



Facultad de Ingeniería.  
Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática.

Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Bioinformática.

---

Compuestos Naturales con rol agonista o antagonista en  
canales de potasio específicos.

Marcelo Christian Ibañez Honorato.

---

Profesor Tutor: Dra. Wendy González.

Profesor Informante: Dr. Jans Alzate-Morales.

Co-Tutor: Dr. David Ramírez.

Co-Tutora: Javiera Baeza.

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Agradecimientos</b> .....	6
<b>1.- Introducción</b> .....	7
<b>1.1.- Canales Iónicos.</b> .....	7
<b>1.2.- Tipos de Canales Iónicos.</b> .....	8
<b>1.3.- Familia de Canales de Potasio.</b> .....	8
<b>1.3.1.- Canales de potasio activados por voltaje (KV).</b> .....	9
<b>1.3.2.- Canales de potasio activados por calcio (KCa)</b> .....	11
<b>1.3.3.- Canales de potasio de dos dominios de poro (K2P).</b> .....	12
<b>1.4.- Farmacóforo.</b> .....	14
<b>1.4.1.- Farmacóforos de referencia.</b> .....	15
<b>1.4.2.- Farmacóforo con acción antagonista en los canales TASK-1 y Kv1.5</b> .....	16
<b>1.4.3.- Farmacóforo agonista de los canales TREK-2, BKCa y hERG.</b> .....	19
<b>1.5.- Compuestos Naturales.</b> .....	21
<b>2.- Hipótesis</b> .....	22
<b>3.- Objetivo General y Específicos.</b> .....	23
<b>3.1.- Objetivo General.</b> .....	23
<b>3.2.- Objetivos Específicos.</b> .....	23
<b>4.- Metodología</b> .....	24
<b>4.1.- Diagrama Metodología.</b> .....	24
<b>4.2.- Generación de la Base de Datos de Compuestos Naturales (CN).</b> .....	24
<b>4.3.- Cribado virtual basado en los farmacóforos de referencia.</b> .....	26
<b>4.4.- Obtención y preparación de las estructuras de los canales de potasio.</b> ..	27
<b>4.5.- Realizar cribado virtual de alto rendimiento basado en estructura entre los 5000 mejores CNs y los canales de potasio.</b> .....	28
<b>4.6.- Cálculos de energía libre de unión (MMGBSA)</b> .....	29
<b>4.7.- Dinámica molecular de los complejos canal de potasio - CN agonista/antagonista obtenidos desde los acoplamiento moleculares.</b> .....	29
<b>4.8.- Cálculos de desviación media cuadrática (RMSD).</b> .....	30
<b>4.9.- Análisis de contactos/interacción entre el compuesto natural y los residuos del sitio de unión de la proteína.</b> .....	31
<b>5.- Resultados y Discusión</b> .....	32

<b>5.1.- Generar una Base de Datos Unificada de compuestos naturales, mediante el uso de BDs en línea.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.- Realizar un cribado virtual basado en los farmacóforos de referencia agonista y antagonista.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3.- Cribados basados en estructura.....</b>	<b>33</b>
<b>5.4.- Criterios de selección del CN candidato a agonista .....</b>	<b>35</b>
<b>5.5.- Criterios de selección del CN candidato a antagonista. ....</b>	<b>37</b>
<b>5.6.- Realizar una dinámica molecular para cada canal con el CN correspondiente, e interpretar los resultados mediante análisis de trayectorias.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6.1.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal hERG.....</b>	<b>39</b>
<b>5.6.2.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal BKCa.....</b>	<b>43</b>
<b>5.6.3.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal TREK-2.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6.4.- Análisis de trayectoria del ligando ZINC9708083 en el canal TASK-1.....</b>	<b>49</b>
<b>5.6.5.- Análisis de trayectoria del ligando ZINC9708083 con el canal Kv1.5.....</b>	<b>51</b>
<b>6.- Conclusión.....</b>	<b>55</b>
<b>7.- Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
<b>8.- Imágenes y Tablas suplementarias.....</b>	<b>64</b>

## Resumen

Los canales iónicos de potasio ( $K^+$ ) son proteínas transmembranales que permiten el flujo selectivo de  $K^+$  a través de la membrana celular. Estos canales se expresan en diversos tejidos que poseen roles fundamentales en el funcionamiento del organismo, por lo que al fallar los canales de  $K^+$  (por mutaciones, drogas, toxinas, enfermedades, etc.) se pueden desencadenar varias patologías. Diversas investigaciones han logrado modelar dos farmacóforos que poseen una relación directa con la activación y el bloqueo de canales de  $K^+$ . El modelo de farmacóforo antagonista se aplica a compuestos que modulan los canales TASK-1 y Kv1.5 (relacionados con fibrilación auricular) y el otro farmacóforo está contenido en moléculas agonistas de los canales TREK-2, hERG y BKCa. Estos últimos compuestos agonistas podrían aplicarse en enfermedades como accidentes cerebrovasculares (isquemias) o epilepsia, promoviendo la apertura simultánea de canales neuroprotectores como BKCa y TREK-2.

Los compuestos naturales (CN) son moléculas químicas provenientes de fuentes naturales tales como animales, plantas, hongos, algas, etc., cuya estructura química puede estar disponible en bases de datos gratuitas o comerciales. Estas moléculas pueden utilizarse como base para el desarrollo de nuevas drogas, empleándose como agentes terapéuticos. Se utilizó modelado computacional y diversas técnicas bioinformáticas, tales como cribado virtual basado en farmacóforo, cribado virtual de alto rendimiento basado en estructura, dinámicas moleculares (DMs) y análisis de trayectorias de DMs, para encontrar compuestos naturales que posean una actividad antagonista (sobre TASK-1 y Kv1.5) o agonista (sobre TREK-2, hERG y BKCa). Apoyado en los análisis anteriores, se escogieron los compuestos ZINC000009708083 como antagonista y CNP0365891 como agonista, los cuales podrían ser relevantes en el desarrollo de nuevos fármacos para tratar la fibrilación auricular, accidentes cerebrovasculares (isquemias) o epilepsia.

## **Abstract**

Potassium ( $K^+$ ) channels are transmembrane proteins that allow the selective flow of  $K^+$  across the membrane. Many of these channels are expressed in various tissues, playing fundamental roles in the proper functioning of the organism. The failure of these channels can trigger various pathologies. Two separate investigations have been able to model two pharmacophores that have a direct relationship with the activation and blocking of  $K^+$  channels. The antagonist pharmacophore model applies to compounds that modulate TASK-1 and Kv1.5 channels (related with atrial fibrillation) and the other pharmacophore model belongs to agonist molecules of TREK-2, hERG and BKCa channels. The agonist compounds could be used in diseases such as stroke (ischemia), epilepsy and pain, promoting the simultaneous opening of neuroprotective channels such as BKCa and TREK-2.

Natural Compounds (NC) are chemical molecules from animals or plants that can be found in free and commercial databases. They are an important source for drug development, in their natural conformation or as lead compounds for the development of new drugs. We proposed that it would be possible to find natural compounds with an antagonist role (in TASK-1 and Kv1.5 channels) or agonist role (in TREK-2, hERG and BKCa channels). These selected compounds could be relevant in the development of new drugs against atrial fibrillation, stroke (ischemia), epilepsy or pain.

## **Agradecimientos**

A mis padres Marcelo y Valeska. No pude haber pedido unos mejores padres, muchas gracias por todo.

A mis hermanos Nhavezka y Matías, que siempre me han apoyado en todo lo que he querido hacer.

A mis primos Nicolets y Claudio, los cuales son mis segundos hermanos y un pilar fundamental para mí.

A mis múltiples tíos, en especial a mis segundos padres, a mi hermano mayor y a mi tía favorita, los amo.

A mi mejor amiga Javiera, quien me ayudo a superar esta carrera haciéndola más amena.

Y a mí, por nunca haberme rendido.

# 1.- Introducción

## 1.1.- Canales Iónicos.

Los diferentes tipos de células que componen los organismos vivos se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica. Esta se encarga de proteger y darle estabilidad a la célula. Para que las distintas moléculas puedan atravesar la membrana lipídica, existe un conjunto de proteínas de membrana encargadas del transporte (Tan et al., 2008). Un ejemplo de esas proteínas transmembranales son los canales iónicos. Estos poseen en su estructura un poro que permite el paso de iones entre las regiones extra e intracelular.

La estructura cuaternaria y funcional de los canales iónicos contiene de 1 a 4 (o más) subunidades que pueden ser iguales o diferentes. Regularmente, las subunidades formadoras de poro son llamadas alfa " $\alpha$ ", y las subunidades accesorias se denominan beta " $\beta$ " o gamma " $\gamma$ " (Puig, 2020).

Los canales se encuentran ligados a diversos procesos biológicos y han sido investigados a fondo para entender su rol y mecanismo molecular. Actúan en procesos como la contracción muscular, generar potenciales de acción en el corazón para regular el ritmo cardiaco, e intervenir en el correcto funcionamiento de los axones (Burke y Bender 2019; Kiper y col., 2015; Kurczyńska y col., 2017; Rubaiy, 2017). Si estos canales fallan se desarrollan diversas enfermedades, por ejemplo canalopatías, a consecuencia de mutaciones que ocurren en los aminoácidos que componen los canales iónicos.

Algunos de estos canales permiten el paso de iones específicos según su tipo o carga, adquiriendo la característica de permeabilidad selectiva. Los iones cargados más comunes que atraviesan los canales iónicos son los de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . El número de iones que atraviesan el poro de los canales es bastante alto, llegando a traspasar  $10^8$  iones por segundo (Capener, 2002).

Existen dos tipos de mecanismos de transporte a través de la membrana plasmática, los cuales son el activo y pasivo. Las diferencias que poseen es que el primero desplaza las sustancias en contra del gradiente de concentración, requiriendo un gasto energético para poder realizarlo. Mientras que el transporte pasivo es a favor de

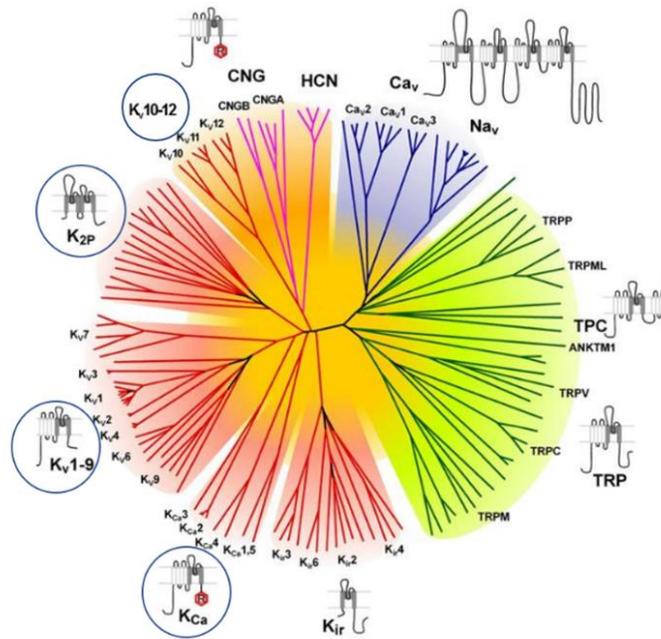
gradiente, por lo que no requiere energía para efectuarse (Martínez-Serrano y col., 2021; Puig, 2020), debido a que el gradiente de concentración entrega la energía potencial necesaria para realizar el transporte (Audesirk y col., 2003).

### **1.2.- Tipos de Canales Iónicos.**

Los canales iónicos se pueden dividir de variadas formas, entre ellas por el estado del poro: canales que poseen su poro siempre abierto, permitiendo un paso constante de iones entre las regiones extra e intracelular o aquellos que poseen un mecanismo de compuerta, generando un estado cerrado que impide el transporte de moléculas. Estos últimos canales se activan cuando estímulos específicos los modulan, logrando que la compuerta se abra y permita el paso de iones a través de la bicapa lipídica. Los canales que poseen el mecanismo de compuerta pueden ser divididos a su vez en tres tipos (o más) de canales iónicos de acuerdo con el estímulo que abre la compuerta. Estos son, por ejemplo, los canales iónicos mecanosensibles, los activados por voltaje o activados por calcio (Lewis y Grandl, 2021; Petkov, 2009).

### **1.3.- Familia de Canales de Potasio.**

Los canales iónicos de potasio están presentes en células de todos los organismos (Miller, 2000). Estas proteínas transmembranales conducen los iones de  $K^+$  a favor del gradiente, presentando selectividad para este tipo de ión. Contribuyen al correcto funcionamiento del potencial de reposo y del potencial de acción (Nieves-Cordones y col., 2016). Esta familia de canales posee distintas subfamilias, como los canales de potasio activados por sodio (Slack) o calcio ( $K_{Ca}$ ) (Bausch y col., 2015), canales de potasio rectificadores de entrada (Kir) (Hibino y col., 2019), canales activados por voltaje (Kv), los canales de potasio de dos dominios de poro ( $K_2P$ ), los canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN) y los canales activados por nucleótido cíclico (CNG). En este trabajo se tiene como objetivo de estudio los canales de  $K^+$  activados por voltaje, activados por  $Ca^{2+}$  y  $K_2P$ . En la Figura 1 se señalan las subfamilias de canales que se estudiarán en este trabajo.



**Figura 1: Árbol Filogenético de Canales Iónicos.** Los canales empleados en el trabajo se encuentran encerrados en un círculo azul. Figura extraída de la publicación doi.org/10.1124/pr.57.4.13

### 1.3.1.- Canales de potasio activados por voltaje (KV).

Estos canales iónicos pueden ser activados mediante la despolarización del potencial de membrana y poseen un rol directo en las comunicaciones eléctricas entre las células (de Lera Ruiz y Kraus, 2015). Hay algunos de estos canales que, al activarse, actúan en la fase de repolarización del potencial acción. Estos se pueden encontrar en los tejidos del corazón y cerebro. Estructuralmente, pueden estar conformados por cuatro subunidades  $\alpha$ , en donde cada subunidad posee seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 posee residuos cargados positivamente, los cuales interactúan con las señales eléctricas del medio para producir el cambio conformacional necesario para la apertura del canal (de Lera Ryus y Kraus, 2015; Zhang y col., 2018). Los segmentos S5 y S6 forman el dominio del poro (Lai y Jan, 2006). Cada canal puede poseer, aparte de las subunidades  $\alpha$ , subunidades accesorias.

