo rendimiento en esta secuencia, es posible invertir el orden entre la acilación y el acoplamiento de Suzuki para evitar una posible interferencia estérica y/o una interferencia de la amida que genere una reacción de Suzuki-Miyaura con el derivado de ácido borónico [93], a pesar de que esto es poco probable dado que para que la reacción pueda suceder, el nitrógeno de la amida debe ser activado por la unión a dos grupos Boc, que aumenten su electrofilia debido al desplazamiento de la resonancia hacia estos grupos. Sin embargo, al invertir el orden podría interferir la anilina acoplándose al derivado de ácido borónico, que si bien se ha reportado que su presencia no afecta el rendimiento [94], se deberá determinar empíricamente si esto pudo afectar o no. En este último caso, si aun así se observara una reducción del rendimiento por posible interferencia de la anilina, se podría realizar el acoplamiento previo a la reducción del grupo nitro.

6.5 Predicción de propiedades Fisicoquímicas y Farmacocinéticas

Las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y el potencial de convertirse en fármaco (o *druglikeness* por su nombre en inglés) son fundamentales al guiar los procesos de descubrimiento y desarrollo de fármacos con la finalidad de encontrar un compuesto con potencial terapéutico que sea un buen candidato para estudios preclínicos [95].

De acuerdo con los resultados de las predicciones de estas propiedades (**Tabla 3**), se estima que el compuesto *hit* BT11 sea pobremente soluble en agua, dificultando los procesos de absorción intestinal y posterior distribución sanguínea, puesto que, para que dichos procesos ocurran, es necesario que el fármaco se disuelva previamente en los fluidos gastrointestinales (GI), teniendo como consecuencia que la disolución se convierta en el factor limitante para la absorción oral. Para solventar este inconveniente, la opción más razonable sería realizar una sal en el ácido benzoico, tal como una sal sódica, potásica u otra con un contraión cargado positivamente, ya que se ha demostrado que esto mejora considerablemente la solubilidad en agua y fluidos GI, lo cual a su vez incrementa la BD por vía oral, además de ser una alternativa viable para el desarrollo de formulaciones parenterales y otras formas farmacéuticas líquidas [96].

Si bien BT11 cumple con las 2 condiciones planteadas por Veber et al. [77] para lograr una alta absorción GI, de tener un número de enlaces rotables ≤ 10 y un valor de TPSA ≤ 140 $Å^2$, según el modelo de ‘’Huevo-Duro’’ (**Figura 26**) desarrollado en el año 2016 [79], este compuesto no cumple con los criterios, ya que, a diferencia de los factores anteriores, este modelo considera el valor de LogP determinado mediante el método de Wildman y Crippen (WLogP) [97] en el eje de ordenadas y lo relaciona con la variable TPSA en el eje de abscisas, estableciendo una elipse englobada en los límites de un TPSA < 142 $Å^2$ y un LogP entre -2,3 y +6,8 (área correspondiente a la clara del huevo), cuyas coordenadas deben estar dentro de esta, lo que no se cumple para BT11 puesto que para un valor TPSA de 114,87 $Å^2$ debe tener un WLogP entre -2 y +5 aproximadamente, y posee uno de 6,19. De la misma manera, este modelo es capaz de predecir la permeabilidad a través de la BHE (área correspondiente a la yema del huevo), donde los compuestos con una polaridad moderada (TPSA < 79 $Å^2$) y relativamente lipofílicos (WLogP entre +0,4 y +6,0) tienen una alta probabilidad de ingresar al SNC, lo que difiere con el límite superior de PSA de 90 $Å^2$ planteado por Van de Waterbeemd et al. [98] y con el señalado por Kelder et al. [99], de un PSA < 60-70 $Å^2$.

En la búsqueda de mejorar la BD oral y la penetrancia a través de la BHE, considerando que se busca actuar en los canales TRPC6 a nivel del SNC, se probaron nuevos derivados manteniendo el farmacóforo de ácido benzoico, pero modificando las 2 propiedades antes mencionadas. Al esterificar el ácido carboxílico (compuestos 2 y 3) formando un profármaco (hidrolizable por esterasas plasmáticas para restaurar el ácido carboxílico), si bien produjo una reducción favorable del TPSA, hubo un aumento desfavorable de la lipofilia. Al disminuir la lipofilia por reducción del número de anillos aromáticos, reemplazando al benceno unido al tiofeno por un cicloheptano (importante en el bloqueo de la entrada de agua), manteniendo solo el benceno que establece un *pi-stacking* con la A:Phe675 y el grupo ácido esterificado (compuesto 4), se logra una alta absorción GI al reducir el WLogP, aunque podría también reducir la potencia al perder la interacción con la A:Phe679. Por otra parte, debido a que para el cálculo del TPSA se consideran los heteroátomos (O, N, S, P e incluso halógenos) y los hidrógenos polares unidos a ellos [78], al reemplazar el sistema benzotiofeno por su isóstero naftaleno (compuestos 5-9) se redujo significativamente al eliminar el azufre, llegando a un valor de 86,63 $Å^2$ que sería suficiente para alcanzar una alta absorción GI, en principio sin afectar mayormente la actividad. La otra estrategia para reducir el valor de TPSA es eliminar los hidrógenos polares por metilación de los heteroátomos, donde además de la esterificación del ácido carboxílico, la metilación del nitrógeno del conector amida y del hidroxilo en posición 5 son también posibles, siempre y cuando no afecten significativamente la actividad biológica ni la síntesis del compuesto. Haciendo esto es posible llegar a un compuesto capaz de atravesar la BHE según el modelo de ‘’huevo-duro’’ (compuesto 9). Es importante destacar que, en este modelo, la precisión de predicción de la absorción GI y la permeabilidad de la BHE alcanza el 83% [79], por lo que sus resultados, en conjunto con los valores límites de TPSA y WLogP mencionados por otros investigadores, pueden ofrecer una estimación cercana a la realidad, pero no deben considerarse totalmente concluyentes.

Por último, el gráfico de radar para la BD oral (**Figura 27**) muestra que la lipofilia, el número de insaturaciones y la solubilidad están por fuera del rango ideal para obtener una buena BD oral, alejándose con mucha mayor diferencia para las insaturaciones, lo que evidencia aún más la necesidad de eliminar algunos anillos aromáticos, principalmente aquellos que no sean indispensables para la actividad biológica, y justifica las modificaciones planteadas anteriormente.

6.6 Predicción de Toxicidad

La toxicidad es la segunda causa principal de fracaso en el desarrollo de nuevos fármacos, causando un 30% del 90% de los fracasos en estudios clínicos [100], por lo que el hecho de prevenir que un nuevo fármaco potencialmente tóxico pase a la siguiente fase de estudios se vuelve fundamental, evitando la pérdida de tiempo y dinero.

Según los resultados obtenidos en la predicción de toxicidad del compuesto *hit* BT11 (**Tabla 4**) realizada en el sitio web PreADMET [76], este sería mutagénico de acuerdo con la prueba de Ames [80–82]. Esto probablemente se deba a la gran cantidad de anillos aromáticos presentes en la estructura, ya que, de acuerdo con un análisis estructural de los principales núcleos asociados a mutagenicidad según la prueba de Ames [101], existen 4 núcleos mayores y 3 núcleos menores que tendrían una alta probabilidad de causar mutaciones en el ADN, dentro de los cuales están el grupo naftaleno y el anillo de benceno (ambos menores), siendo mutagénicos el 62% y 42% de los compuestos probados con cada núcleo, respectivamente. El compuesto BT11 posee un grupo naftaleno y dos anillos de benceno en su estructura, resultando en una molécula con una probabilidad considerable de ocasionar mutagenicidad. Sin embargo, es posible reducir o eliminar la mutagenicidad realizando modificaciones en la estructura, ya que, según Hsu et al. [101], al acoplar el naftaleno a una anilina formando una *N*-fenil-naftalen-2-amina o *N*-fenil-naftalen-1-amina, se eliminó la actividad mutagénica, mientras que, en el caso del benceno, al hacer una chalcona (1,3-Difenil-2-propen-1-ona) se logró reducir el porcentaje de compuestos con actividad mutagénica a un 24%. Esto indica que es posible reducir la mutagenicidad al modificar la estructura y mantiene la esperanza de conseguir un compuesto capaz de mantener la actividad biológica a la vez que sea seguro para los pacientes, considerando también que estos grupos son ampliamente utilizados en química medicinal y están presentes en una variedad de fármacos aprobados, como por ejemplo en el propranolol (β-bloqueador no selectivo), duloxetina (antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina), naproxeno (antiinflamatorio no esteroidal (AINE)), nafacilina (antibiótico betalactámico), entre muchos otros que contienen un naftaleno en su estructura [102], mientras que el benceno incluso ha sido señalado como el motivo estructural más común dentro de todos los medicamentos aprobados [103].

Además de la mutagenicidad, BT11 tendría un alto riesgo de inhibir el canal hERG (por las siglas en inglés para *human ether-a-go-go related gene*), importante en la conducción de la corriente de

potasio rectificadora retardada rápida (I_{Kr} por sus siglas en inglés) actuando en la fase 3 de repolarización del potencial de acción cardíaco, cuyo bloqueo se ha visto significativamente relacionado a arritmias cardíacas inducidas por fármacos al prolongar el intervalo QT [104]. Este alto riesgo está dado principalmente por su alto valor de CLogP, ya que un compuesto con un valor ≥ 3,7 tiene gran probabilidad de bloquear el canal [105], entonces, cuando se observa que un compuesto inhibe hERG, se propone reducir la lipofilia bajo un valor de 3 [106]. El otro factor importante en el bloqueo de este canal es la característica ácido-básica de la molécula, ya que los compuestos básicos tienen el mayor riesgo de inhibición, mientras que los ácidos tienen el menor riesgo de todos, con un bloqueo < 2 % durante gran parte del espectro de lipofilicidad [107], haciendo improbable que BT11 se una a este canal. Por último, en el farmacóforo general planteado para el bloqueo de hERG (**Anexo 5**) se indican tres regiones hidrofóbicas y tres aceptores de puente de hidrógeno distribuidos a cierta distancia [108], teniendo cierta similitud estructural con BT11, sin embargo, solo es aplicable para compuestos básicos o neutrales. Por lo tanto, la característica ácida de BT11, además de ser parte del farmacóforo para la unión a TRPC6, confiere un efecto protector al prevenir la toxicidad cardíaca inducida por fármacos, reduciendo significativamente la probabilidad de que se una al canal hERG.

Por último, es importante tener en cuenta que una hiperactivación del canal TRPC6 también se ha relacionado a patologías renales como glomerulonefritis [109] y fibrosis renal [110], así como disfunción cardiovascular [111] y pulmonar [112]. Por lo tanto, es posible que los agonistas de TRPC6 puedan producir reacciones adversas relacionadas con estos sistemas, o bien, empeorar la condición de sujetos con estas patologías, siendo una potencial contraindicación. Sin embargo, es importante destacar que estos efectos podrían estar ausentes en sujetos sanos a dosis terapéuticas.

Todos estos aspectos resaltan la importancia de evaluar la toxicidad del compuesto en estudios posteriores e identificar la dosis terapéutica y tóxica para garantizar la eficacia y seguridad para los pacientes.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En el ámbito del diseño racional y descubrimiento de nuevos fármacos, los estudios de *docking* y dinámica molecular han sido herramientas ampliamente utilizadas y con un éxito demostrado. La presente investigación demostró que el compuesto BT11, un derivado de ácido benzoico, tiene un gran potencial agonista del canal TRPC6 según estos estudios, siendo una nueva alternativa de tratamiento para los trastornos del espectro autista.

En los estudios de *docking*, BT11 demostró una adecuada conformación dentro del sitio activo para agonistas, estableciendo un número considerable de interacciones con la mayoría de los residuos clave que lo componen, siendo incluso superior al agonista GSK. Al modificar su estructura, en general hubo un impacto negativo en el puntaje, a excepción de T18, cuya modificación produjo una leve mejoría a pesar de la reducción en el número de interacciones.

El compuesto BT11 formó un complejo estable con el sitio activo del canal según los estudios de dinámica molecular, con un importante número de interacciones y tiempo de permanencia sumado a un buen patrón de flujo de agua, logró generar un efecto agonista al inducir una apertura significativa y lineal del poro a lo largo de la simulación. Además, tuvo la mayor afinidad estimada mediante la energía MMGBSA, siendo ampliamente superior incluso al agonista GSK. Al modificar su estructura hubo una reducción de la afinidad, afectando la estabilidad del ligando en el sitio activo, y, por ende, su efecto agonista.

La inclusión del sistema benzotiofeno conectado directamente al ácido benzoico resultó en un notable incremento en la afinidad y estabilidad del ligando en el sitio activo al actuar como un tapón físico que impide la entrada de agua a la cavidad. Sin embargo, en caso de ser necesario, se podría intercambiar por un grupo isóstero que ejerza la misma función, pero que mejore el perfil farmacocinético y/o de toxicidad, o que facilite la síntesis del compuesto.

El farmacóforo esencial para la actividad agonista consiste en un ácido benzoico, un sistema aromático de dos anillos conectado directamente y un anillo aromático conectado mediante un grupo carbonilo, mientras que los sustituyentes en posición 5 del ácido benzoico y en el anillo aromático conectado al carbonilo podrían influir en la afinidad.

El análisis retrosintético demostró que es posible sintetizar el compuesto BT11, un factor fundamental pensando en su aplicación en futuros estudios.

Los estudios de propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas revelaron que BT11 es un buen compuesto de partida que tiene un gran potencial para convertirse en fármaco, con la posibilidad de ser optimizado para conseguir una adecuada llegada al sitio de acción en el sistema nervioso central, sin eliminar su actividad. Además, tendría un bajo riesgo de toxicidad debido al grupo ácido que le confiere un efecto protector ante la inhibición del canal hERG y a los anillos aromáticos catalogados de bajo riesgo para producir mutagenicidad, que también están presentes en un gran número de fármacos aprobados.

Los hallazgos de esta investigación pueden impulsar el desarrollo de nuevos y mejores agonistas para el canal TRPC6 mediante modificaciones estructurales innovadoras que permitan mejorar la afinidad y/o las propiedades farmacocinéticas y de toxicidad. Además, sustentan la realización de nuevos estudios que proporcionen información adicional para avanzar en la búsqueda de un tratamiento efectivo y seguro para los trastornos del espectro autista.

LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO

8. LIMITACIONES DE ESTE ESTUDIO

El presente estudio tiene algunas limitaciones relacionadas con el gasto computacional y con la disponibilidad limitada de estructuras tridimensionales de calidad.

En primer lugar, los estudios de dinámica molecular demandaron un gran gasto computacional, ya que el canal TRPC6 es una proteína de gran tamaño, constituida por un total de 3.724 aminoácidos, que, sumado a la membrana, iones y solvente constituyen un sistema de alrededor de 300.000 átomos, demorando un promedio de 72 horas por cada dinámica de 100 ns de duración. Esto pudo limitar los resultados obtenidos en los gráficos del diámetro del poro a lo largo de la simulación (**Figura 20**), puesto que, a pesar de que este tiempo fue suficiente para observar diferencias en la linealidad y significancia de la correlación entre ambas variables, el diámetro final alcanzado fue similar en todos los sistemas, continuando con una tendencia al alza sin llegar a una meseta, y por ende, impidiendo ver el diámetro máximo alcanzado por cada sistema, lo que hubiera servido como otra medida de la potencia agonista de cada derivado.

La segunda gran limitación fue dada por la poca disponibilidad de estructuras tridimensionales de calidad, ya que, la gran desventaja de trabajar con la mejor estructura según los parámetros de calidad (PDB 6UZ8) fue el hecho de que esta se encontraba en un estado abierto al estar en complejo con un agonista, haciendo que la preparación y minimización previa tomara una mayor relevancia, y seguramente, consumiendo cierto tiempo de la simulación de dinámica molecular en la relajación de sus cadenas y estabilización de la proteína. Si bien estaba disponible una estructura del canal en su estado en reposo (PDB 5YX9), esta tenía una calidad mucho menor comparada a la utilizada, por lo que se priorizó la calidad de la estructura, asumiendo que la minimización previa sería suficiente para relajar la proteína, aunque sin tener la certeza absoluta de las diferencias entre los resultados obtenidos con ambas estructuras.

FUTURAS DIRECCIONES

9. FUTURAS DIRECCIONES

Los resultados de este estudio sientan las bases para futuras investigaciones en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para los trastornos del espectro autista.

En primer lugar, para eliminar las limitaciones señaladas anteriormente, se podrían volver a ejecutar los estudios de *docking* y dinámica molecular utilizando la estructura del canal en un estado en reposo y sin ligandos, completando los *loops* perdidos con un programa de modelamiento estructural de proteínas como Modeller [113] utilizando como molde la estructura del canal TRPC3 humano (hTRPC3), debido a la gran conservación de dichas regiones en el hTRPC6, siguiendo el protocolo usado por Yang et al. [56]. Otra posible solución sería utilizar la misma estructura unida a un agonista, pero con una mejor preparación previa, eliminando todos los ligandos y moléculas exógenas, seguido por una dinámica de 500 ns, suficiente para producir la relajación de sus cadenas, y así finalmente utilizar este resultado como la entrada para el resto de los estudios. Esto permitiría determinar si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambas estructuras, o si el compuesto BT11 exhibe un comportamiento similar al visto en el presente estudio, confirmando su gran potencial agonista del canal. Además, se podría extender el tiempo de simulación hasta 500 ns para evidenciar mejor el efecto de cada compuesto en la apertura del poro, como una estimación de la potencia agonista, y para observar la diferencia entre la estabilidad de cada ligando en el sitio activo a lo largo de un mayor tiempo de simulación.