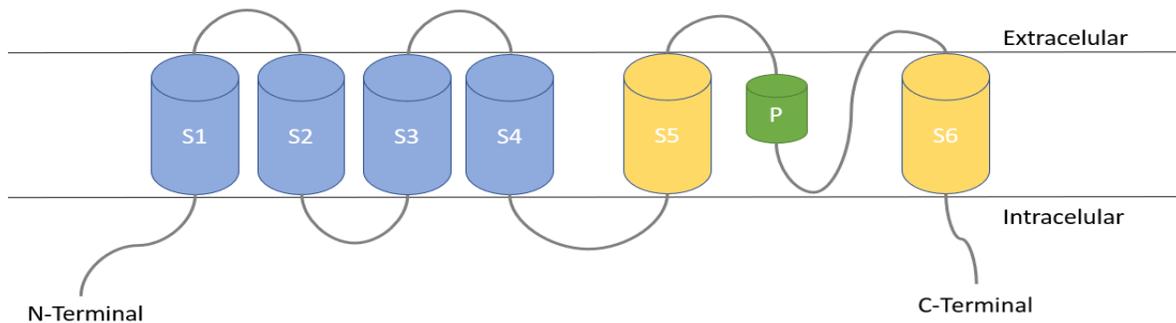
### **1.3.1.1.- Canales hERG y Kv1.5.**

Kv11.1 o hERG (codificado por el gen KCNH2) es un canal iónico de potasio perteneciente a la familia de canales activados por voltaje. Este canal se expresa en diversos tejidos, mostrando un rol fundamental cuando se encuentra expresado en el corazón, debido a que esta proteína se encuentra ligada a la repolarización del potencial de acción cardíaco (Saxena y col., 2016). Debido a esto, si es que el canal llegara a funcionar de una forma errónea no podría tener lugar la repolarización cardíaca, desarrollándose una arritmia (Rampe y Brown, 2013). Por tanto, este canal ha sido investigado intensivamente, llegando a comprender su estructura, función, moléculas con que interactúa, etc. Esta información puede ser usada con la finalidad de generar drogas que no bloqueen el canal hERG (Rampe y Brown, 2013; Saxena y col., 2016). La FDA (Food and Drug Administration, USA) que es la responsable de la regulación de alimentos y drogas solicita que todos los fármacos en desarrollo no deben bloquear el canal hERG. Si una droga llegara a bloquear este canal se podría desarrollar el síndrome QT largo debido a la alteración en la repolarización ventricular (Doggrell y Hancox, 2014; Medeiros-Domingo y col., 2007; Witchel, 2011). El síndrome QT largo es una medida realizada en un electrocardiograma que es usada para estudiar algunas propiedades del corazón.

El canal Kv1.5 (codificado por el gen KCN5), al igual que hERG, es un canal activado por voltaje. Este se expresa regularmente en el corazón, siendo específico de la aurícula, mostrando relación directa con la corriente de potasio ultrarrápida retardada (I<sub>kur</sub> – Ultra-Rapid Delayed Rectifier Potassium Current). Por tanto, Kv1.5 es un blanco para el desarrollo de drogas bloqueadoras de I<sub>kur</sub>, para el tratamiento de la fibrilación auricular (Brendel y Preukert, 2003; Wettwer y Terlau, 2014). Este canal no se expresa solamente en tejidos del corazón, también se puede encontrar en células endocrinas (Levitan y col., 1995) o en tejidos del cerebro (Vicente y col., 2006).

Estructuralmente, hERG y Kv1.5 son canales similares debido a que ambos son activados por voltaje. Poseen cuatro subunidades (formando un homotetrámero), en donde cada subunidad posee seis segmentos transmembranales (S1-S6). Entre el segmento S1 y S4 se forma la sección del canal que es sensible a voltaje, en donde el segmento S4 posee cargas positivas. Los segmentos S5 y S6 conforman el dominio

del poro. En la Figura 2 se puede observar cómo están dispuestos los segmentos S1-S6 en una subunidad del canal.



**Figura 2: Topología de una subunidad de los canales activados por voltaje (Kv1.5 y hERG).** Los segmentos de color azul son el sensor de voltaje y los segmentos de color amarillo son los que forman el poro. Entre S5 y S6 se encuentra el sitio conservado del poro (secuencia TTVGYG para Kv1.5 y TSVGFG para hERG) de color verde.

### 1.3.2.- Canales de potasio activados por calcio (KCa)

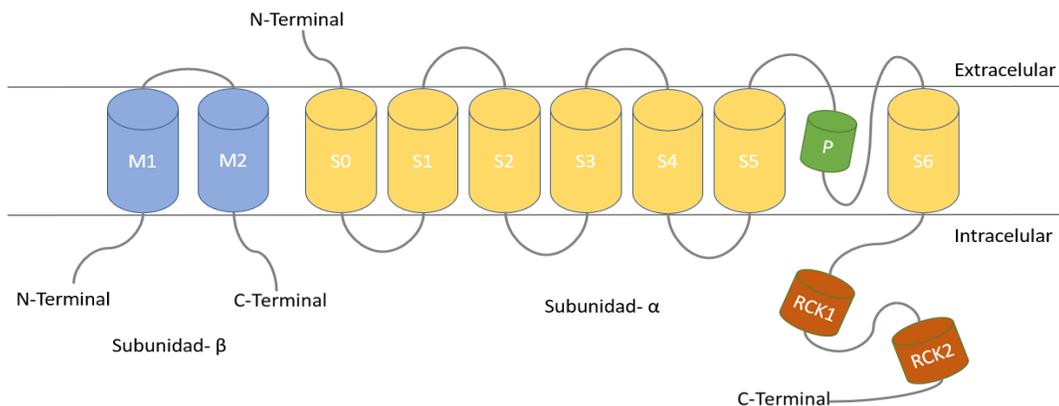
Los canales de  $K_{Ca}$  son activados por la concentración de calcio  $Ca^{2+}$  intracelular (Vetri y col., 2014). Se pueden agrupar en tres categorías: (1) Canales de gran conductancia (BK), (2) Canales de conductancia intermedia (IK) y (3) Canales de pequeña conductancia (SK), siendo los canales BK el grupo más diverso de canales de  $K^+$  activados por calcio (Weaver y col., 2006). Esta subfamilia de canales de potasio está ligada principalmente a la regulación de la excitabilidad neuronal (Vergara y col., 1998), la proliferación y la migración celular, la liberación de neurotransmisores (Wright y col., 2009) y la regulación del ritmo cardiaco (Lacinová y Hofmann, 2001).

#### 1.3.2.1.- Canal BKCa

El canal  $BK_{Ca}$  es un canal de potasio de gran conductancia. Este es activado por voltaje, al igual que los canales Kv1.5 y hERG, pero la diferencia que posee es que el canal  $BK_{Ca}$  puede ser activado por calcio ( $Ca^{2+}$ ).  $BK_{Ca}$  es un tetrámero al igual que Kv1.5 y hERG, se encuentra compuesto por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Las subunidades  $\alpha$  se encuentran conformadas por siete segmentos transmembranales (S0-S6), responsables de la selectividad y conducción de iones (Ma y col., 2006; Vetri y col., 2014) y entre S5 y S6 se forma el dominio del poro. El amino-terminal de la subunidad

$\alpha$  se encuentra en la región extracelular, mientras que el carboxi-terminal se encuentra en el citoplasma.

La subunidad  $\alpha$  posee sitios de unión de calcio (RCK1) y sitios de fosforilación (RCK2) (Singh y col., 2012; Vetri y col., 2014). Las subunidades  $\beta$  se forman por dos segmentos transmembranales que se encuentran unidos mediante un *loop* extracelular (LE). Cabe mencionar que los extremos N-terminal y C-terminal de la subunidad  $\beta$  se encuentran en la región citoplasmática. Esta subunidad posee un rol importante en el óptimo funcionamiento del canal, por lo que es primordial que se encuentren las cuatro subunidades  $\beta$ , es decir, una por cada subunidad  $\alpha$  (Vetri y col., 2014). En la Figura 3 se puede observar la topología de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de BK<sub>Ca</sub>, con sus segmentos transmembranales correspondientes.

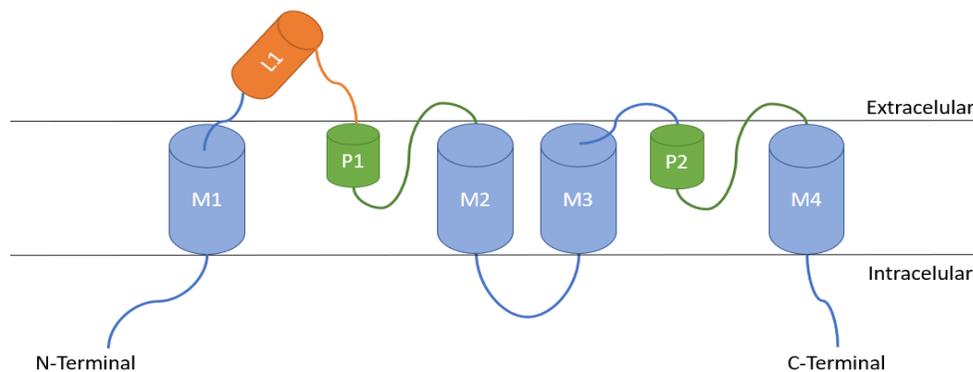


**Figura 3: Topología de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del canal BK<sub>Ca</sub>.** Se pueden observar en color azul los dos segmentos transmembranales de la subunidad beta (M1 y M2), y en color amarillo los segmentos de la subunidad alfa (S0-S6). Entre S5 y S6 se encuentra el sitio conservado del poro (secuencia STVGYG) de color verde. S6 posee unido a él un sitio de unión de calcio (RCK1) y un sitio de fosforilación (RCK2).

### 1.3.3.- Canales de potasio de dos dominios de poro (K2P).

La familia de canales K<sub>2</sub>P recibe este nombre porque los canales poseen dos dominios de poro (dominios P) por subunidad. Entre las tantas funciones que poseen, se encargan de regular el intercambio de iones K<sup>+</sup> controlando la excitabilidad neuronal (Plant y col., 2005). Por otro lado, se pueden encontrar ligados a la secreción de hormonas (Kim y Kang, 2015) y a la homeostasis iónica (Feliciangeli y col., 2015). Cabe destacar que los canales K<sub>2</sub>P se agrupan en seis subfamilias: TREK, TALK, TWIK, TASK, THIK y TRESK (Baggetta y col., 2021; Gada y Plant, 2019).

TWIK-1 fue la primera estructura cristalizada de estos canales, logrando verificar que estos forman un dímero. Cada subunidad se encuentra compuesta por dos dominios P (P1 y P2) generando el poro funcional. Los dominios P se encuentran cada uno entre dos segmentos transmembranales (M1-M2/ M3-M4); mostrando también un *loop* (L1) extracelular entre M1 y P1, el cual interactúa con la otra subunidad (Feliciangeli y col., 2015). Los segmentos amino y carboxilo terminal se encuentran en el citoplasma. Observando la Figura 4 se entenderá de mejor forma cómo es una subunidad del dímero con sus dos poros y cuatro segmentos transmembranales.



**Figura 4: Topología de los canales  $K_2P$** , en donde se observan los dos dominios de poro (P1 y P2), con la secuencia conservada del filtro de selectividad en verde (TTIGYG/TTIGFG para TASK-1 y TTIGYG/TTVGFG para TREK-2). Los dominios de poro están formados por los segmentos transmembranales M1-M2 y M3-M4. De color naranja está el loop de la región extracelular que interactúa con la otra subunidad para formar el dímero

### 1.3.3.1.- Canales TASK-1 y TREK-2.

TASK-1 (codificado por el gen KCNK3) es un canal perteneciente a la subfamilia TASK de los canales  $K_2P$ . Este canal posee una alta sensibilidad a alteraciones en el pH extracelular, siendo inactivado por pH ácido (Herrera-Pérez y col., 2021). Estos canales se expresan en tejidos del pulmón (Olschewski y col., 2017), cerebro (Kanjhan y col., 2021; Karschin y col., 2001) y corazón (Donner y col., 2011), teniendo un rol fundamental en las actividades de cada órgano. Contribuyen a la relajación arterial y en el potencial de membrana en reposo (Rödström y col., 2019). TASK-1 es totalmente inhibido por serotonina y norepinefrina (Talley y col., 2000). Es un canal que posee bastante atención en el ámbito del desarrollo de drogas debido a que se une fuertemente a sus antagonistas, en el orden de nanomolar (Rödström y col., 2019).

Por otro lado, el canal TREK-2 (codificado por el gen KNCK10) también es un miembro de la familia  $K_2P$ , encontrándose en la subfamilia TREK. TREK-2 es un canal mecanosensible. Además, es regulado por diversas señales intracelulares (Lengyel y col., 2020) tales como pH, temperatura y presión en la membrana (Brennecke y de Groot, 2018). Se puede encontrar expresado, al igual que TASK-1, en tejidos del cerebro (Talley y col., 2003), pulmón (Schwingshackl y col., 2017) y corazón. Este canal puede ser activado por los compuestos BL-1249, ML67-33 (Schewe y col., 2019), ácido linoleico, entre otros. Posee un rol importante en la sensación del dolor, llegando a ser investigado como posible diana biológica para el tratamiento del dolor neuropático (Dadi y col., 2017). Por otro lado, este canal también ha sido investigado como posible diana para tratar los accidentes cerebrovasculares (isquemias) y epilepsia (Zhao y col., 2019), mediante el desarrollo de compuestos agonistas. Es relevante mencionar que estos dos canales poseen una topología similar a la representada en la Figura 4.

#### **1.4.- Farmacóforo.**

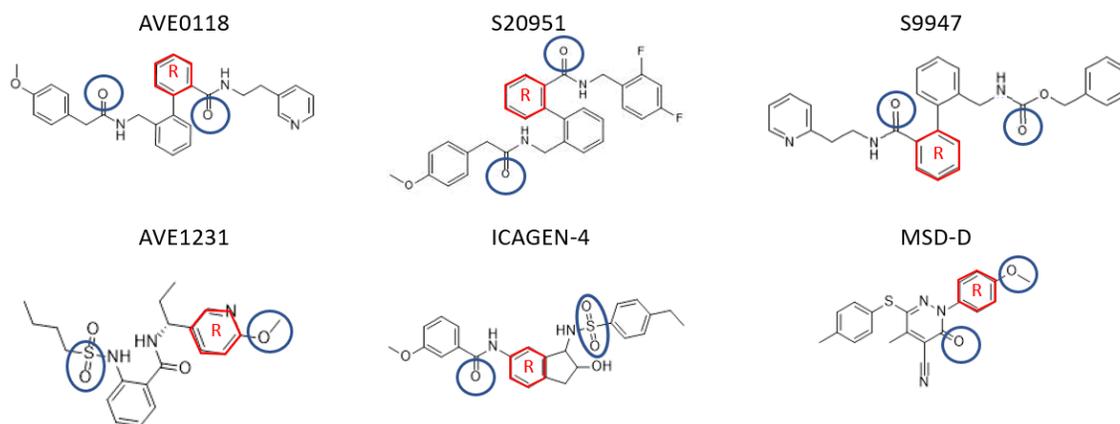
Según la IUPAC, un farmacóforo es *“un conjunto de características estéricas y electrónicas necesarias para garantizar las interacciones supramoleculares óptimas de una molécula con una diana biológica específica, y para desencadenar o bloquear su respuesta biológica”* (Prieto-Martínez y col., 2016; Wermuth y col., 1998). Las características del farmacóforo pueden ser contactos hidrofóbicos o aromáticos, interacciones iónicas, generación de puentes de hidrógeno, entre otras (Kaserer y col., 2015).