Dado que la síntesis del compuesto *hit* BT11 es posible según la ruta descrita previamente (**Figura 25**), se puede confirmar su actividad agonista mediante la técnica de fijación en parche de membrana (*patch-clamp*), que permitiría evaluar la actividad del canal iónico TRPC6 en presencia de un ligando a diferente concentración, para finalmente construir su curva dosis-respuesta y calcular su EC_{50}. Además, para confirmar la unión del ligando al sitio activo para agonistas ubicado en la porción extracelular, se podrían realizar dos alternativas de esta técnica, de interior hacia afuera (*inside-out*) y exterior hacia afuera (*outside-out*), esperando obtener solo una corriente en este último caso. Utilizando esta misma técnica, es posible estudiar el impacto en la afinidad y potencia (mediante las curvas dosis-respuesta) de la sustitución o eliminación de diferentes grupos importantes en la unión al sitio activo, sintetizando y probando nuevas series de derivados de BT11.

Lo siguiente sería evaluar el efecto de los mejores compuestos obtenidos (con los menores valores de EC_{50}) en modelos animales de autismo, como, por ejemplo, utilizando el modelo propuesto por Palacios-Muñoz et al. [50] de moscas de la fruta con comportamientos de tipo autista inducidos por un gen TRPγ mutante, homólogo al gen TRPC6 humano. No obstante, la gran limitación de este estudio podría ser la ausencia de estructuras tridimensionales obtenidas experimentalmente del canal TRPγ, aunque eso podría cambiar con el pasar de los años.

Finalmente, basado en los resultados de los estudios anteriores, se podría llevar a cabo un estudio de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) con el fin de sistematizar la información recabada sobre la actividad biológica y relacionarla con los diferentes sustituyentes propuestos, para así crear una ecuación que permita predecir la actividad biológica de nuevos compuestos.

ABREVIATURAS

10. ABREVIATURAS

AIH: Absorción Intestinal Humana.

AINE: Antiinflamatorio No Esteroidal.

APH: Aceptores de Puente de Hidrógeno.

BD: Biodisponibilidad.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

Bu_4NF: fluoruro de tetra-n-butilamonio (*tetra-n-butylammonium fluoride*).

CAMKIV: Proteína cinasa tipo IV dependiente de calcio/calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV*).

CACNA1C: Subunidad alfa1 C del canal de calcio dependiente de voltaje (*Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C*).

CACNA1F: Subunidad alfa1 F del canal de calcio dependiente de voltaje (*Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 F*).

cLogP: LogP de consenso.

CREB: Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (*cAMP response element-binding*).

Cryo-EM: Criomicroscopía Electrónica (*Cryogenic Electron Microscopy*).

DAG: Diacilglicerol.

DM: Dinámica Molecular.

DMF: Dimetilformamida.

DPH: Dadores de Puente de Hidrógeno.

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*).

ET: Esclerosis Tuberosa (también abreviado TSC por sus siglas en inglés para *Tuberous Sclerosis*).

FMRP: Proteína de retraso mental del cromosoma X frágil (*Fragile X Mental Retardation Protein*).

FMR1: gen de la proteína FMRP.

GI: Gastrointestinal.

GSK: agonista del canal TRPC6 GSK1702934A.

hERG: gen relacionado con el éter humano (*human Ether-a-go-go-Related Gene*).

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato.

KCNMA1: Subfamilia M alfa1 del canal de potasio activado por calcio (*Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily M Alpha 1*).

MEK: Proteína Cinasa Cinasa activada por mitógeno (también llamada MAPKK).

mGluR5: Receptor metabotrópico de glutamato 5 (*Metabotropic glutamate receptor 5*).

MM: Masa Molar.

MMGBSA: Mecánica Molecular con Born generalizado y solvatación de área superficial (*Molecular mechanics with generalised Born and surface area solvation*).

NER: Número de Enlaces Rotables.

NLGN3,4 y 4Y: gen de Neuroliginas 3, 4 y 4Y.

NPT: ensamble isotérmico isobárico.

NRXN 1 y 3: gen de Neurexinas 1 y 3.

OPLS3e: Campo de fuerza de Potenciales Optimizados para Simulaciones de Líquidos 3e (*Optimized Potentials for Liquid Simulations 3e*).

PDB: Banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*).

PGP: Glucoproteína-P.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PKB: Proteína cinasa B (*Protein kinase B,* también llamada AKT).

POPE: Bicapa Fosfatidiletanolamina-Fosfatidilglicerol (*Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer*).

QSAR: Relación Estructura-Actividad Cuantitativa (*Quantitative Structure-Activity Relationship*).

RAM: Reacciones Adversas a Medicamentos.

REA: Relación Estructura-Actividad.

RMSD: Desviación cuadrática media (*Root-mean-square deviation*).

SASA: Área Superficial Accesible al Solvente (*Solvent Accessible Surface Area*).

SCN2A: Subunidad 2 alfa del canal de sodio activado por voltaje (*Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 2*).

SHANK: familia de genes para proteínas SH3 y múltiples dominios repetidos de anquirina (*SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains*).

SID: Diagrama de interacción de simulación (*Simulation interaction diagram*).

SLC6A4: gen del transportador de solutos familia 6 miembro 4 (*Solute Carrier Family 6 Member 4*).

SNC: Sistema Nervioso Central.

SXF: Síndrome X Frágil.

ta: Temperatura ambiente.

TBDMS-Cl: Cloruro de *terc*-butildimetilsilil (*tert-Butyldimethylsilyl chloride*).

TDAH: Trastorno de Déficit Atencional con Hiperactividad.

TEA: Trastorno(s) del Espectro Autista.

TIP3P: modelo acuso de potencial intermolecular transferible 3P (*Transferable Intermolecular Potential 3P*).

TOD: Trastorno Oposicionista Desafiante.

TPSA: Área de Superficie Polar Topológica (*Topological Polar Surface Area*).

TRPC3: Canal Catiónico de Potencial Receptor Transitorio de la subfamilia C, miembro 3 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*).

TRPC6: Canal Catiónico de Potencial Receptor Transitorio de la subfamilia C, miembro 6 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*).

TRPγ: Proteína del canal de calcio de potencial receptor transitorio gamma (*Transient receptor potential-gamma protein*).

TSC1: Subunidad 1 de la proteína del complejo de esclerosis tuberosa (*TSC Complex Subunit 1*).

TSC2: Subunidad 2 de la proteína del complejo de esclerosis tuberosa (*TSC Complex Subunit 2*).

VSGB: Modelo de Born generalizado de dieléctrico variable (Variable-dielectric generalized Born model).

WLogP: LogP determinado por el método de Wildman y Crippen.

5-HT: 5-Hidroxitriptamina o serotonina.

5-HT2A: Receptor 2A de 5-hidroxitriptamina.

5-HT6: Receptor 6 de 5-hidroxitriptamina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asociación Americana de Psiquiatría. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 5ta ed. (DSM-V). Arlington, VA: Editorial Medica Panamericana.; 2014. p. 31.
2. Kaat AJ, Gadow KD, Lecavalier L. Psychiatric symptom impairment in children with autism spectrum disorders. J Abnorm Child Psychol. 2013 ago;41(6):959–69.
3. Blanchard A, Chihuri S, Diguiseppi CG, Li G. Risk of Self-harm in Children and Adults with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Netw Open. American Medical Association; 2021.
4. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. Lancet Neurol. 2002 oct;1(6):352–8.
5. Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, et al. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. Annu Rev Public Health. 2017 mar;38(1):81–102.
6. Zeidan J, Fombonne E, Scorah J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. Autism Res. 2022 may;15(5):778–90.
7. Loomes R, Hull L, Mandy WPL. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 56, J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. Elsevier Inc.; 2017. p. 466–74.
8. Ministerio de Salud (MINSAL). Guía de Práctica Clínica. Detección y Diagnóstico Oportuno de los Trastornos del Espectro Autista (TEA) [Ïnternet]. 2011. Pág. 13. [Citado el 8 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.minsal.cl/portal/url/item/bd81e3a09ab6c3cee040010164012ac2.pdf.
9. Gómez Chamorro Mauricio. Trastornos del Espectro Autista [Internet]. Ministerio de Salud (MINSAL). 2017. Pág. 3. [Citado el 8 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.camara.cl/pdf.aspx?prmID=111732&prmTIPO=DOCUMENTOCOMISION.
10. Instituto Nacional de Estadísticas. Censos de Población y Vivienda [Internet]. Gobierno de Chile. 2017. [Citado el 8 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.ine.gob.cl/estadisticas/sociales/censos-de-poblacion-y-vivienda.
11. Ministerio de Salud (MINSAL). Ley 21545| Establece la promoción de la inclusión, la atención integral, y la protección de los derechos de las personas con trastorno del espectro autista en el ámbito social, de salud y educación. Biblioteca del Congreso Nacional (BCN); 10 de marzo de 2023.
12. Lyall K, Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. Int J Epidemiol. 2014 abr;43(2):443–64.
13. Croen LA. Antidepressant Use During Pregnancy and Childhood Autism Spectrum Disorders. Arch Gen Psychiatry. 2011 nov;68(11):1104.
14. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. Dialogues Clin Neurosci. 2012 sep;14(3):281–92.

15. Ronald A, Hoekstra RA. Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2011 abr;156(3):255–74.

16. Persico AM, Napolioni V. Autism genetics. Behav Brain Res. 2013 ago;251:95–112.

17. Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field. J Appl Genet. 2019 feb;60(1):37–47.

18. Forrest MP, Penzes P. Autism Genetics: Over 100 Risk Genes and Counting. Pediatr Neurol Briefs. 2020 dic;34(0):13.

19. Nardone S, Sharan Sams D, Reuveni E, Getselter D, Oron O, Karpuj M, et al. DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. Transl Psychiatry. 2014 sep;4(9):e433–e433.

20. Zhu L, Wang X, Li XL, Towers A, Cao X, Wang P, et al. Epigenetic dysregulation of SHANK3 in brain tissues from individuals with autism spectrum disorders. Hum Mol Genet. 2014 mar;23(6):1563–78.

21. Liu X, Shimada T, Otowa T, Wu YY, Kawamura Y, Tochigi M, et al. Genome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder in the East Asian Populations. Autism Res. 2016 mar;9(3):340–9.

22. Coutinho AM, Oliveira G, Morgadinho T, Fesel C, Macedo TR, Bento C, et al. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. Mol Psychiatry. 2004 mar;9(3):264–71.

23. Amodeo DA, Jones JH, Sweeney JA, Ragozzino ME. Risperidone and the 5-HT2A Receptor Antagonist M100907 Improve Probabilistic Reversal Learning in BTBR T + tf/J Mice. Autism Res. 2014 oct;7(5):555–67.

24. Amodeo DA, Rivera E, Dunn JT, Ragozzino ME. M100907 attenuates elevated grooming behavior in the BTBR mouse. Behav Brain Res. 2016 oct;313:67–70.

25. Amodeo DA, Oliver B, Pahua A, Hitchcock K, Bykowski A, Tice D, et al. Serotonin 6 receptor blockade reduces repetitive behavior in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. Pharmacol Biochem Behav. 2021 ene;200:173076.

26. Silverman JL, Smith DG, Rizzo SJS, Karras MN, Turner SM, Tolu SS, et al. Negative Allosteric Modulation of the mGluR5 Receptor Reduces Repetitive Behaviors and Rescues Social Deficits in Mouse Models of Autism. Sci Transl Med. 2012 abr;4(131).

27. Williams SCP. Drugs targeting mGluR5 receptor offer “fragile” hope for autism. Nat Med. 2012 jun 6;18(6):840–840.

28. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. Mol Psychiatry. 2015 nov;20(11):1350–65.

29. Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, et al. Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. Cell Res. 2018 jul;28(7):746–55.

30. McDougle CJ, Stigler KA, Erickson CA, Posey DJ. Pharmacology of autism. Clin Neurosci Res. 2006 oct;6(3–4):179–88.

31. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The trp ion channel family. Nat Rev Neurosci. 2001 jun;2(6):387–96.

32. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature. 1999 ene;397(6716):259–63.

33. Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. Neuropharmacology. 2002 jun;42(7):873–88.

34. Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca2+, and Calmodulin. Cell Signal. 2002 ago;14(8):649–54.

35. Cullen PJ, Lockyer PJ. Integration of calcium and RAS signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 may;3(5):339–48.

36. Cullen PJ. Decoding complex Ca2+ signals through the modulation of Ras signaling. Curr Opin Cell Biol. 2006 abr;18(2):157–61.

37. Lonze BE, Ginty DD. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. Neuron. 2002 ago;35(4):605–23.

38. Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang Y zheng, et al. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. Nature. 2005 abr 9;434(7035):894–8.

39. Tai Y, Feng S, Ge R, Du W, Zhang X, He Z, et al. TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. J Cell Sci. 2008 jul;121(14):2301–7.

40. Zhou J, Du W, Zhou K, Tai Y, Yao H, Jia Y, et al. Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. Nat Neurosci. 2008 jul;11(7):741–3.

41. Leuner K, Li W, Amaral MD, Rudolph S, Calfa G, Schuwald AM, et al. Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca^{2+} -permeable TRPC6 channels. Hippocampus. 2013 ene;23(1):40–52.

42. Du W, Huang J, Yao H, Zhou K, Duan B, Wang Y. Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. J Clin Invest. 2010 oct;120(10):3480–92.

43. Lin Y, Zhang JC, Fu J, Chen F, Wang J, Wu ZL, et al. Hyperforin Attenuates Brain Damage Induced by Transient Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) in Rats via Inhibition of TRPC6 Channels Degradation. J Cereb Blood Flow Metab. 2013 feb;33(2):253–62.

44. Sbacchi S, Acquadro F, Calo I, Cali F, Romano V. Functional Annotation of Genes Overlapping Copy Number Variants in Autistic Patients: Focus on Axon Pathfinding. Curr Genomics. 2010 abr;11(2):136–45.

45. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. Nature. 2011 ene;474(7351):380–4.

46. Cruz-Martin A, Crespo M, Portera-Cailliau C. Delayed Stabilization of Dendritic Spines in Fragile X Mice. J Neurosci. 2010 jun;30(23):7793–803.

47. Chapleau CA, Larimore JL, Theibert A, Pozzo-Miller L. Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. J Neurodev Disord. 2009 sep;1(3):185–96.

48. Leuner K, Kazanski V, Muller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, et al. Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. FASEB J. 2007 dic;21(14):4101–11.

49. Heiser JH, Schuwald AM, Sillani G, Ye L, Müller WE, Leuner K. TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. J Neurochem. 2013 nov;127(3):303–13.

50. Palacios-Muñoz A, de Paula Moreira D, Silva V, García IE, Aboitiz F, Zarrei M, et al. Mutations in trpγ, the homologue of TRPC6 autism candidate gene, causes autism-like behavioral deficits in Drosophila. Mol Psychiatry. 2022 ago;27(8):3328–42.

51. Bai Y, Yu X, Chen H, Horne D, White R, Wu X, et al. Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. Elife. 2020 mar;9.

52. Berman HM, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. Nat Struct Biol. 2003;10(12):980.

53. Berman HM, Henrick K, Nakamura H, Markley JL. The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB): Ensuring a single, uniform archive of PDB data. 2007;35:D301-3.

54. wwPDB consortium. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. Nucleic Acids Res. 2019;47:D520–8.

55. Guo W, Tang Q, Wei M, Kang Y, Wu JX, Chen L. Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites. Neuron. 2022 mar;110(6):1023-1035.e5.

56. Yang PL, Li XH, Wang J, Ma XF, Zhou BY, Jiao YF, et al. GSK1702934A and M085 directly activate TRPC6 via a mechanism of stimulating the extracellular cavity formed by the pore helix and transmembrane helix S6. J Biol Chem. 2021 oct;297(4):101125.

57. Friedland K, Harteneck C. Hyperforin: To Be or Not to Be an Activator of TRPC(6). In 2015. p. 1–24.

58. Madhavi Sastry G, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. J Comput Aided Mol Des. 2013 mar;27(3):221–34.

59. Shelley JC, Cholleti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: a software program for pK a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. J Comput Aided Mol Des. 2007 dic;21(12):681–91.

60. Greenwood JR, Calkins D, Sullivan AP, Shelley JC. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. J Comput Aided Mol Des. 2010 jun;24(6–7):591–604.

61. Jacobson MP, Friesner RA, Xiang Z, Honig B. On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations. J Mol Biol. 2002 jul;320(3):597–608.