Generalmente, los modelos de farmacóforo se utilizan en la búsqueda de nuevas drogas, las cuales deben cumplir la mayor cantidad de cualidades que posee el farmacóforo a utilizar. Esto es posible mediante el uso de programas, como por ejemplo Ligand Scout (Wolber y Langer, 2005), y técnicas computacionales como el cribado virtual. Los farmacóforos se pueden crear basándose en una estructura definida, como el sitio de unión de los compuestos en la diana biológica, o según los ligandos que interactúan con ella (Seidel y col., 2020). Los farmacóforos pueden ser, (1) Generados mediante una librería de compuestos, con la finalidad de que el

farmacóforo posea las características comunes entre todos los compuestos (Ramírez y col., 2019) o (2) Producidos mediante la estructura de la diana biológica, obteniendo un farmacóforo con los átomos que deberían generar interacciones (Gallego-Yerga y col., 2021), esto quiere decir que el farmacóforo puede modelarse en base al receptor o compuestos.

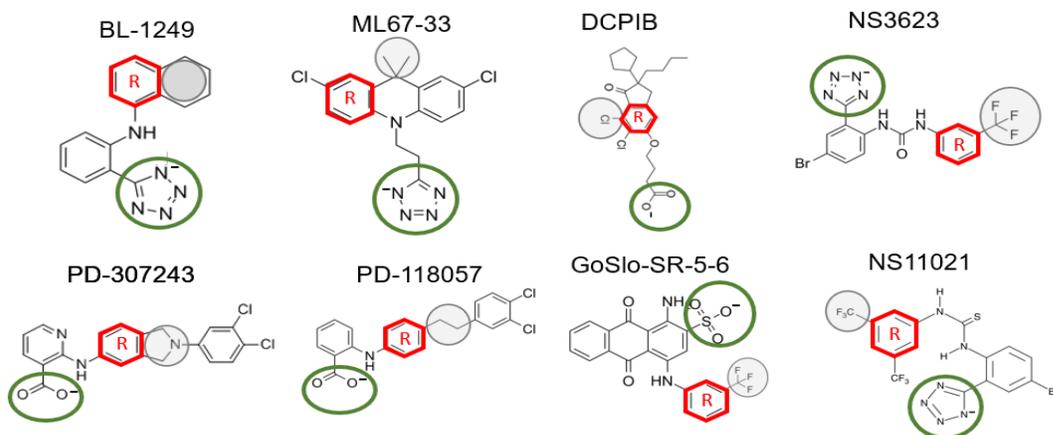
#### 1.4.1.- Farmacóforos de referencia.

Kiper y col. (2015) y Schewe y col. (2019) generaron dos farmacóforos distintos basados en ligandos que interactúan con canales de  $K^+$ . Los ligandos utilizados por Kiper y col. (2015) para desarrollar el farmacóforo se pueden observar en la Figura 5. Estos compuestos, que bloquean los canales Kv1.5 y TASK-1, poseen dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno y un anillo aromático. Se utilizaron estas 6 drogas para modelar el farmacóforo antagonista.



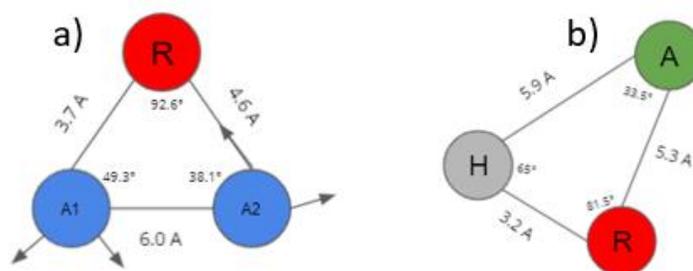
**Figura 5: Compuestos utilizados por Kiper y col. (2015) para modelar el farmacóforo antagonista.** Los grupos aceptores de enlace de hidrógeno se encuentran encerrados en azul, y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.

Los compuestos usados por Schewe y col. (2019) para modelar el farmacóforo agonista se observan en la Figura 6. Estos ligandos son activadores de los canales TREK-2, BKCa y hERG y están cargados negativamente (NCA). Poseen un grupo hidrofóbico, un grupo cargado negativamente y un anillo aromático.



**Figura 6: Compuestos utilizados por Schewe y col. (2019) para el modelado del farmacóforo de los NCAs.** Los grupos cargados negativamente se encuentran encerrados en un círculo verde, el grupo hidrofóbico en un círculo gris, y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.

En la Figura 7 se pueden observar las características de los dos farmacóforos, donde el de la izquierda es el desarrollado por Kiper y col. (2015), mientras que el de la derecha fue generado por Schewe y col. (2019). Estos modelos serán empleados para buscar y obtener compuestos que puedan inhibir o activar alguno de los 5 canales ya mencionados, según corresponda el grupo.



**Figura 7: Farmacóforos de referencia para obtener compuestos naturales que los contengan.** Se pueden observar las distancias y ángulos entre los grupos que conforman cada farmacóforo. a) Modelo de farmacóforo planteado por Kiper y col. (2015). Este se encuentra compuesto por dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno de color azul y un anillo aromático de color rojo. b) Modelo de farmacóforo propuesto por Schewe y col. (2019). Está compuesto por un anillo aromático de color rojo, un grupo hidrofóbico de color gris, y un grupo cargado negativamente de color verde.

#### 1.4.2.- Farmacóforo con acción antagonista en los canales TASK-1 y Kv1.5

Kiper y col. (2015) lograron diseñar el farmacóforo expuesto en la Figura 7a luego de observar como 6 compuestos bloqueadores de Kv1.5 (Figura 5), actuaban también en

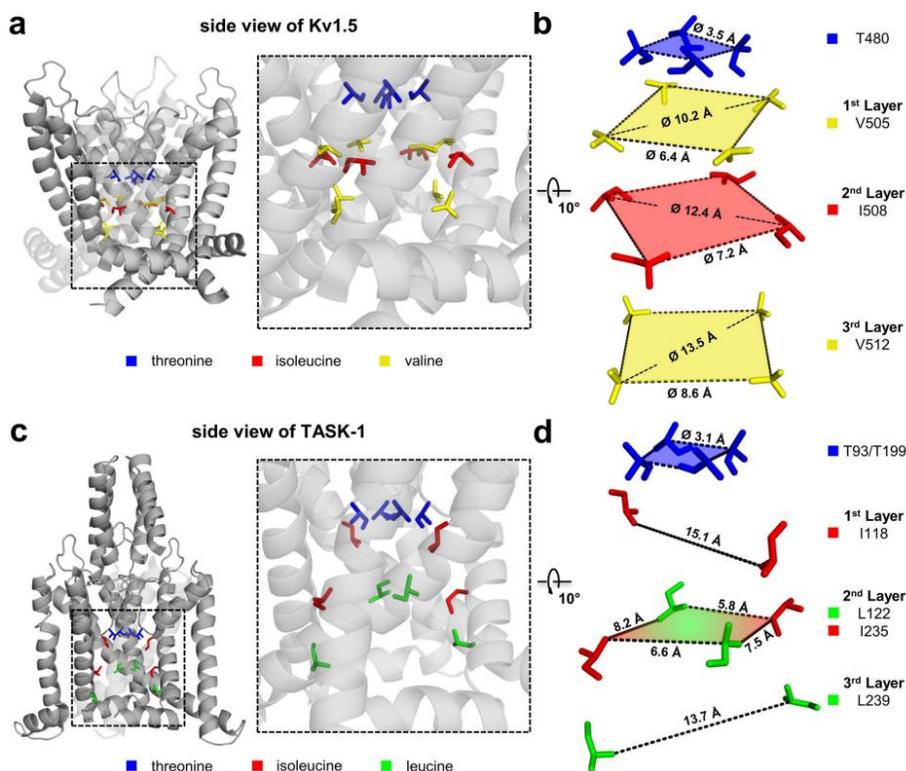
TASK-1. Esto con el fin de buscar una posible diana biológica (TASK-1) para tratar la apnea obstructiva del sueño y la fibrilación atrial. Las drogas utilizadas fueron (AVE0118, S20951, S9947, AVE1231, ICAGEN-4 y MSD-D). AVE0118 ha sido usado para restaurar la contracción atrial normal en modelos de fibrilación auricular (de Haan y col., 2006).

Midiendo el IC<sub>50</sub> de los compuestos mencionados, Kiper y col. (2015) observaron que estos bloqueaban de una mejor forma a TASK-1 que a Kv1.5. El IC<sub>50</sub> de AVE0118 en Kv1.5 es de 5.6 µM y en TASK-1 es de 0.6 µM. En el ámbito estructural identificaron que residuos asociados al filtro de selectividad y a la cavidad central de ambos canales conforman el sitio de unión de estos bloqueadores. Esto se realizó usando modelos comparativos de Kv1.5 y TASK-1.

	IC <sub>50</sub> Kv1.5	IC <sub>50</sub> TASK-1
AVE0118	5.60 µM	0.60 µM
S20951	2.70 µM	0.04 µM
S9947	0.70 µM	0.20 µM
AVE1231	9.50 µM	0.22 µM
ICAGEN-4	1.60 µM	1.05 µM
MSD-D	0.50 µM	0.35 µM

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> de compuestos antagonistas en Kv1.5 y TASK-1. En TASK-1 el IC<sub>50</sub> es menor en todos los casos.

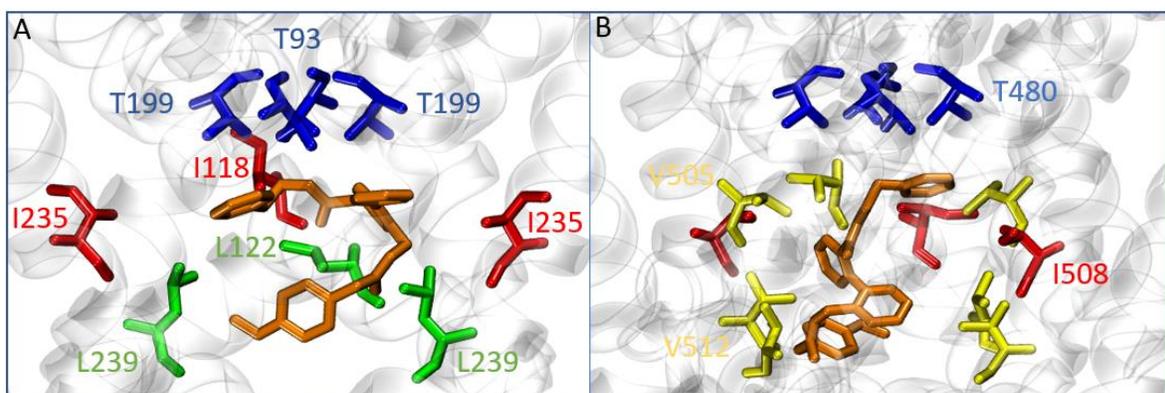
TASK-1 y Kv1.5 poseen similitudes estructurales en el sitio donde las drogas interactúan (Figura 8). Se pueden observar las 4 capas que poseen los sitios de unión de los canales y los aminoácidos que conforman estas capas. La primera capa de ambos canales está compuesta por 4 treoninas del filtro de selectividad (FS) y las otras tres se componen de valina, leucina e isoleucina.



**Figura 8:** Sitio de unión de los bloqueadores que contienen el farmacóforo antagonista en canales Kv1.5 y TASK-1. a y c) Representación de los canales Kv1.5 y TASK-1, junto a sus sitios de unión. b y d) aminoácidos que forman las capas del sitio de unión.

Estas similitudes estructurales, junto a las mediciones de los  $IC_{50}$  y el modelo del farmacóforo antagonista, condujeron a la conclusión de que los grupos A1 y A2 del farmacóforo (Figura 7a) tendrían una interacción con los residuos de treonina del FS formando puentes de hidrógeno, mientras que el anillo aromático generaría una interacción hidrofóbica con el resto de las capas (Kiper y col., 2015).

Se obtuvieron poses estructurales desde dinámicas moleculares de los sistemas TASK1-AVE0118 y Kv1.5-AVE0118 realizadas previamente en el grupo, como se puede observar en la Figura 9 en donde se encuentran los residuos importantes rodeando al ligando en cada canal.



**Figura 9: Poses obtenidas a través de dinámica molecular del ligando AVE0118 en los canales TASK-1 y Kv1.5 (A) TASK-1 y (B) Kv1.5, junto con los residuos del sitio de unión. Los residuos están coloreados como: treonina (azul), Isoleucina (rojo), valina (amarillo) y leucina (verde). AVE0118 aparece coloreado de naranja.**

#### 1.4.3.- Farmacóforo agonista de los canales TREK-2, BKCa y hERG.

Schewe y col. (2019) diseñaron el farmacóforo agonista indicado en la Figura 7b, el cual se encuentra basado en 8 compuestos con un grupo cargado negativamente (Figura 6). Todos los agonistas cargados negativamente (ACN) actúan como una llave para poder abrir el filtro de selectividad, debido a que la carga negativa que poseen aumenta el paso de los iones  $K^+$  a través del FS. En los tres canales, los compuestos se unen de manera que la parte cargada se ubica debajo del filtro de selectividad.