62. Jacobson MP, Pincus DL, Rapp CS, Day TJF, Honig B, Shaw DE, et al. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. Proteins: Struc. Funct. Bioin. 2004 mar;55(2):351–67.

63. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. J Chem Theory Comput. 2016 ene;12(1):281–96.

64. Roos K, Wu C, Damm W, Reboul M, Stevenson JM, Lu C, et al. OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. J Chem Theory Comput. 2019 mar;15(3):1863–74.

65. Schrödinger Release 2023-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

66. Sherman W, Day T, Jacobson MP, Friesner RA, Farid R. Novel Procedure for Modeling Ligand/Receptor Induced Fit Effects. J Med Chem. 2006 ene;49(2):534–53.

67. Sherman W, Beard HS, Farid R. Use of an Induced Fit Receptor Structure in Virtual Screening. Chem Biol Drug Des. 2006 ene;67(1):83–4.

68. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. J Med Chem. 2004 mar;47(7):1739–49.

69. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. J Med Chem. 2004 mar;47(7):1750–9.

70. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein−Ligand Complexes. J Med Chem. 2006 oct;49(21):6177–96.

71. Bowers KJ, Sacerdoti FD, Salmon JK, Shan Y, Shaw DE, Chow E, et al. Molecular dynamics---Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. In: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing - SC '06. New York, New York, USA: ACM Press; 2006. p. 84.

72. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. Expert Opin Drug Discov. 2015 may;10(5):449–61.

73. Corey EJ, Cheng X-M. The logic of chemical synthesis. 1ra ed. Nueva York: John Wiley & Sons; 1989. ISBN 0-471-50979-5.

74. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017 mar;7(1):42717.

75. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25. 1. Adv Drug Deliv Rev. 2001 mar;46(1–3):3–26.

76. Seul, South Corea: Bioinformatics and Molecular Design Research Center; 2004. PreADMET program. Disponible desde: https://preadmet.webservice.bmdrc.org/.

77. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. J Med Chem. 2002 jun;45(12):2615–23.

78. Pajouhesh H, Lenz GR. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. NeuroRX. 2005 oct;2(4):541–53.

79. Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. ChemMedChem. 2016 jun;11(11):1117–21.

80. Ames BN, Gurney EG, Miller JA, Bartsch H. Carcinogens as Frameshift Mutagens: Metabolites and Derivatives of 2-Acetylaminofluorene and Other Aromatic Amine Carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1972 nov;69(11):3128–32.

81. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 ago;70(8):2281–5.

82. Ames BN, Lee FD, Durston WE. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 mar;70(3):782–6.

83. Mackie ID, McClure SA, DiLabio GA. Binding in Thiophene and Benzothiophene Dimers Investigated By Density Functional Theory with Dispersion-Correcting Potentials. J Phys Chem A. 2009 may;113(18):5476–84.

84. Aier I, Varadwaj PK, Raj U. Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. Sci Rep. 2016 oct;6(1):34984.

85. Mark P, Nilsson L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. J Phys Chem A. 2001 nov;105(43):9954–60.

86. Mark P, Nilsson L. Structure and dynamics of liquid water with different long-range interaction truncation and temperature control methods in molecular dynamics simulations. J Comput Chem. 2002 oct;23(13):1211–9.

87. Cohen T, Dietz AG, Miser JR. A simple preparation of phenols from diazonium ions via the generation and oxidation of aryl radicals by copper salts. J Org Chem. 1977 jun;42(12):2053–8.

88. Kristianslund R, Vik A, Hansen T V. A convenient synthesis of phenols. Synth Commun. 2018 nov;48(21):2809–14.

89. Corey EJ, Venkateswarlu A. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. J Am Chem Soc. 1972 ago;94(17):6190–1.

90. Firouzabadi H, Iranpoor N, Shaterian HR. Effective silylation of carboxylic acids under solvent-free conditions with *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCL) and triisopropylsilyl chloride (TIPSCL). Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem. 2000 ene;166(1):71–81.

91. Miyaura N, Yamada K, Suzuki A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. Tetrahedron Lett. 1979 ene;20(36):3437–40.

92. Pearson RG. Hard and Soft Acids and Bases. J Am Chem Soc. 1963 nov;85(22):3533–9.

93. Lei P, Meng G, Ling Y, An J, Nolan SP, Szostak M. General Method for the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling of Primary Amide-Derived Electrophiles Enabled by [Pd(NHC)(cin)Cl] at Room Temperature. Org Lett. 2017 dic;19(24):6510–3.

94. Ueno A, Kitawaki T, Chida N. Total Synthesis of (±)-Murrayazoline. Org Lett. 2008 may;10(10):1999–2002.

95. Meanwell NA. Improving Drug Candidates by Design: A Focus on Physicochemical Properties As a Means of Improving Compound Disposition and Safety. Chem Res Toxicol. 2011 sep;24(9):1420–56.

96. Serajuddin ATM. Salt formation to improve drug solubility. Adv Drug Deliv Rev. 2007 jul;59(7):603–16.

97. Wildman SA, Crippen GM. Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions. J Chem Inf Comput Sci. 1999 sep;39(5):868–73.

98. van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of Blood-Brain Barrier Crossing of Drugs Using Molecular Size and Shape, and H-Bonding Descriptors. J Drug Target. 1998 ene;6(2):151–65.

99. Kelder J, Grootenhuis PDJ, Bayada DM, Delbressine LPC, Ploemen J. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. Pharm Res. 1999;16(10):1514–9.

100. Sun D, Gao W, Hu H, Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? Acta Pharm Sin B. 2022 jul;12(7):3049–62.

101. Hsu KH, Su BH, Tu YS, Lin OA, Tseng YJ. Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. PLoS One. 2016 feb;11(2):e0148900.

102. Makar S, Saha T, Singh SK. Naphthalene, a versatile platform in medicinal chemistry: Sky-high perspective. Eur J Med Chem. 2019 ene;161:252–76.

103. Bemis GW, Murcko MA. The Properties of Known Drugs. 1. Molecular Frameworks. J Med Chem. 1996 ene;39(15):2887–93.

104. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. Nature. 2006 mar;440(7083):463–9.

105. Buyck C, Ford M, Livingstone D, Dearden J, Van de Waterbeemd H. EuroQSAR 2002. Designing drugs and crop protectants: processes, problems, and solutions. 1st ed. Blackwell, editor. Vol. 1. Oxford, UK: Blackwell Science Inc; 2003. 86–89 p.

106. Jamieson C, Moir EM, Rankovic Z, Wishart G. Medicinal Chemistry of hERG Optimizations: Highlights and Hang-Ups. J Med Chem. 2006 ago;49(17):5029–46.

107. Waring MJ, Johnstone C. A quantitative assessment of hERG liability as a function of lipophilicity. Bioorg Med Chem Lett. 2007 mar;17(6):1759–64.

108. Aronov A. Ligand Structural Aspects of hERG Channel Blockade. Curr Top Med Chem. 2008 sep;8(13):1113–27.

109. Dryer SE, Roshanravan H, Kim EY. TRPC channels: Regulation, dysregulation and contributions to chronic kidney disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019 jun;1865(6):1041–66.

110. Wu YL, Xie J, An SW, Oliver N, Barrezueta NX, Lin MH, et al. Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. Kidney Int. 2017 abr;91(4):830–41.

111. Hang P, Zhao J, Cai B, Tian S, Huang W, Guo J, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates TRPC3/6 Channels and Protects Against Myocardial Infarction in Rodents. Int J Biol Sci. 2015;11(5):536–45.

112. Jiang HN, Zeng B, Chen GL, Lai B, Lu SH, Qu JM. Lipopolysaccharide potentiates endothelin-1-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by upregulating TRPC channels. Biomed Pharmacother. 2016 ago;82:20–7.

113. Šali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. J Mol Biol. 1993 dic;234(3):779–815.

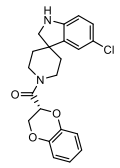
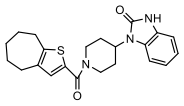
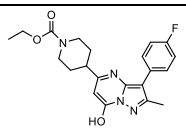
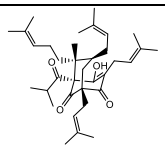
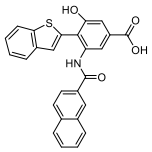
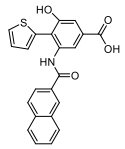
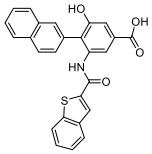
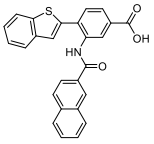
ANEXOS

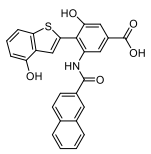
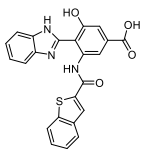
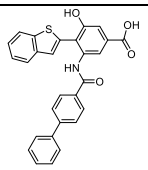
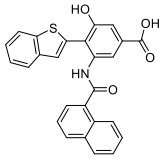
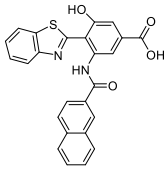
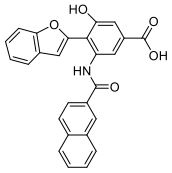
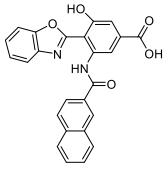
12. ANEXOS

Anexo 1: Valores XP Glide Score de los estudios de *docking* del *screening* inicial. Se muestran solo los valores de la mejor pose de cada compuesto con un valor menor a -9,0 kcal/mol.