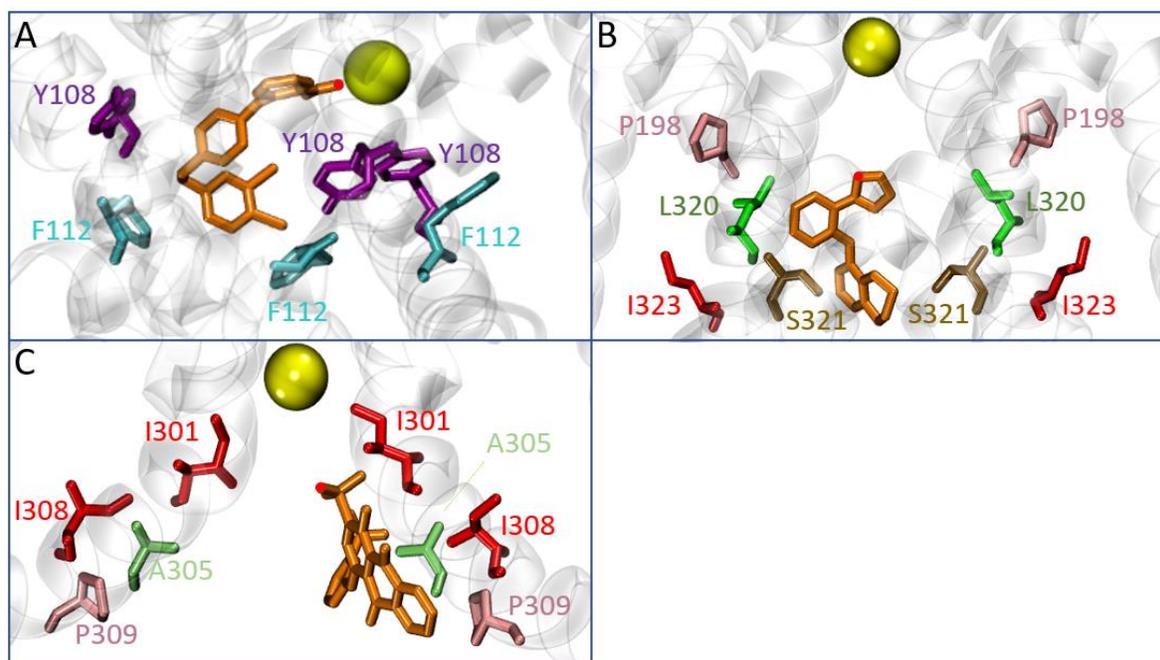
Para poder entender como los ACNs se unen a los canales ya mencionados, Schewe y col. (2019) realizaron *dockings* y dinámicas moleculares, obteniendo los residuos que interactúan con los ACNs. En hERG, el compuesto PD\_307243 tiene el grupo carboxilato interactuando con  $K^+$ , el resto posee interacciones con Y652 y F656. En la unión de GoSlo-SR-5-6 en BKCa, el grupo carboxilato también se encuentra bajo el filtro de selectividad, interactuando con los iones  $K^+$  mientras que los residuos I301B, I308B, A305B, P309C, I308C y A305C (correspondiendo B y C a las cadenas del tetrámero) interactúan con el resto del ACN.

Por último, Schewe y col. (2019) ejecutaron dinámicas moleculares de TREK-2 con 7 compuestos (BL-1249, ML67-33, DPCIB, PD-307243, PDB-118057, NS3623 y NS11021 Figura 6), en donde el grupo cargado negativamente de todos se mantiene debajo del FS junto a iones  $K^+$ . Los residuos que fueron destacados entre todas las

comparaciones para la unión de los ACNs en TREK-2 fueron P198A, L320B, S321B y I323B (correspondiendo A y B a las cadenas del dímero).

En todos los ACNs mencionados anteriormente se postula que el grupo A (cargado negativamente) de la Figura 7b genera atracciones electrostáticas con el  $K^+$ , mientras que los grupos H y R de los ACNs forman interacciones hidrofóbicas con los residuos del sitio de unión.

Se obtuvieron las poses de referencia que se muestran en la Figura 10 de los sistemas (A) hERG-PD-118057, (B) TREK2-BL1249, (C) BKCa-GoSlo-SR-5-6 al realizar dinámicas moleculares de los sistemas, encontrando los sitios de unión en los canales (Schewe y col., 2019).



**Figura 10: Poses obtenidas desde dinámica molecular del ligando de referencia en los canales (A) hERG, (B) TREK-2 y (C) BKCa con los residuos del sitio de unión. Los residuos están coloreados como: prolina (rosado), fenilalanina (celeste), tirosina (morado), Isoleucina (rojo), leucina (verde) y serina (café). Los ligandos (a) PD-118057, (b) BL-1249 y (c) GoSlo-SR-5-6 se encuentran coloreados de naranja con un punto de color rojo señalizando la carga negativa. El ion  $K^+$  se encuentra representado en amarillo.**

## 1.5.- Compuestos Naturales.

Los compuestos naturales (CN) son moléculas químicas provenientes de fuentes naturales, tanto plantas como animales o algas, siendo empleados comúnmente en medicina alternativa (Seo y col., 2020). Algunos de estos compuestos son la clorofila (Sánchez-Moreiras y col., 2020), los aminoácidos (Velasco-Charpentier y col., 2016), terpenos (Guimarães y col., 2014), alcaloides (Ulrichová y col., 2001), etc. Los CN han sido investigados como alternativas a drogas para enfermedades cardiovasculares, esclerosis, patologías infecciosas, etc. (Atanasov y col., 2021), llegando a poseer éxito en algunos casos. Con el avance de la tecnología se ha estudiado la estructura química y la función biológica de los CN con el propósito de encontrar compuestos que posean características fisicoquímicas que los conviertan en posibles drogas para el tratamiento de enfermedades.

Los compuestos naturales están disponibles en bases de datos (BD) en línea tales como: 3DMET, The Universal Natural Products Database (UNPD), ZINC, etc. Las BDs de compuestos naturales se utilizan para realizar cribado virtual (*virtual screening*) basado en farmacóforo o en los residuos de un sitio de unión de interés. Realizar un protocolo de cribado virtual es imprescindible para disminuir el número de compuestos candidatos puesto que las BDs poseen un gran número de compuestos (>1.000). Las moléculas obtenidas luego del filtrado serán los compuestos que posean las características fisicoquímicas del farmacóforo. Por ejemplo, al disponer de una BD de 50.000 CNs se puede realizar un *virtual screening* según el modelo de un farmacóforo de referencia, con el fin de obtener los compuestos que lo cumplan (Iwata y col., 2021). Se han desarrollado investigaciones para hallar compuestos naturales que interactúen con proteínas específicas y que generen una reacción biológica deseada. Por ejemplo, Iwata y col. (2021) descubrieron activadores naturales de TRPA1 usando cribado virtual basado en un farmacóforo de referencia, obteniendo seis CNs con rol agonista para el canal TRPA1. Por lo que es posible descubrir CNs que efectúen una acción biológica deseada en los canales (TASK-1, Kv1.5, TREK-2, hERG y BKCa), conteniendo los farmacóforos moduladores de los canales (Iwata y col., 2021; Kiper y col., 2015; Schewe y col., 2019).

## 2.- Hipótesis

Los canales de potasio se encuentran expresados en distintos tejidos, llegando a tener relación directa con enfermedades como la fibrilación auricular, accidentes cerebrovasculares (isquemias) o epilepsia. Por otro lado, los compuestos naturales están siendo investigados con fines terapéuticos en diversas enfermedades.

Por lo que: **“deben existir compuestos naturales que contienen los farmacóforos de acción agonista (sobre los canales TREK-2, hERG y BK<sub>Ca</sub>) y antagonista (sobre los canales TASK-1 y Kv1.5) que establecen interacciones energéticamente favorables con el sitio de unión de otros compuestos reportados que poseen los farmacóforos citados”**.

Estos compuestos deben ser validados en futuras investigaciones *in vitro* como moduladores de los canales K<sup>+</sup> estudiados en esta memoria de tesis con la finalidad de ser utilizados como posibles compuestos líderes en el desarrollo de nuevas drogas.

### **3.- Objetivo General y Específicos.**

#### **3.1.- Objetivo General.**

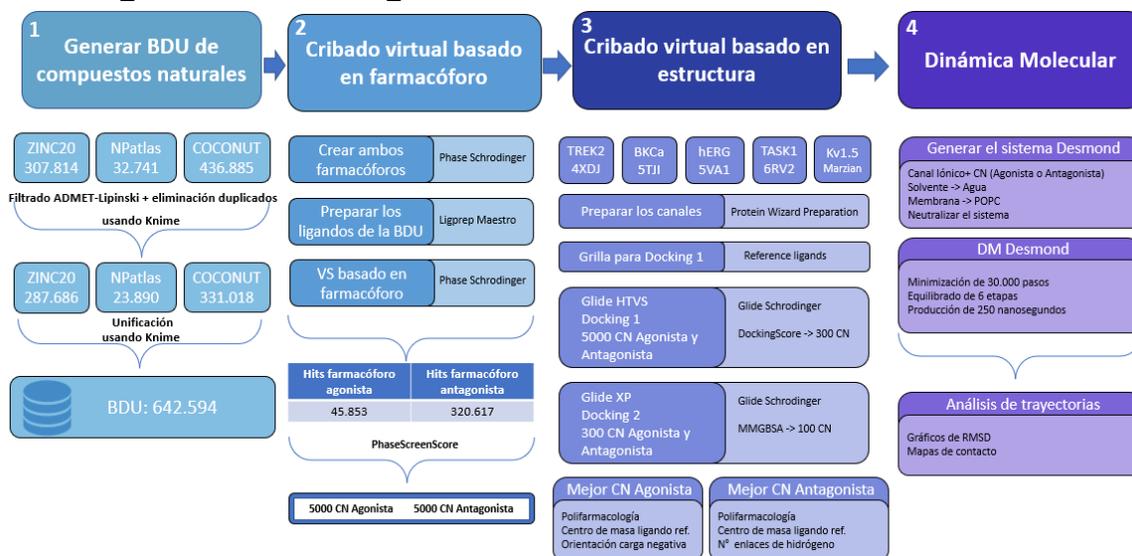
Obtener compuestos naturales con función agonista para los canales TREK-2, hERG y BKCa, y antagonista en los canales TASK-1 y Kv1.5, evaluando la energía de unión y los residuos del sitio de unión de los canales con los cuales interactuarán los CNs.

#### **3.2.- Objetivos Específicos.**

- (1) Generar una base de datos unificada (BDU) de compuestos naturales, mediante el uso de BDs en línea, y realizar un cribado virtual de la BDU con los dos farmacóforos de referencia.
- (2) Realizar cribados virtuales basados en las estructuras de los canales de referencia usando los resultados del cribado virtual con base en farmacóforo.
- (3) Interpretar los resultados de los cribados virtuales mediante el uso de filtros, con la finalidad de obtener el mejor CN agonista y antagonista.
- (4) Realizar una dinámica molecular para cada canal con el CN correspondiente, e interpretar los resultados mediante análisis de las trayectorias.

## 4.- Metodología

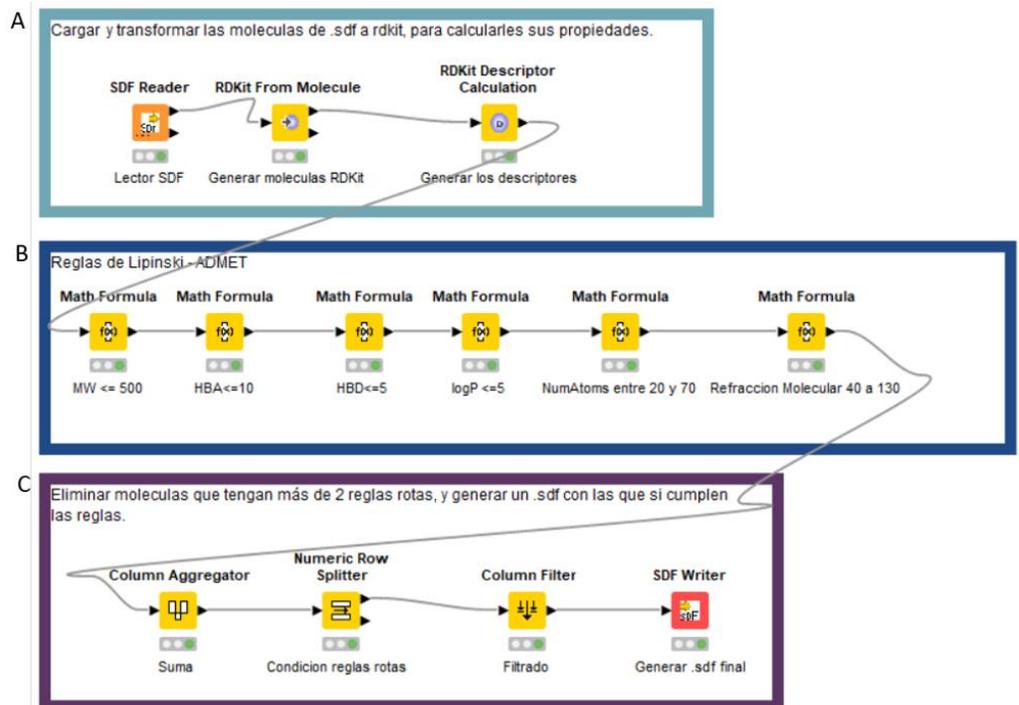
### 4.1.- Diagrama Metodología.



**Figura 11: Diagrama de la metodología aplicada.** Esta se encuentra separada en 4 partes, (1) Generar la BDU, (2) Cribado virtual basado en farmacóforo en la BDU, (3) Cribado virtual basado en estructura en los canales de estudio y (4) Dinámica molecular de los mejores compuestos que contienen el farmacóforo agonista y antagonista en sus canales respectivos.

### 4.2.- Generación de la Base de Datos de Compuestos Naturales (CN).

Se generó una librería de compuestos naturales que denominamos base de datos unificada (BDU). La BDU se generó a partir de las bases de datos gratuitas ZINC20 (Irwin y col., 2020), COCONUT (Sorokina y col., 2021) y NPatlas (van Santen y col., 2019). Para construir la BDU se requirió: (1) Obtener las bases de datos desde su sitio de descarga, (2) Unificar las bases de datos y (3) Filtrar los compuestos naturales por ADMET-Lipinski y eliminar los duplicados. Se empleó el software Knime (Berthold y col., 2008) para obtener la BDU y curarla.



**Figura 12.** Workflow utilizado para el filtrado ADMET-Lipinski en los CN obtenidos inicialmente.

El filtrado ADMET-Lipinski (Figura 12) se realizó en tres etapas: (1) Cargar y transformar los CN desde el formato obtenido a RDKit (Figura 12a), para el cálculo de las propiedades fisicoquímicas, (2) Calcular las reglas Lipinski-ADMET de cada CN (Figura 12b), y (3) guardar los CN que poseen como máximo una regla rota (Figura 12c). Para la unificación se utilizó el workflow de la Figura 13 en donde se cargaron las BDs obtenidas del filtrado Lipinski-ADMET (Figura 13a), se concatenan estas bases de datos (Figura 13b), y se eliminan los CN duplicados en las BDs (Figura 13c). Se eliminaron los CNs compartidos de las bases de datos COCONUT y Npatlas, dejando ZINC20 en su totalidad.