Generación	Número	Sustituyentes	Menor XP GScore (kcal/mol)	Número total de poses
1°	38	R = 5,6-Di-Me Ar = Pyr R' = 2-Naftaleno	-9,601	15
	7	R = 5-F Ar = Pyr R' = 1-Naftaleno	-9,089	8
2°	14	R = p-OH X = -NH- R' = ciclopentil	-9,779	17
	13	R = p-OMe X = -NH- R' = ciclopentil	-9,758	12
	12	R = p-OH X = -NH- R' = ciclopropil	-9,380	16
	4	R = m,p-Di-Cl X = -NH- R' = ciclopropil	-9,369	15
	3	R = p-Cl X = -NH- R' = ciclopropil	-9,251	13
	16	R = p-OMe X = -SO_2NH- R' = ciclopropil	-9,142	15
	15	R = p-OMe X = - SO_2NH- R' = -Fe	-9,142	15
3°		Ninguno		
4°	11	R = 4-Fe	-9,760	18
	12	R = 1-Naftaleno	-9,634	16
	10	R = 2,3,4-Tri-OMe	-9,422	17
	13	R = 2-Naftaleno	-9,246	18
5°	13	R = 2-Naftaleno	-11,065	12
	8	R = 4-$N(CH_3)_2$	-10,287	19
	7	R = 4-F	-9,720	16
	10	R = 2,3,4-Tri-OMe	-9,714	15
	3	R = 2,6-Di-F	-9,147	17

Anexo 2: Valores XP Glide Score de los estudios de *docking* de agonistas de referencia y nuevos derivados. Se muestran solo los valores de la mejor pose de cada compuesto.

Grupo	Nombre/Número	Molécula	Menor XP GScore (kcal/mol)	Número total de poses
Agonistas	(R)-AM-0883		-9,513	19
	GSK1702934A		-9,202	13
	M085		-7,850	19
	Hiperforina		-6,223	16
Derivados	BT11		-11,452	20
	T18		-11,515	20
	INV29		-11,226	19
	SOH95		-9,871	20

	59		-10,589	17
	64		-9,994	17
	66		-10,796	20
	68		-8,490	20
	79		-10,242	19
	83		-10,542	16
	87		-9,338	18

Anexo 3: Datos del diámetro del poro de cada sistema, obtenidos por los estudios de dinámica molecular.

SISTEMA SIN LIGANDO							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**Aminoácido**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	9,30	8,74	9,02	**7,14**	**1,47**
		Gly684	6,73	8,34	7,54		
		Leu723	7,63	7,97	7,80		
		Ile727	4,55	6,23	5,39		
		Phe731	6,48	5,43	5,96		
101	**10**	Phe683	7,23	10,69	8,96	**7,91**	**1,19**
		Gly684	7,63	8,49	8,06		
		Leu723	8,73	9,48	9,11		
		Ile727	4,64	8,14	6,39		
		Phe731	5,06	8,96	7,01		
201	**20**	Phe683	9,48	9,29	9,39	**7,73**	**1,74**
		Gly684	7,30	9,56	8,43		
		Leu723	6,54	11,65	9,10		
		Ile727	4,12	7,23	5,68		
		Phe731	5,84	6,31	6,08		
301	**30**	Phe683	10,25	10,69	10,47	**9,09**	**1,69**
		Gly684	7,70	8,92	8,31		
		Leu723	8,09	11,37	9,73		
		Ile727	5,71	7,29	6,50		
		Phe731	9,91	10,93	10,42		
401	**40**	Phe683	9,82	10,81	10,32	**8,86**	**1,69**
		Gly684	7,83	8,69	8,26		
		Leu723	7,34	11,57	9,46		
		Ile727	4,96	7,44	6,20		
		Phe731	10,44	9,71	10,08		
501	**50**	Phe683	12,70	9,67	11,19	**9,64**	**2,04**
		Gly684	9,31	10,02	9,67		
		Leu723	8,11	11,21	9,66		
		Ile727	6,02	6,57	6,30		
		Phe731	11,40	11,42	11,41		
601	**60**	Phe683	11,39	9,92	10,66	**9,57**	**2,42**
		Gly684	7,64	9,48	8,56		
		Leu723	9,20	9,73	9,47		
		Ile727	6,26	6,39	6,33		
		Phe731	11,81	13,89	12,85		
701	**70**	Phe683	10,97	9,59	10,28	**9,64**	**1,93**
		Gly684	6,78	8,61	7,70		
		Leu723	9,21	11,17	10,19		
		Ile727	7,70	7,86	7,78		
		Phe731	12,76	11,79	12,28		
801	**80**	Phe683	9,28	8,47	8,88	**8,69**	**2,13**
		Gly684	6,33	7,45	6,89		
		Leu723	7,94	9,76	8,85		
		Ile727	6,37	7,22	6,80		
		Phe731	14,96	9,11	12,04		
901	**90**	Phe683	10,02	7,16	8,59	**8,31**	**1,73**
		Gly684	6,51	7,30	6,91		
		Leu723	8,01	8,61	8,31		
		Ile727	6,12	7,29	6,71		
		Phe731	9,89	12,16	11,03		
1001	**100**	Phe683	9,66	7,21	8,44	**8,86**	**2,32**
		Gly684	6,60	7,10	6,85		
		Leu723	8,14	10,69	9,42		
		Ile727	6,53	7,57	7,05		
		Phe731	11,57	13,54	12,56		

SISTEMA + GSK							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**Aminoácido**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	8,47	7,92	8,20	**7,24**	**1,01**
		Gly684	6,52	7,83	7,18		
		Leu723	7,46	9,00	8,23		
		Ile727	5,39	6,33	5,86		
		Phe731	6,96	6,47	6,72		
101	**10**	Phe683	6,91	10,12	8,52	**7,21**	**1,21**
		Gly684	7,14	7,92	7,53		
		Leu723	8,12	8,09	8,11		
		Ile727	7,81	4,27	6,04		
		Phe731	7,88	3,80	5,84		
201	**20**	Phe683	6,00	8,57	7,29	**7,20**	**0,64**
		Gly684	5,76	6,51	6,14		
		Leu723	7,63	8,10	7,87		
		Ile727	8,98	5,62	7,30		
		Phe731	9,40	5,39	7,40		
301	**30**	Phe683	8,31	10,98	9,65	**8,53**	**1,07**
		Gly684	7,77	8,92	8,35		
		Leu723	8,78	9,74	9,26		
		Ile727	6,28	7,46	6,87		
		Phe731	9,19	7,91	8,55		
401	**40**	Phe683	8,18	9,64	8,91	**8,34**	**1,16**
		Gly684	7,11	8,37	7,74		
		Leu723	8,95	8,06	8,51		
		Ile727	7,35	6,12	6,74		
		Phe731	10,60	8,97	9,79		
501	**50**	Phe683	10,59	7,84	9,22	**9,30**	**0,87**
		Gly684	8,84	7,99	8,42		
		Leu723	10,30	11,17	10,74		
		Ile727	8,42	9,97	9,20		
		Phe731	9,66	8,19	8,93		
601	**60**	Phe683	8,07	9,87	8,97	**9,43**	**1,26**
		Gly684	8,43	8,44	8,44		
		Leu723	12,76	10,47	11,62		
		Ile727	9,34	8,34	8,84		
		Phe731	9,68	8,86	9,27		
701	**70**	Phe683	7,71	11,74	9,73	**9,34**	**1,13**
		Gly684	7,63	8,88	8,26		
		Leu723	11,48	10,74	11,11		
		Ile727	8,11	9,89	9,00		
		Phe731	8,94	8,32	8,63		
801	**80**	Phe683	8,62	11,70	10,16	**9,70**	**1,21**
		Gly684	8,46	8,79	8,63		
		Leu723	10,58	12,54	11,56		
		Ile727	9,22	8,17	8,70		
		Phe731	10,82	8,09	9,46		
901	**90**	Phe683	7,87	10,73	9,30	**8,86**	**1,09**
		Gly684	8,04	7,58	7,81		
		Leu723	10,25	10,53	10,39		
		Ile727	8,01	7,61	7,81		
		Phe731	9,53	8,43	8,98		
1001	**100**	Phe683	6,84	10,44	8,64	**9,34**	**1,41**
		Gly684	7,70	8,21	7,96		
		Leu723	10,23	12,59	11,41		
		Ile727	9,16	7,92	8,54		
		Phe731	11,38	8,90	10,14		