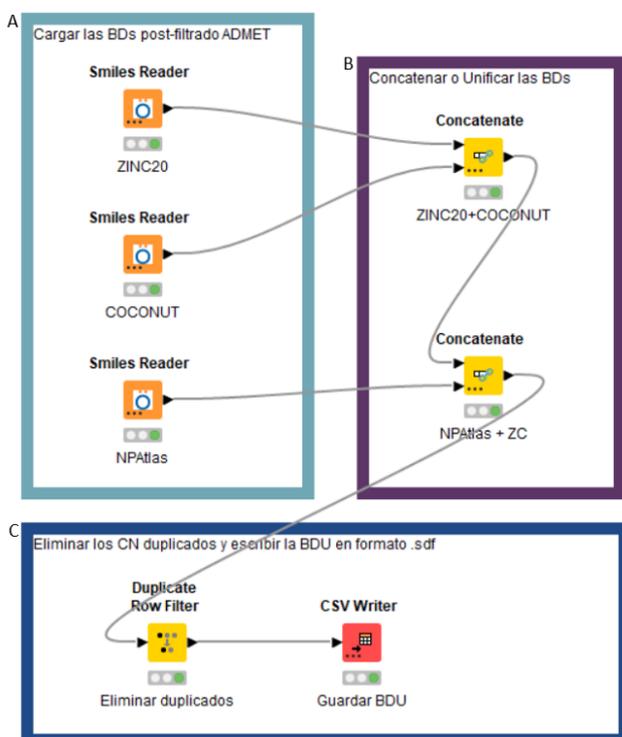
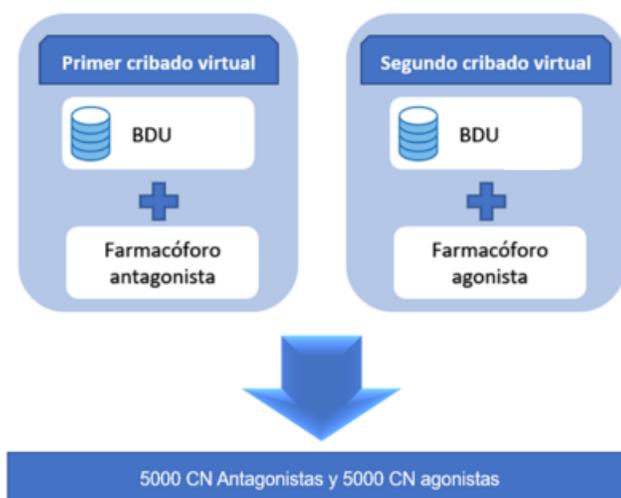


Figura 13. Workflow utilizado para la unificación de las 3 BDs.

#### 4.3.- Cribado virtual basado en los farmacóforos de referencia.

El cribado virtual basado en farmacóforo permite encontrar un set de estructuras moleculares, que podrían modular a una o más proteínas (Zhou y col., 2015). Se utilizó esta técnica para encontrar compuestos naturales que podrían modular las proteínas estudiadas de manera agonista o antagonista. Se empleó el módulo *Phase* de la Suite Schrödinger (Dixon y col., 2006) para realizar los dos cribados virtuales (Figura 14), ya que este posee las opciones de generar el farmacóforo con distancias y ángulos específicos, transformar la BDU en una librería, y finalmente, realizar los cribados virtuales basándose en los farmacóforos agonista y antagonista. Para ejecutar el cribado virtual basado en farmacóforo (1) Se realizó el modelo de ambos farmacóforos: agonista (Schewe y col, 2019) y antagonista (Kiper y col, 2015), (2) Se generó la librería de compuestos a partir de la BDU, (3) Se realizaron dos cribados virtuales basándonos en los farmacóforos, utilizando primero el farmacóforo antagonista y luego el agonista, y (4) Se seleccionaron los 5000 mejores compuestos naturales agonistas y 5000 antagonistas con base en el PhaseScreenScore entregado

por *Phase*, el cual tiene en cuenta la calidad y cantidad de coincidencias entre el farmacóforo y el compuesto natural (Zhang y col., 2018). La cantidad se evalúa según el número de características fisicoquímicas del compuesto natural que coincidan el farmacóforo. En este caso fueron 3 características fisicoquímicas por grupo de compuestos: (1) Compuestos basados en el farmacóforo agonista. Se evaluó que tuvieran un grupo cargado negativamente, un grupo hidrofóbico y un anillo aromático. (2) Compuestos basados en el farmacóforo antagonista. Se evaluó que tuvieran dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno y un anillo aromático. La calidad se evalúa según la distancia y ángulos entre los grupos fisicoquímicos de los compuestos naturales, que estas correspondan con la distancia y los ángulos del farmacóforo de referencia.



**Figura 14.** Diagrama de los dos cribados virtuales, cada uno basado en un farmacóforo distinto.

#### **4.4.- Obtención y preparación de las estructuras de los canales de potasio.**

Se obtuvieron las estructuras de los canales de potasio TASK-1, TREK-2, BkCa, hERG y Kv1.5. Las estructuras de los primeros cuatro canales fueron obtenidas de Protein Data Bank (PDB) con los códigos 6RV2 (Rödström y col., 2020), 4BW5 (Dong y col., 2015), 3NAF (Wu y col., 2010) y 5VA1 (Wang y MacKinnon, 2017), respectivamente. Se ocupó un modelo comparativo del canal Kv1.5 generado en el año 2013 (Marzian y col., 2013) y usado posteriormente en nuestro grupo (Mazola y col., 2022; Kiper 2015; Kiper y col., 2021). La preparación de estas estructuras fue realizada con el software

*Maestro* de la suite de Schrödinger (Madhavi Sastry y col., 2013). Para la preparación de las estructuras se realizó (1) La adición de átomos de hidrógeno, (2) Eliminación de las aguas innecesarias que contienen las estructuras y (3) Optimizar la red de enlaces de hidrógeno y (4) Agregar cargas atómicas. Para realizar estos cuatro pasos se utilizó el módulo *Protein Preparation Wizard* de *Maestro* (Li y col., 2019; Madhavi Sastry y col., 2013) a un pH de 7.0.

#### **4.5.- Realizar cribado virtual de alto rendimiento basado en estructura entre los 5000 mejores CNs y los canales de potasio.**

El cribado virtual de alto rendimiento o “*high-throughput virtual screening*” (HTVS) es utilizado para observar de manera rápida si diferentes compuestos pueden interactuar con una proteína favorablemente (Dhasmana y col., 2019). Así se pueden obtener ligandos que podrían ser utilizados para generar una respuesta biológica específica (Amir y col., 2020). Con el módulo *Glide* de Schrödinger (Friesner y col., 2004, 2006; Halgren y col., 2004) se hicieron cinco cribados virtuales de alto rendimiento, de cada canal con el set de 5000 CN correspondiente (agonista o antagonista), utilizando el ligando de referencia (Figuras 9 y 10) para la ubicación de la grilla en los HTVS. Se efectuaron dos filtrados para seleccionar los mejores 300 CN para cada canal. (1) Se utilizó el DockingScore entregado por *Glide* y (2) Se verificó visualmente que las poses de los CNs se superpusieran estructuralmente a las poses de los ligandos de referencia (Kiper y col., 2015; Schewe y col., 2019).

Se ejecutó un segundo cribado virtual para elegir el mejor compuesto agonista o antagonista por cada grupo de canales. Este fue realizado con *Glide* de Schrödinger (Friesner y col., 2006), ejecutando *Glide XP (Extra Precision)* entre los mejores 300 CN obtenidos del HTVS y sus canales correspondientes. Este segundo cribado virtual se realizó con la finalidad de obtener y luego filtrar 100 CN usando cálculos de energía libre MMGBSA. De estos 100 compuestos naturales agonistas o antagonistas se seleccionó el mejor CN. Se utilizaron los siguientes criterios para la selección del mejor CN agonista y antagonista: (1) polifarmacología, (2) el centro de masa del CN en comparación con el ligando de referencia y (3) filtros específicos para cada sistema. Estos son que, para los compuestos agonistas, la parte cargada negativamente se

debe encontrar orientada hacia el filtro de selectividad (FS) interactuando con el ion K<sup>+</sup>, mientras que para los antagonistas se utilizó el número de puentes de hidrógeno que se formaron con las treoninas del filtro de selectividad.

#### 4.6.- Cálculos de energía libre de unión (MMGBSA)

Los cálculos de MMGBSA (*Molecular Mechanics combined with the generalised Born and surface area continuum solvation*) son generalmente usados para adquirir la energía libre de unión ( $\Delta G_{unión}$ ) de un complejo (proteína - ligando, proteína - proteína, etc.). El método de MMGBSA predice la afinidad de unión de una forma más precisa y eficiente que la puntuación de *docking* (El Khoury y col., 2019; Ylilauri y Pentikäinen., 2013). La ecuación 1 se emplea para calcular la energía libre de unión.

$$\Delta G_{unión} = G_{Sistema} - G_{Receptor} - G_{Ligando} \quad (1)$$

La ecuación 1 indica que la energía libre de unión es la energía libre del sistema, menos la suma entre las energías libres del receptor y el ligando. Se utilizó el módulo *Prime* para obtener la energía libre CN – Canal de Potasio a partir de los resultados de acoplamiento moleculares realizados anteriormente (*Docking XP*). El  $\Delta G_{unión}$  fue utilizado como filtro para obtener los 100 CNs de menor energía libre de unión en cada canal (Elmaaty y col., 2021).

#### 4.7.- Dinámica molecular de los complejos canal de potasio - CN agonista/antagonista obtenidos desde los acoplamiento moleculares.

Las dinámicas moleculares (DMs) permiten observar detalles a nivel atómico de un sistema biológico (Hildebrand y col., 2019) en el transcurso de un tiempo establecido. Se pueden utilizar para investigar las interacciones que se generan entre un receptor (proteína) y un compuesto (ligando) (Deng., 2019; Zahn., 2011).

Se utilizó el módulo *Desmond* de Schrödinger (Bowers y col., 2006) para realizar las 5 simulaciones moleculares utilizando el campo de fuerza OPL2005, con los parámetros que se muestran en la Tabla suplementaria 1. Se utilizaron las estructuras de los canales preparados anteriormente (Paso 4.4), y con el módulo *LigPrep* de Schrödinger (Williams y col., 2018) se prepararon los ligandos. Se utilizó *Desmond*, para (1) Crear

el sistema (Canal de potasio – CN), (2) Realizar la minimización, el equilibrado y la obtención de datos a través de dinámica molecular, y (3) Analizar los resultados de la DM a través de gráficos de RMSD y mapas de contacto (Bowers y col., 2006). El uso de *Desmond* y no de otros programas de simulación molecular se debe a que al haber realizado los acoplamiento moleculares con la suite de Schrödinger (Bowers y col., 2006), los archivos (CNs y canales) se encontraban listos para seguir trabajando con esta suite, a su vez al utilizar GPU, las DM corren 200 veces más rápido que con CPU, acortando el tiempo de cálculo. Cada sistema simulado se encuentra compuesto por el canal de potasio, el compuesto natural seleccionado en el paso anterior, una membrana lipídica y una caja de agua (Kiper y col., 2015; Schewe y col., 2019). Cada sistema fue sometido a 30.000 pasos de minimización, 6 etapas de DM de equilibrado donde se restringió la proteína hasta dejarla totalmente libre y 100 ns de DM con la proteína libre para llegar al equilibrio. Finalmente se realizaron 150 nanosegundos de producción.

#### 4.8.- Cálculos de desviación media cuadrática (RMSD).

La desviación media cuadrática o RMSD (Knapp y col., 2011) es una medida que se utiliza para analizar estructuras y dinámicas moleculares, con el propósito de observar la distancia media entre un grupo de átomos de referencia y el grupo de átomos a comparar (por ej. superponer estructuralmente el *backbone* de dos proteínas). En la dinámica molecular se utiliza con la finalidad de identificar si esta alcanza un estado de equilibrio. La ecuación 2 se emplea para calcular el RMSD

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i^x - r_i^y)^2} \quad (2)$$

En la ecuación 2,  $i$  significa el átomo actual,  $N$  el número de átomos,  $r^x$  y  $r^y$  significan la estructura a la cual se le quiere calcular el RMSD y la estructura de referencia, respectivamente.

Se utilizó el módulo “*Simulation Interaction Diagram*” de Maestro para realizar los cálculos de RMSD. Se generaron gráficos para observar qué tan estable se encontró la proteína a lo largo de la dinámica.

#### **4.9.- Análisis de contactos/interacción entre el compuesto natural y los residuos del sitio de unión de la proteína**

Los análisis de contactos se utilizaron para observar las interacciones que se formaron entre los residuos del sitio de unión de los canales y el compuesto natural a lo largo de la dinámica molecular (Mercadante y col., 2018; Scheurer y col., 2018). Este análisis se realizó con la finalidad de identificar si el ligando interactúa con los residuos reportados en la literatura (Kiper y col., 2015; Schewe y col., 2019), según su función antagonista o agonista. Se empleó “*Simulation Interaction Diagram*” de Maestro para analizar las interacciones que se formaron en el sistema a lo largo de la producción de dinámica molecular.

## 5.- Resultados y Discusión

### 5.1.- Generar una Base de Datos Unificada de compuestos naturales, mediante el uso de BDs en línea.

Para generar la BDU se utilizaron 3 BDs en línea, ZINC20, COCONUT y Npatlas, en donde se obtuvieron inicialmente 307.814 CN de ZINC20, 436.885 CN de COCONUT y 32.741 CN de Npatlas. Al realizar el filtrado ADMET-Lipinski, y al eliminar los CN duplicados empleando KNIME, se obtuvieron los CNs indicados en la Figura 15. Generando una BDU de 642.594 compuestos naturales.

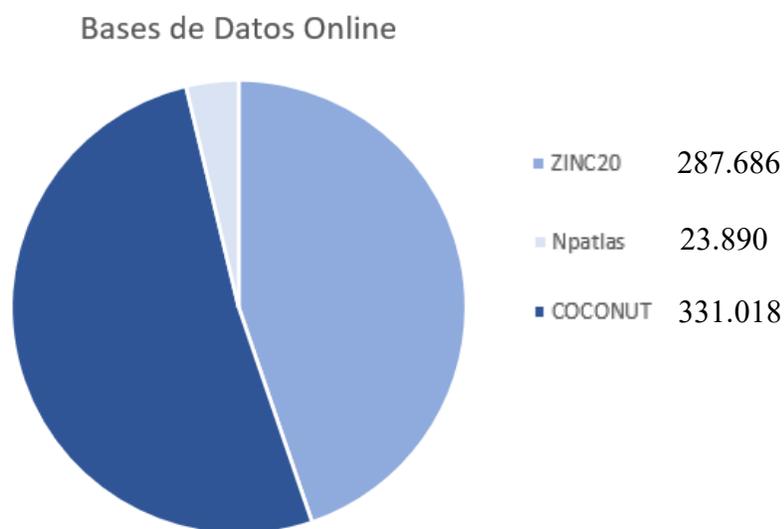


Figura 15. Diagrama circular de CN obtenidos en la BDU.