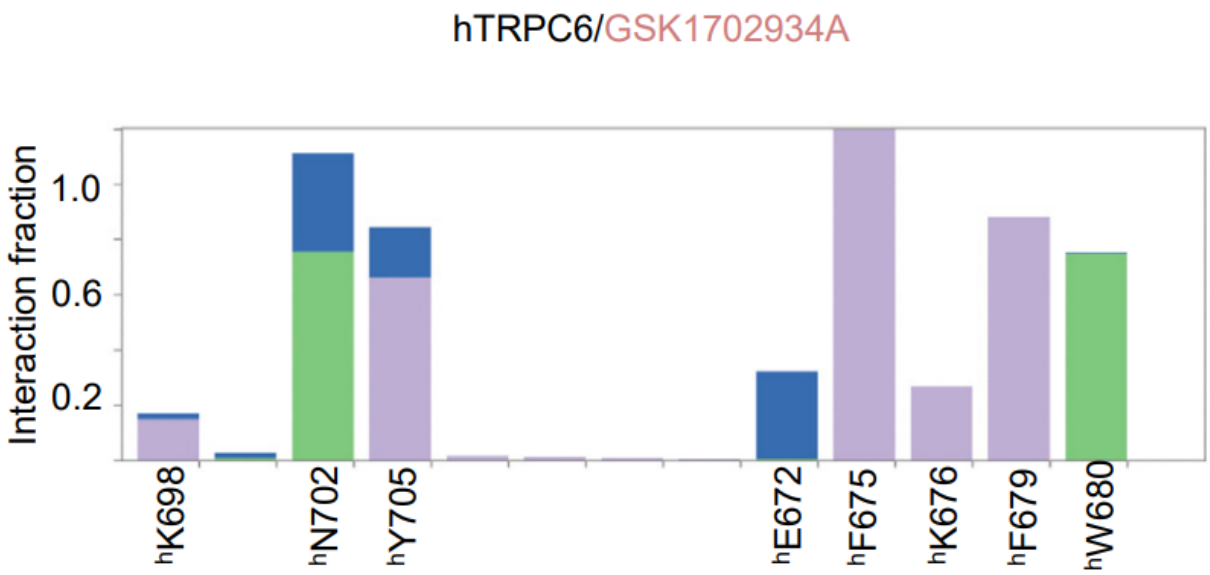
SISTEMA + BT11							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**Aminoácido**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	6,81	8,16	7,49	**6,63**	**0,90**
		Gly684	6,47	5,64	6,06		
		Leu723	7,72	7,28	7,50		
		Ile727	5,57	5,30	5,44		
		Phe731	8,55	4,82	6,69		
101	**10**	Phe683	9,53	7,18	8,36	**6,93**	**1,21**
		Gly684	7,06	6,19	6,63		
		Leu723	8,71	7,29	8,00		
		Ile727	5,79	5,41	5,60		
		Phe731	5,00	7,09	6,05		
201	**20**	Phe683	10,16	8,69	9,43	**7,28**	**1,55**
		Gly684	6,17	7,21	6,69		
		Leu723	8,01	8,60	8,31		
		Ile727	7,00	5,80	6,40		
		Phe731	4,75	6,45	5,60		
301	**30**	Phe683	6,69	10,80	8,75	**7,59**	**1,12**
		Gly684	6,43	8,31	7,37		
		Leu723	8,44	7,98	8,21		
		Ile727	6,93	4,67	5,80		
		Phe731	6,27	9,34	7,81		
401	**40**	Phe683	7,61	11,56	9,59	**8,27**	**1,30**
		Gly684	7,41	8,09	7,75		
		Leu723	10,62	7,82	9,22		
		Ile727	7,66	4,97	6,32		
		Phe731	7,23	9,74	8,49		
501	**50**	Phe683	7,35	11,22	9,29	**8,18**	**1,41**
		Gly684	7,21	7,26	7,24		
		Leu723	11,30	8,09	9,70		
		Ile727	6,80	5,81	6,31		
		Phe731	6,79	9,97	8,38		
601	**60**	Phe683	7,24	11,87	9,56	**8,40**	**1,52**
		Gly684	5,90	8,49	7,20		
		Leu723	9,61	8,82	9,22		
		Ile727	6,34	6,39	6,37		
		Phe731	9,13	10,22	9,68		
701	**70**	Phe683	8,97	12,01	10,49	**9,19**	**1,36**
		Gly684	9,04	9,07	9,06		
		Leu723	11,28	8,75	10,02		
		Ile727	7,32	6,61	6,97		
		Phe731	9,14	9,71	9,43		
801	**80**	Phe683	8,00	11,71	9,86	**8,22**	**1,63**
		Gly684	6,30	7,98	7,14		
		Leu723	10,66	9,42	10,04		
		Ile727	6,57	6,31	6,44		
		Phe731	5,39	9,84	7,62		
901	**90**	Phe683	7,92	13,67	10,80	**9,24**	**1,91**
		Gly684	7,97	9,43	8,70		
		Leu723	11,50	9,83	10,67		
		Ile727	6,52	5,82	6,17		
		Phe731	9,58	10,16	9,87		
1001	**100**	Phe683	8,02	11,74	9,88	**8,84**	**1,37**
		Gly684	7,38	8,42	7,90		
		Leu723	11,62	8,30	9,96		
		Ile727	7,02	6,76	6,89		
		Phe731	9,48	9,62	9,55		

SISTEMA + T18							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**Aminoácido**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	9,43	6,72	8,08	**7,32**	**0,91**
		Gly684	7,83	7,40	7,62		
		Leu723	7,91	8,03	7,97		
		Ile727	6,42	5,26	5,84		
		Phe731	7,50	6,68	7,09		
101	**10**	Phe683	10,89	8,73	9,81	**7,54**	**1,77**
		Gly684	6,85	6,95	6,90		
		Leu723	9,49	7,62	8,56		
		Ile727	6,64	3,61	5,13		
		Phe731	8,50	6,11	7,31		
201	**20**	Phe683	9,05	8,53	8,79	**8,12**	**1,70**
		Gly684	5,95	6,32	6,14		
		Leu723	9,71	9,60	9,66		
		Ile727	8,45	4,46	6,46		
		Phe731	10,39	8,74	9,57		
301	**30**	Phe683	10,71	8,33	9,52	**8,18**	**1,36**
		Gly684	7,24	8,52	7,88		
		Leu723	8,98	8,61	8,80		
		Ile727	6,25	5,73	5,99		
		Phe731	8,28	9,15	8,72		
401	**40**	Phe683	11,05	7,86	9,46	**8,97**	**1,44**
		Gly684	7,70	8,33	8,02		
		Leu723	9,79	11,22	10,51		
		Ile727	8,18	5,78	6,98		
		Phe731	8,70	11,04	9,87		
501	**50**	Phe683	10,68	8,76	9,72	**8,61**	**1,31**
		Gly684	7,14	8,50	7,82		
		Leu723	9,29	11,23	10,26		
		Ile727	7,27	7,12	7,20		
		Phe731	8,16	7,93	8,05		
601	**60**	Phe683	10,09	8,00	9,05	**8,75**	**1,38**
		Gly684	6,26	8,62	7,44		
		Leu723	9,93	12,06	11,00		
		Ile727	9,49	6,75	8,12		
		Phe731	7,98	8,34	8,16		
701	**70**	Phe683	10,06	9,61	9,84	**8,80**	**1,25**
		Gly684	6,04	8,47	7,26		
		Leu723	9,92	10,69	10,31		
		Ile727	8,10	8,12	8,11		
		Phe731	9,00	8,02	8,51		
801	**80**	Phe683	10,77	9,81	10,29	**9,30**	**1,72**
		Gly684	6,80	8,81	7,81		
		Leu723	10,30	10,52	10,41		
		Ile727	7,13	7,06	7,10		
		Phe731	10,15	11,65	10,90		
901	**90**	Phe683	8,69	9,77	9,23	**8,46**	**1,16**
		Gly684	5,51	8,92	7,22		
		Leu723	9,88	10,14	10,01		
		Ile727	8,14	6,97	7,56		
		Phe731	8,13	8,41	8,27		
1001	**100**	Phe683	8,84	8,73	8,79	**8,65**	**1,76**
		Gly684	5,48	7,92	6,70		
		Leu723	11,88	11,06	11,47		
		Ile727	8,68	7,25	7,97		
		Phe731	7,45	9,24	8,35		