### 5.2.- Realizar un cribado virtual basado en los farmacóforos de referencia agonista y antagonista.

Para realizar el cribado virtual basado en los farmacóforos de referencia, primero se diseñaron los farmacóforos agonista y antagonista con las distancias y ángulos indicados (Kiper y col., 2015; Schewe y col., 2019) (Figura 7). Luego los CN de la BDU fueron preparados con *Ligprep* de Maestro utilizando el comando “`ligprep -s 2 -ph 7.0 -epik -t 2 -ismi BDU.smi -omae BDUprep.mae`”, en donde -s indica el número de estereoisómeros a generar por CNs, -ph el pH a preparar las estructuras, -epik para emplear *Epik* en la ionización y -t el número de tautómeros. Se realizó el cribado virtual obteniendo 45.853 CN con el farmacóforo agonista y 320.617 con el farmacóforo

antagonista. Estos CNs fueron filtrados mediante el PhaseScreenScore entregado por el módulo Phase con la finalidad de seleccionar los 5000 mejores CN agonistas y 5000 CN antagonistas. El programa PhaseScreenScore fue seleccionado para realizar el filtrado previo al cribado virtual basado en estructura ya que ha sido utilizado anteriormente para ordenar compuestos generados por cribado virtual basado en farmacóforo con el fin de encontrar compuestos activadores o inhibidores de proteínas (Hegazy y col., 2022, Kumar y col., 2020).

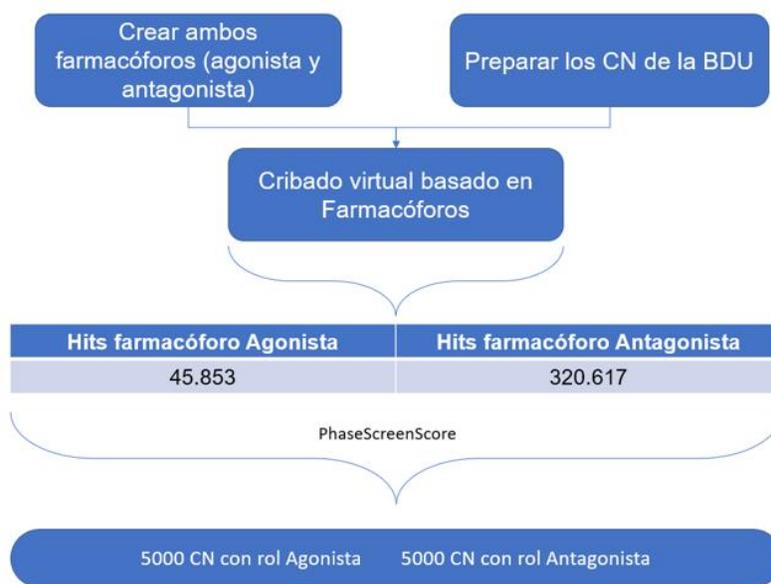


Figura 16. Diagrama cribado virtual basado en farmacóforos.

### 5.3.- Cribados basados en estructura.

Se realizaron cribados virtuales basados en estructura utilizando el módulo *Glide* de Maestro en cada canal. Se ejecutaron 5 *Dockings* HTVS (*High-Throughput Virtual Screening*): 5000 CN agonistas en los canales hERG, BKCa y TREK-2, y 5000 CN antagonistas en TASK-1 y Kv1.5. Estos compuestos fueron obtenidos en el cribado virtual basado en farmacóforo. La grilla para los HTVS fue definida al utilizar los centros de masas de los ligandos de referencia (Figura 9 y 10). Utilizando el DockingScore se filtraron los resultados para obtener los mejores 300 CN agonistas y 300 CN antagonistas por cada canal.

El segundo *docking* fue del tipo XP (*Extra-Precision*), realizando 5 *dockings*: 300 CNs por cada canal. Mediante cálculos de MMGBSA se seleccionaron los mejores 100

CNs. Para obtener el mejor CN de cada grupo (agonista o antagonista), primero se buscaron los CN con características polifarmacológicas. Es decir, que el mismo CN se hubiera acoplado a los canales pertenecientes a cada grupo. De este análisis solamente resultaron 4 compuestos que contienen el farmacóforo agonista (Tabla 2) y 3 compuestos que contienen al farmacóforo antagonista (Tabla 3). Luego se comparó el centro de masa de los CNs con el ligando de referencia (Figura 9 y 10). Además, para los CN agonistas se determinó visualmente que la carga negativa estuviera orientada al filtro de selectividad (Schewe y col., 2019). Para los CN antagonistas se calculó la formación de puentes de hidrógeno con las treoninas del filtro de selectividad, en donde no se generó ningún puente de hidrógeno con el CN.

TREK2	Residuos	Energía MMGBSA Kcal/mol	Orientación carga negativa	Centro Masa similar Lig. Ref.
CNP0365981	<b>P198A L320B L279B F316B L313B T172B</b>	-84,528	Orientada al ión	Si
ZINC00006623717	<u>L320B F316B P198A</u>	-80,843	Lejana del ión	No
CNP0390581	<b>F316B P198A I323B L320B</b>	-78,705	Lejana del ión	No
ZINC000085511974	<b>P198A L320B T281B</b>	-70,353	Lejana del ión	No
HERG	Residuos	Energía MMGBSA Kcal/mol	Orientación carga negativa	Centro Masa similar Lig. Ref.
CNP0365981	<b>Y108A Y108B F112B F112C Y108C Y108D L78C S80B T79B</b>	-87,45	Orientada al ión	Si
ZINC000085511974	<u>Y108B F112B F112C L78C</u>	-74,736	Orientada al ión	Si
CNP0390581	<b>Y108A Y108C F112C F112B</b>	-62,723	Orientada al ión	Si
ZINC00006623717	<u>Y108B F112B Y108A Y108C</u>	-62,377	Lejana del ión	No
BKCA	Residuos	Energía MMGBSA Kcal/mol	Orientación carga negativa	Centro Masa similar Lig. Ref.
CNP0365981	<b>I308C A305B I301B F300B</b>	-81,966	Orientada al ión	Si
ZINC00006623717	<u>I308C F231C I301B A305B</u>	-67,392	Lejana del ión	Si
ZINC000085511974	<b>I308C A305C T276C</b>	-65,929	Orientada al ión	No
CNP0390581	<u>I308C I301B A305B</u>	-58,811	Orientada al ión	No

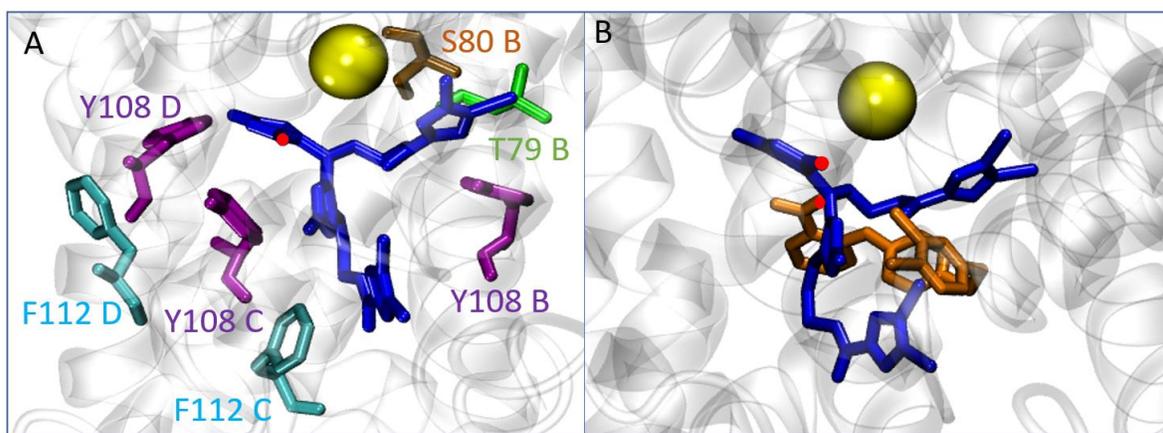
**Tabla 2.** Compuestos naturales que contienen el farmacóforo agonista y están presentes en los acoplamientos moleculares en los 3 canales estudiados, ordenados por la energía MMGBSA. Los residuos presentes son los que están a un cutoff de 3 Å de los CNs, en negrita los que forman algún tipo de interacción con el CN y subrayados los residuos reportados como parte del sitio de unión. Se destaca si es que la carga negativa de los compuestos está orientada al ión K<sup>+</sup> o lejana a este. Se muestran también las coordenadas de los centros de masas de cada CN junto al centro de masa del ligando de referencia destacado en amarillo.

TASK1	Residuos	Energía MMGBSA Kcal/mol	Centro Masa similar Lig. Ref.
CNP0400447	<b>L122A L239A I235A T199A T93B L232B I235B L239B L122B T199B</b>	-78,052	Si
ZINC00009708083	<u>L122A I235A L239A L122B T93A I118A L239B I235B T199B T199A</u>	-71,929	Si
CNP0125498	<b>T199A T93B I118B T199B T198B I235B L122B L239B L122A L239A I235A</b>	-71,329	No
KV15	Residuos	Energía MMGBSA Kcal/mol	Centro Masa similar Lig. Ref.
CNP0400447	<b>V512A I508A V505A T480C V505C T479B T480B V505B I508B V512B</b>	-68,438	Si
ZINC00009708083	<u>I508A V505A V512D I508D V505D T480D T480C V505C I508C V505B I508B V512B</u>	-61,739	Si
CNP0125498	<b>V512D I508D V505D V505A V512C I508C V505C T480C T480B V505B I508B V512B V512A</b>	-56,981	No

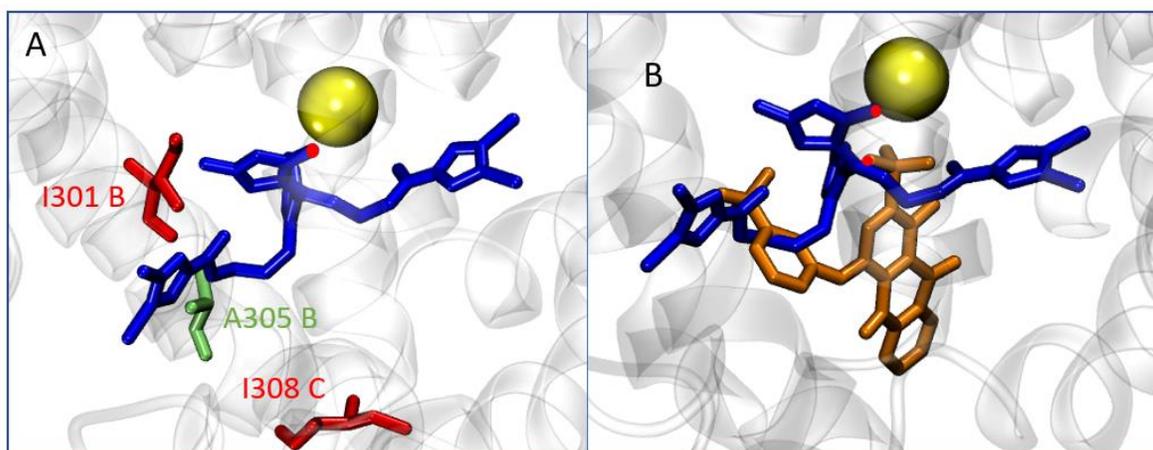
**Tabla 3.** Compuestos naturales que contienen el farmacóforo antagonista y están presentes en los acoplamientos moleculares en los 2 canales estudiados, ordenados por la energía MMGBSA. Los residuos presentes son los que están a un cutoff de 3 Å de los CNs, en negrita los que forman algún tipo de interacción con el CN y subrayados los residuos reportados como parte del sitio de unión. Se muestran también las coordenadas de los centros de masas de cada CN junto al centro de masa del ligando de referencia destacado en amarillo.

#### 5.4.- Criterios de selección del CN candidato a agonista

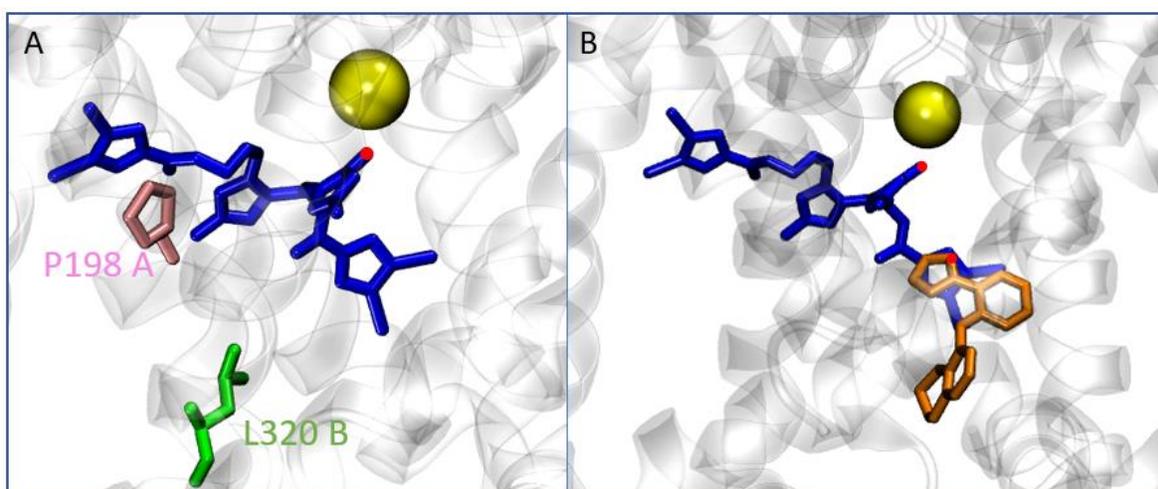
Se seleccionaron cuatro compuestos naturales con posible rol agonista (Tabla 2) y se escogió entre ellos el CNP0365981, utilizándolo para las dinámicas moleculares. Este compuesto posee un mayor número de interacciones a un *cutoff* de 3 Å, al menos con dos canales receptores (TREK-2 y hERG) y una menor energía MMGBSA en los tres canales en comparación con los otros compuestos. En el canal BKCa el CN forma una interacción con residuos reportados del sitio de unión, en hERG se establecen 5 interacciones, y en TREK-2 no se forman interacciones con los residuos reportados del sitio de unión, pero si con otros residuos. Las Figuras 17, 18 y 19 muestran las poses seleccionadas del Docking XP junto a los residuos del sitio de unión a un *cutoff* de 3 Å para realizar las dinámicas moleculares.



**Figura 17: CNP0365981 en el canal hERG: (A)** CNP0365981 y los residuos del sitio de unión a 3 Å del CN. No se representa Y108 A ya que se solapa visualmente con el CN. Los residuos del sitio de unión que interactúan con el CN se pueden observar en la Tabla 2 y 4. CNP0365981 de color azul. En **(B)** se muestra la posición del ligando de referencia PD-118057 en naranja y el CN en azul. En amarillo se muestra el ión potasio. La carga negativa de los ligandos se encuentra representada por un punto rojo. Los residuos están coloreados como: fenilalanina (celeste), tirosina (morado), serina (café) y treonina (verde).



**Figura 18: CNP0365981 en el canal BKCa:** (A) CNP0365981 y los residuos del sitio de unión a 3 Å del CN. Los residuos del sitio de unión que interactúan con el CN se pueden observar en la Tabla 2 y 5. CNP0365981 de color azul (B), y el ligando de referencia GoSlo-SR-5-6 en naranja. En amarillo se muestra el ion potasio. La carga negativa de los ligandos se encuentra representada por un punto rojo. Los residuos están coloreados como: isoleucina (rojo) y alanina (verde).



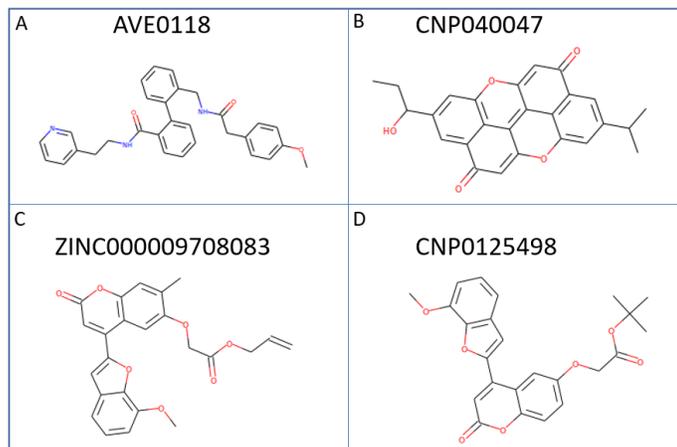
**Figura 19: CNP0365981 en el canal TREK-2:** (A) CNP0365981 y los residuos del sitio de unión a 3 Å del CN. CNP0365981 de color azul, (B) y el ligando de referencia BL-1249 en naranja. En amarillo se muestra el ión potasio. La carga negativa de los ligandos se encuentra representada por un punto rojo. Los residuos están coloreados como: prolina(rosado) y leucina(verde).

Al comparar la posición del compuesto natural con respecto al ligando de referencia, estos comparten el mismo espacio en hERG y BKCa (Figura 17 y 18). En cambio, en TREK-2 (Figura 19) se aprecia cómo el CN no se encuentra posicionado en el mismo espacio que el ligando de referencia. Esto sucedió a pesar de que la grilla del HTVS basado en estructura fue posicionada en el centro de masa de los ligandos de referencia y cubriendo los aminoácidos del sitio de unión. Aun así, *Glide* determinó que

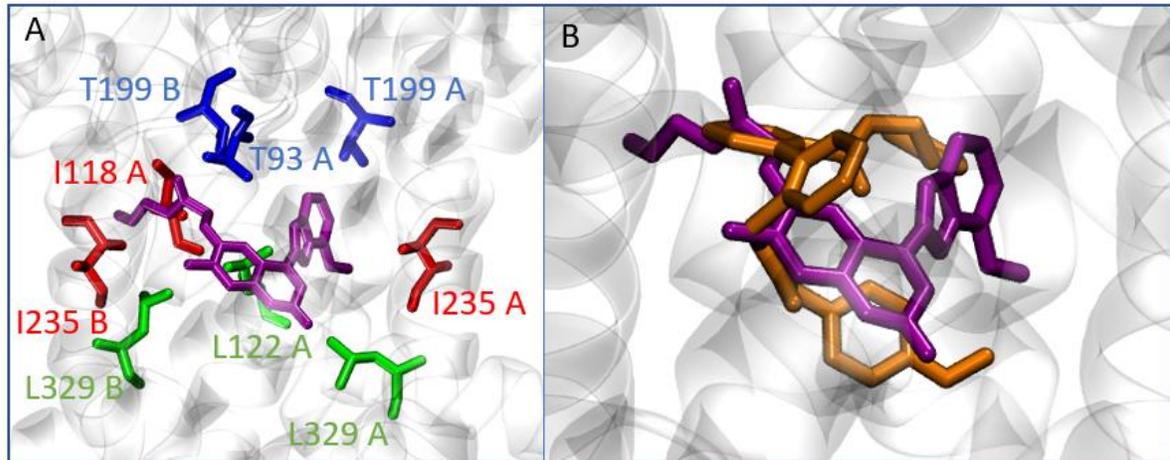
la pose más favorable energéticamente para CNP0365981 en TREK-2 es la que se muestra en la Figura 19. Pese a esto, esta pose tiene una carga negativa orientada al poro y residuos del sitio de unión a una distancia de 3 Å, pero que no interactúan con el ligando.

### 5.5.- Criterios de selección del CN candidato a antagonista.

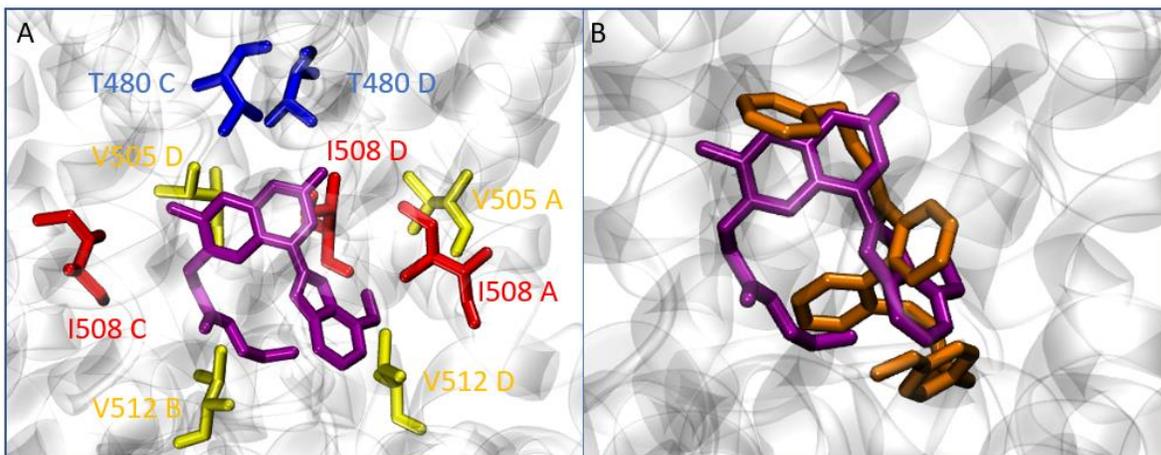
En la Tabla 3 se muestran los 3 compuestos naturales antagonistas candidatos. El compuesto natural ZINC000009708083 (Figura 20c) fue seleccionado como mejor CN antagonista. Este junto a CNP0125498 (Figura 20d) se asemejan más al ligando de referencia que el compuesto con menor energía (CNP040047), que es muy voluminoso, pero ZINC000009708083 posee menor energía libre de unión MMGBSA que CNP0125498 (Tabla 3). Vale destacar que todos los residuos que se encuentran a 3 Å de los CNs forman parte del sitio de unión, excepto los residuos L232B en TASK-1 y T479B en Kv1.5 con CN0400447 (Tabla 3).



**Figura 20: Ligando de referencia (AVE0118) y compuestos naturales con posible rol antagonista.** (A) Ligando de referencia. (B) CN descartado debido a su alto número de anillos aromáticos. (C) CN seleccionado para el desarrollo de las dinámicas moleculares. (D) CN no seleccionado.



**Figura 21: ZINC000009708083 en el canal TASK-1:** (A) ZINC000009708083 y los residuos del sitio de unión a 3 Å del CN. No se representa L122 B ya que se solapa visualmente con el CN. ZINC000009708083 de color morado, (B) y el ligando de referencia AVE0118 en naranja. Los residuos están coloreados como: treonina(azul), leucina(verde) e Isoleucina(rojo).



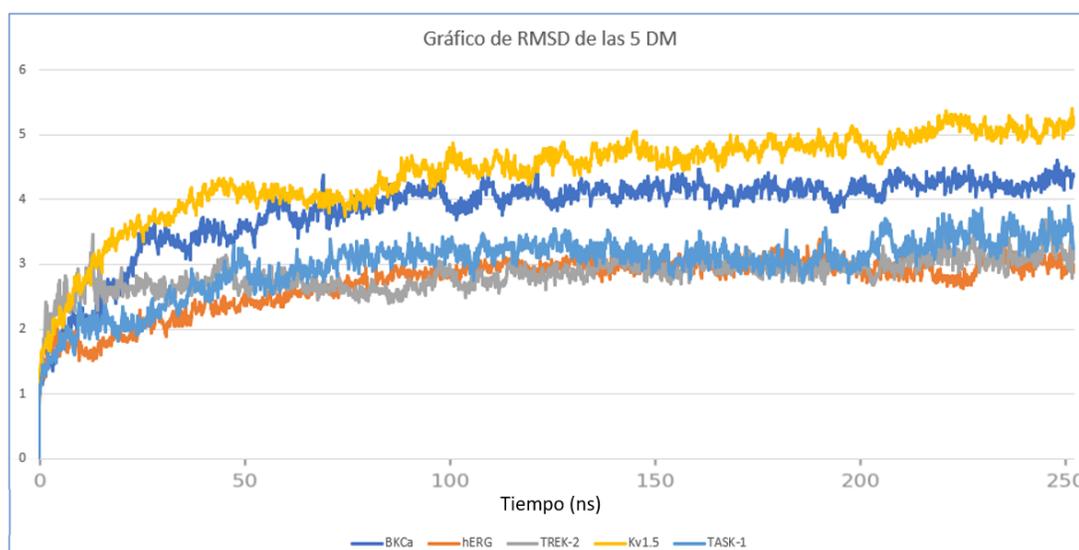
**Figura 22: ZINC000009708083 en el canal Kv1.5:** (A) ZINC000009708083 y los residuos del sitio de unión a 3 Å del CN. No se representan V505 B, I508 B y V505 C ya que se solapan con el CN. ZINC000009708083 de color morado, (B) y el ligando de referencia AVE0118 en naranja. Los residuos están coloreados como: treonina (azul), isoleucina (rojo) y valina (amarillo).

En las Figuras 21 y 22 se pueden apreciar las posiciones que adopta el CN con posible rol antagonista ZINC000009708083 en los canales TASK-1 y Kv1.5 correspondientemente. En ambos canales el compuesto natural adquiere una posición muy similar a la del ligando de referencia, rodeado por residuos reportados del sitio de unión.

## 5.6.- Realizar una dinámica molecular para cada canal con el CN correspondiente, e interpretar los resultados mediante análisis de trayectorias.

Al finalizar los 250 nanosegundos de dinámica molecular en cada canal, se interpretaron los resultados utilizando gráficos de RMSD para ver la estabilidad de la dinámica, gráficos de barras con las interacciones formadas y mapas de contacto.

El gráfico 1 corresponde al RMSD del *backbone* de los cinco canales, en donde se puede observar que los sistemas CN-Canal se equilibran desde los 100 ns. Por lo tanto, se consideraron los primeros 100 ns como parte del equilibrado y los restantes 150 ns como producción para análisis de las interacciones ligando-proteína, y para realizar mapas de contacto.



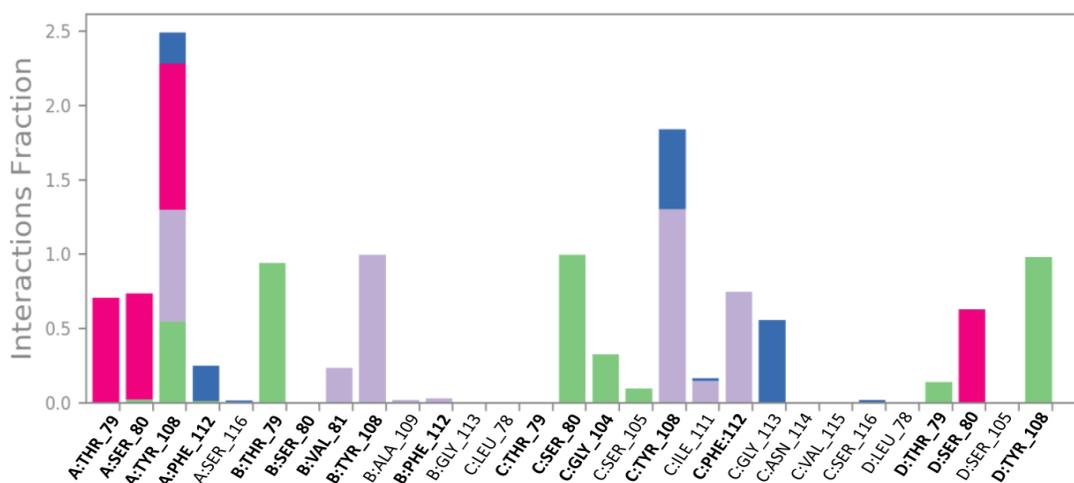
**Gráfico 1: RMSD del *backbone* de las 5 dinámicas moleculares durante 250 ns.** Los sistemas Canal-Compuesto Natural se mantienen estables a partir de los 100 ns con un RMSD entre 2 a 5 Å, excepto Kv1.5 que alcanza los 5.401 Å.

### 5.6.1.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal hERG.

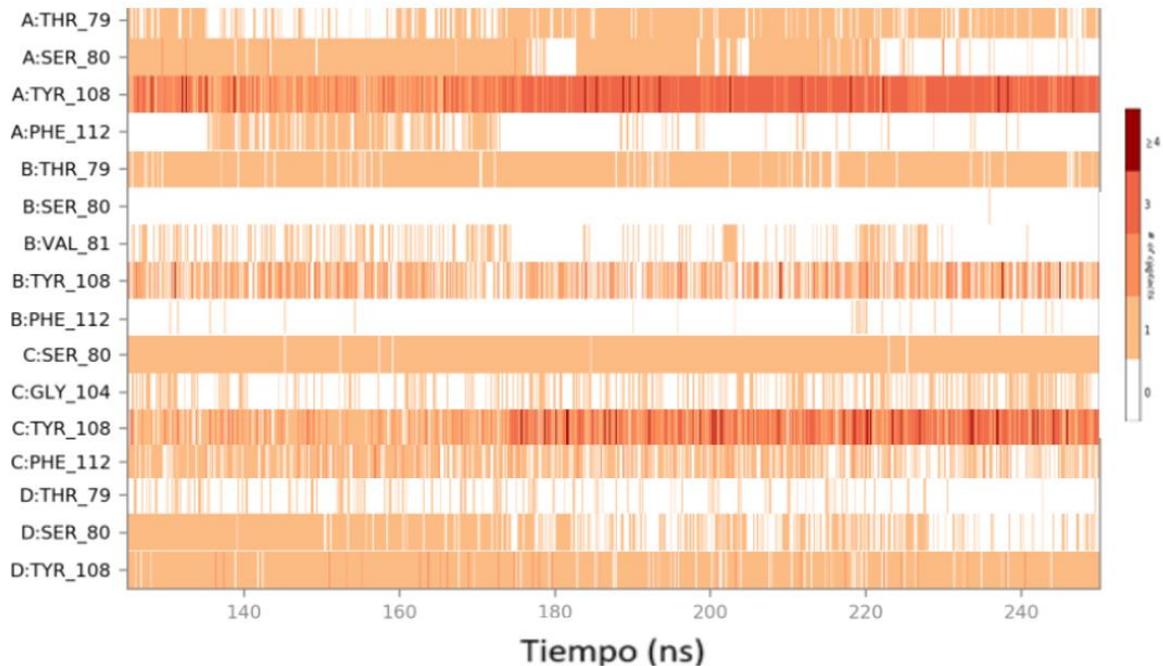
En el gráfico 2 se pueden apreciar los contactos proteína-ligando que se forman entre CNP0365981 y hERG. Siendo la Y108 de la cadena A el residuo que más contactos forma desde los 100 ns generando los 4 tipos de contactos, alcanzando un porcentaje de 250% de interacción, lo que significa que este mismo residuo está formando más de una interacción a la vez durante la dinámica molecular.