SISTEMA + INV29							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**Aminoácido**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	6,71	7,64	7,18	**6,56**	**1,01**
		Gly684	5,20	6,87	6,04		
		Leu723	8,90	7,01	7,96		
		Ile727	5,88	4,92	5,40		
		Phe731	6,27	6,23	6,25		
101	**10**	Phe683	6,69	8,92	7,81	**7,28**	**1,12**
		Gly684	6,01	6,83	6,42		
		Leu723	8,82	8,98	8,90		
		Ile727	5,71	6,49	6,10		
		Phe731	4,49	9,84	7,17		
201	**20**	Phe683	6,77	8,81	7,79	**6,51**	**1,55**
		Gly684	7,00	6,04	6,52		
		Leu723	8,98	7,42	8,20		
		Ile727	5,87	5,38	5,63		
		Phe731	4,77	4,07	4,42		
301	**30**	Phe683	7,36	7,63	7,50	**6,30**	**1,54**
		Gly684	5,20	5,43	5,32		
		Leu723	8,53	8,23	8,38		
		Ile727	5,36	5,57	5,47		
		Phe731	5,74	3,96	4,85		
401	**40**	Phe683	8,73	7,20	7,97	**6,92**	**1,43**
		Gly684	5,99	5,60	5,80		
		Leu723	8,74	8,89	8,82		
		Ile727	5,90	5,08	5,49		
		Phe731	7,63	5,40	6,52		
501	**50**	Phe683	7,40	8,11	7,76	**6,85**	**1,15**
		Gly684	5,16	6,41	5,79		
		Leu723	9,52	7,27	8,40		
		Ile727	7,95	4,14	6,05		
		Phe731	7,40	5,16	6,28		
601	**60**	Phe683	7,56	6,33	6,95	**6,71**	**1,34**
		Gly684	5,89	4,22	5,06		
		Leu723	9,40	6,94	8,17		
		Ile727	6,60	4,67	5,64		
		Phe731	8,11	7,38	7,75		
701	**70**	Phe683	9,78	6,39	8,09	**7,40**	**1,10**
		Gly684	6,20	6,45	6,33		
		Leu723	9,04	8,01	8,53		
		Ile727	6,19	6,01	6,10		
		Phe731	6,70	9,20	7,95		
801	**80**	Phe683	9,85	7,97	8,91	**8,01**	**1,32**
		Gly684	6,98	7,68	7,33		
		Leu723	10,05	8,83	9,44		
		Ile727	6,32	5,93	6,13		
		Phe731	8,38	8,11	8,25		
901	**90**	Phe683	8,63	7,14	7,89	**7,98**	**1,45**
		Gly684	6,33	6,89	6,61		
		Leu723	11,49	8,90	10,20		
		Ile727	7,18	6,38	6,78		
		Phe731	8,95	7,87	8,41		
1001	**100**	Phe683	9,90	7,96	8,93	**8,34**	**1,42**
		Gly684	6,71	6,11	6,41		
		Leu723	11,25	9,04	10,15		
		Ile727	8,84	6,22	7,53		
		Phe731	8,94	8,44	8,69		

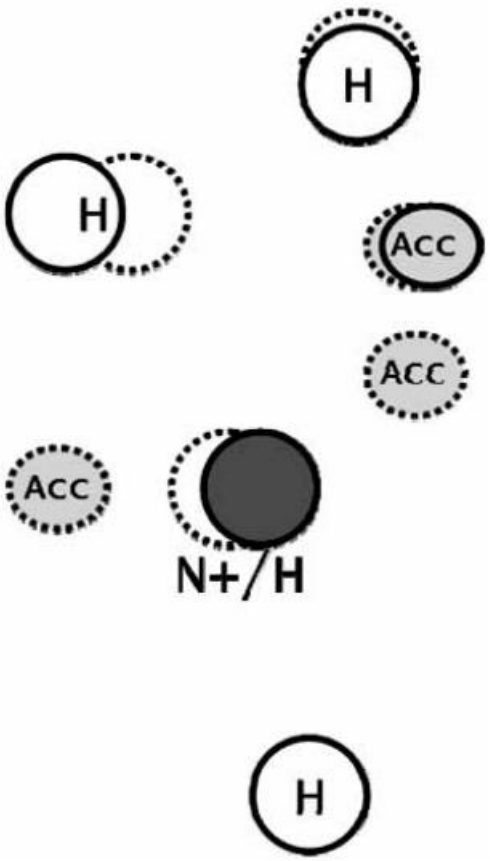
SISTEMA + SOH95							
N° Frame	**Tiempo de simulación (ns)**	**AA**	**Diámetro A-C (Å)**	**Diámetro B-D (Å)**	**Diámetro Promedio A-C y B-D (Å)**	**Diámetro Promedio Final (Å)**	**DE Final**
1	**0**	Phe683	7,07	8,48	7,78	**7,42**	**0,93**
		Gly684	7,02	7,87	7,45		
		Leu723	7,68	8,36	8,02		
		Ile727	5,47	6,14	5,81		
		Phe731	6,45	9,62	8,04		
101	**10**	Phe683	7,57	8,51	8,04	**6,98**	**1,08**
		Gly684	5,95	5,80	5,88		
		Leu723	8,07	8,38	8,23		
		Ile727	7,03	5,97	6,50		
		Phe731	7,02	5,52	6,27		
201	**20**	Phe683	7,10	7,54	7,32	**7,52**	**0,84**
		Gly684	7,09	6,07	6,58		
		Leu723	8,85	8,92	8,89		
		Ile727	7,27	7,34	7,31		
		Phe731	8,10	6,89	7,50		
301	**30**	Phe683	6,93	9,37	8,15	**8,47**	**1,27**
		Gly684	7,99	6,66	7,33		
		Leu723	10,02	8,69	9,36		
		Ile727	6,96	7,72	7,34		
		Phe731	7,16	13,24	10,20		
401	**40**	Phe683	8,07	6,79	7,43	**8,02**	**1,19**
		Gly684	6,72	6,56	6,64		
		Leu723	10,43	9,05	9,74		
		Ile727	6,40	8,96	7,68		
		Phe731	6,50	10,67	8,59		
501	**50**	Phe683	8,82	7,84	8,33	**8,72**	**1,76**
		Gly684	5,99	6,71	6,35		
		Leu723	9,46	9,15	9,31		
		Ile727	8,63	8,21	8,42		
		Phe731	9,31	13,12	11,22		
601	**60**	Phe683	8,89	8,66	8,78	**8,62**	**1,78**
		Gly684	7,09	8,63	7,86		
		Leu723	7,93	9,33	8,63		
		Ile727	6,38	6,58	6,48		
		Phe731	11,78	10,94	11,36		
701	**70**	Phe683	7,41	9,33	8,37	**8,13**	**2,23**
		Gly684	5,85	5,62	5,74		
		Leu723	10,21	9,17	9,69		
		Ile727	6,49	5,53	6,01		
		Phe731	12,10	9,54	10,82		
801	**80**	Phe683	7,82	8,41	8,12	**8,18**	**2,42**
		Gly684	5,95	5,93	5,94		
		Leu723	7,94	8,86	8,40		
		Ile727	6,60	6,15	6,38		
		Phe731	9,72	14,42	12,07		
901	**90**	Phe683	7,56	9,32	8,44	**8,49**	**2,54**
		Gly684	6,40	5,80	6,10		
		Leu723	9,11	8,61	8,86		
		Ile727	6,45	6,61	6,53		
		Phe731	9,38	15,61	12,50		
1001	**100**	Phe683	8,00	6,95	7,48	**8,31**	**2,07**
		Gly684	6,87	4,74	5,81		
		Leu723	10,84	9,23	10,04		
		Ile727	7,38	7,42	7,40		
		Phe731	12,18	9,47	10,83		

Anexo 4: Contactos Proteína-Ligando del agonista GSK1702934A reportados por Yang et al. [56].



Anexo 4. Contactos proteína-ligando del agonista GSK1702934A en complejo con el TRPC6 humano. **Referencia:** Yang et al. [56].

Anexo 5: Farmacóforo general para el bloqueo del canal hERG [108].



Anexo 5. Farmacóforo general para bloqueadores de hERG. El modelo incluye características propuestas previamente para los principales bloqueadores básicos y neutros de hERG. H: Hidrofóbico; Acc: Aceptor de puente de hidrógeno; N+/H: Amina básica protonable o grupo neutro. **Referencia:** Aronov A [108].