De los residuos del sitio de unión (T79, S80, V81, G104, Y108 y F112) todos establecen interacción con el ligando. La gran mayoría está formando interacciones en más de un 50% de la DM, a excepción de V81 que mantiene una interacción un 20% de la DM y la G104 un 25%. En el gráfico 3 se observan los números de contactos que forman cada residuo en cada *frame* de la dinámica, en donde la Y108 de las cadenas A y C está formando más de un contacto en algunos *frames* de la dinámica, llegando a establecer 4 contactos en ciertos *frames*. Lo que explica que estos residuos en el gráfico 2 superen el 100% de interacción.

Al comparar los contactos formados entre el CN y los residuos reportados del sitio de unión de hERG, se puede apreciar que la gran mayoría de los residuos mantiene la interacción formada en un 50% de la producción de dinámica o más, por ejemplo la T79 de la cadena A y B mantiene una interacción en un 50% y 80% respectivamente, la S80 de la cadena A y C, y la F112 de la cadena C también entran en esta categoría (50% o más). A su vez, la Y108 de la cadena A y C es el residuo que mantiene algún tipo de interacción en toda la producción de la dinámica molecular. Los únicos residuos reportados que no superan el 50% es la V81 de la cadena B con un 20%, y la G104 de la cadena C con un 25%.



**Gráfico 2: Contacto Proteína-Ligando en hERG:** Porcentaje de interacciones durante la dinámica molecular. Ej.: El residuo SER80 de la cadena A posee un 0,8 de interacción con el ligando CNP0365981. Esto indica que esta interacción se mantiene durante un 80% de la DM (120 ns de los 150ns). Los residuos del sitio de unión que interactúan con el compuesto son T79, S80, V81, G104, Y108 y F112. Enlaces de hidrógeno en verde, interacciones hidrofóbicas en morado, interacciones iónicas en rosa y puentes de agua en azul.

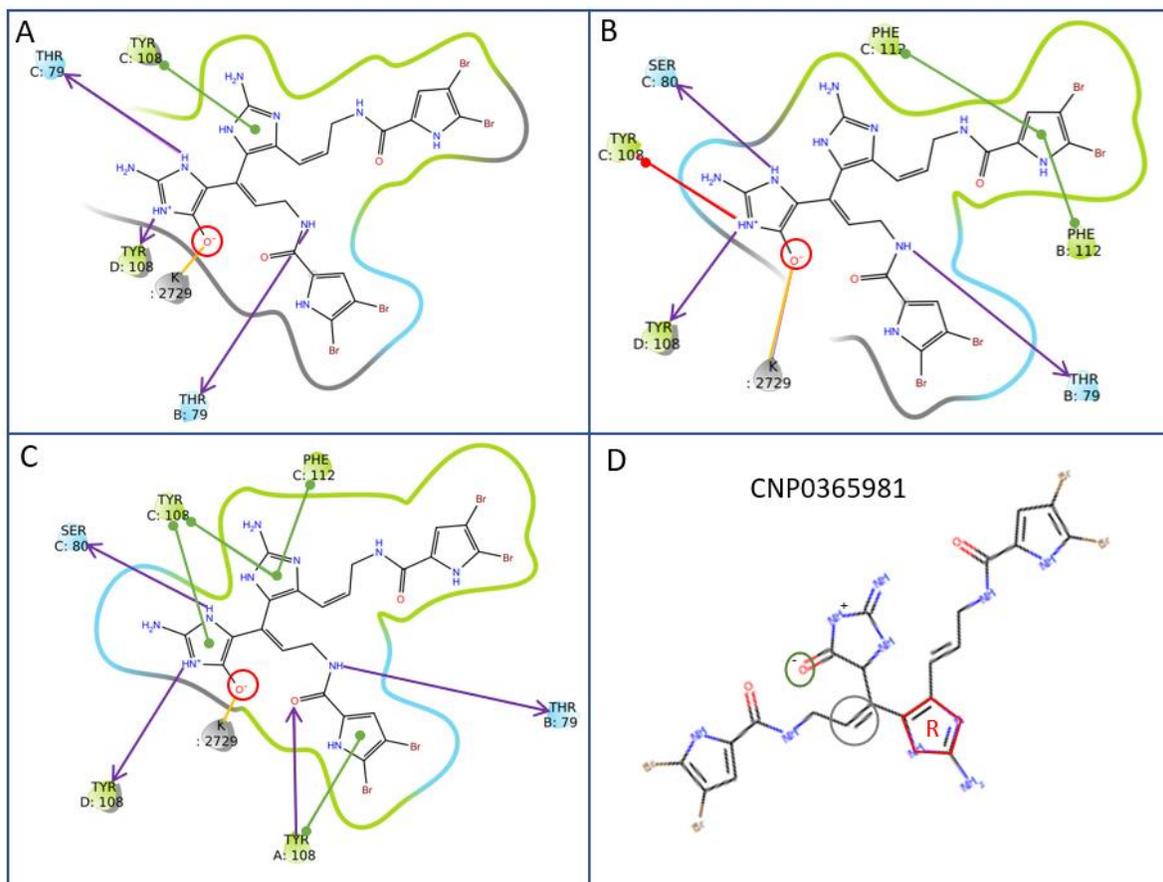


**Gráfico 3: Mapa de contacto de residuos del sitio de unión de hERG:** Se muestra el número de Interacciones de residuos del sitio de unión en cada frame de la DM. Las barras de color naranja oscuro reflejan aminoácidos que tienen cuatro o más interacciones con el ligando en cada frame de la DM. Ej.: Y108C tienen 4 o más interacciones en algunos frames.

En la Figura 23 y Tabla 4, se indica que hay presente tres residuos reportados del sitio de unión que se encuentran en 3 poses analizadas durante la DM: 0ns, 100 ns y 250 ns (que corresponden a la pose del *docking*, inicio de la producción y final de la producción respectivamente) generando algún tipo de contacto con el CN. Siendo estos la T79 de la cadena B y la Y108 de la cadena D y C. Este último (Y108 C) forma una interacción pi-pi stacking con la parte aromática del farmacóforo del CN (Figura 23d), en la pose de *docking* y a los 250 ns, mientras que la interacción formada por T79 B y Y108 D es un enlace de hidrógeno en las tres poses. Al comparar lo indicado para Y108 C en el gráfico 3 con la Figura 23c se confirma que este residuo forma más de un contacto en algunos frames de la DM.

Los residuos S80 y F112 de la cadena C forman contacto con el CN en el nanosegundo 100 y 250 (Figura 23b y c), siendo un enlace de hidrógeno con S80 y una interacción pi-pi stacking con F112, la cual en el nanosegundo 250 es con el grupo aromático del farmacóforo del CN (Figura 23d). Por otro lado, T79 C genera enlaces de hidrógeno en la pose inicial, F112 B forma interacciones pi-pi stacking a los 100 ns y Y108 A

establece también un contacto tipo pi-pi stacking a los 250 ns. El contacto formado por F112 B no se establece con la parte aromática del farmacóforo del CN (Figura 23d), al igual que para Y108 A. La interacción del compuesto CNP0365981 con estos cinco aminoácidos (Tabla 4) posee gran relevancia, debido a que fueron reportados como residuos del sitio de unión de los NCAs en el canal hERG.



**Figura 23: Interacciones formadas entre hERG y CNP0365981 a (A) Pose del *docking*, (B) 100 ns y (C) 250 ns.** La carga negativa de CNP0365981 se encuentra encerrada en rojo. Los residuos que forman interacción se encuentran escritos. Interacciones: *h-bond* (flecha morada), *salt bridge* (amarillo), *pi-pi stacking* (verde) y *pi-cation* (rojo). Residuos hidrofóbicos (verde) y polares (celeste). (D) CNP0365981 y los grupos del farmacóforo correspondientes. El grupo cargado negativamente se encuentra encerrado en un círculo verde, el grupo hidrofóbico en un círculo gris y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.

La interacción entre la carga negativa de CNP0365981 y el  $K^+$  se encuentra representada en la Figura 23 por una línea amarilla, siendo del tipo puente salino. Se muestra también la distancia entre CNP0365981 y el  $K^+$  en la Tabla 4. Este contacto se genera en las 3 poses analizadas durante la DM, debido a que la carga negativa del CN se encuentra orientada hacia el filtro de selectividad en la pose de *docking* y a lo largo de la producción. A su vez, al observar la Figura Suplementaria 1 se aprecia

como la distancia entre el ión K<sup>+</sup> y la carga negativa en hERG se mantiene entre 2.6 Å y 3.2 Å, lo que sugiere que esta interacción se forma en la gran mayoría de la DM.

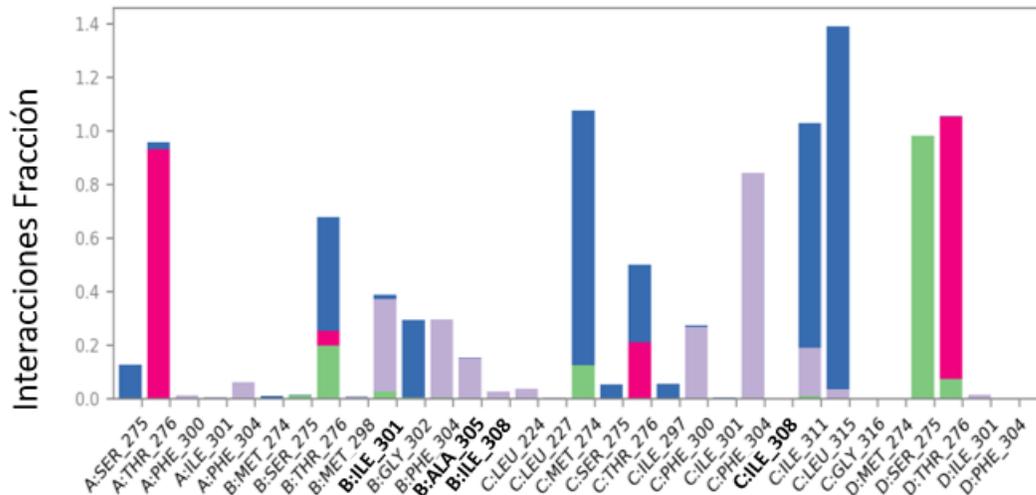
Pose Docking			Pose 100 ns			Pose 250 ns		
Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å
T79 C	<i>h-bond</i>	1,96	T79 B	<i>h-bond</i>	2,28	F112 C	<i>pi-pi stacking</i>	5,2
Y108 D	<i>h-bond</i>	1,83	S80 C	<i>h-bond</i>	1,89	Y108 C	<i>pi-pi stacking (a)</i>	4,13
Y108 C	<i>pi-pi stacking</i>	4,05	Y108 D	<i>h-bond</i>	2,09	Y108 C	<i>pi-pi stacking (b)</i>	4,02
T79 B	<i>h-bond</i>	1,76	Y108 C	<i>pi cation</i>	4,27	S80 C	<i>h-bond</i>	2,16
ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,93	F112 C	<i>pi-pi stacking</i>	5,38	Y108 D	<i>h-bond</i>	2,24
			F112 B	<i>pi-pi stacking</i>	5,31	T79 B	<i>h-bond</i>	2,46
			ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,72	Y108 A	<i>pi-pi stacking</i>	4,95
						ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,9

**Tabla 4. Residuos/ión y tipos de interacción generados con el CN en hERG, y sus distancias.** Los residuos que se encuentran coloreados son los que se repiten en al menos dos de las tres poses indicadas. La T79 de la cadena B, y la Y108 de la cadena C y D son residuos que se repiten en todas las poses.

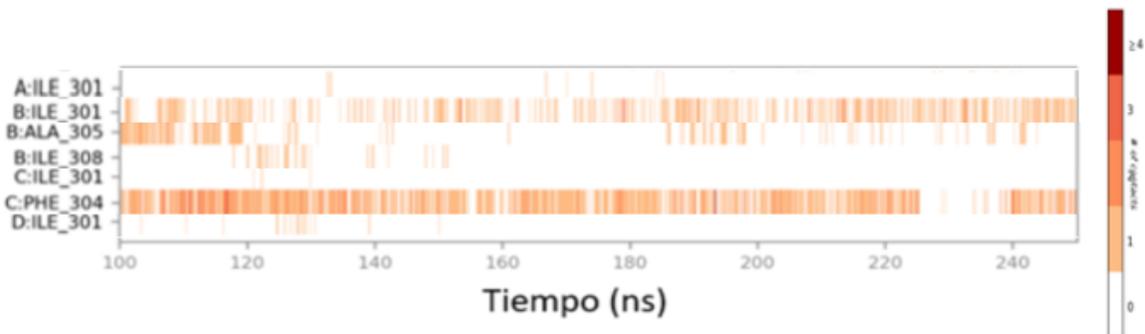
#### 5.6.2.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal BKCa.

En el gráfico 4 se observan todas las interacciones formadas entre CNP0365981 y el canal BK<sub>Ca</sub>. De los 6 residuos del sitio de unión de los NCA reportados en literatura (I301, A305, I308 y P309), el CN genera interacción con los aminoácidos I301, A305 e I308 de la cadena B. Manteniendo esta interacción en un 40%, 20% y 7% a lo largo de la producción de dinámica molecular, respectivamente.

En el gráfico 5 se pueden ver los números de contactos que forman cada residuo en cada *frame* de la DM. En donde I301 de la cadena A, B y C genera en algún instante un contacto con el CN, siendo I301 B el que más interacciones establece a lo largo de la producción de dinámica. En cambio, A305 y I308 solo forma contacto con el CN, si es que estos residuos son de la cadena B. La P309 fue el único aminoácido que no estableció algún tipo de interacción con el CN a lo largo de la producción de dinámica.

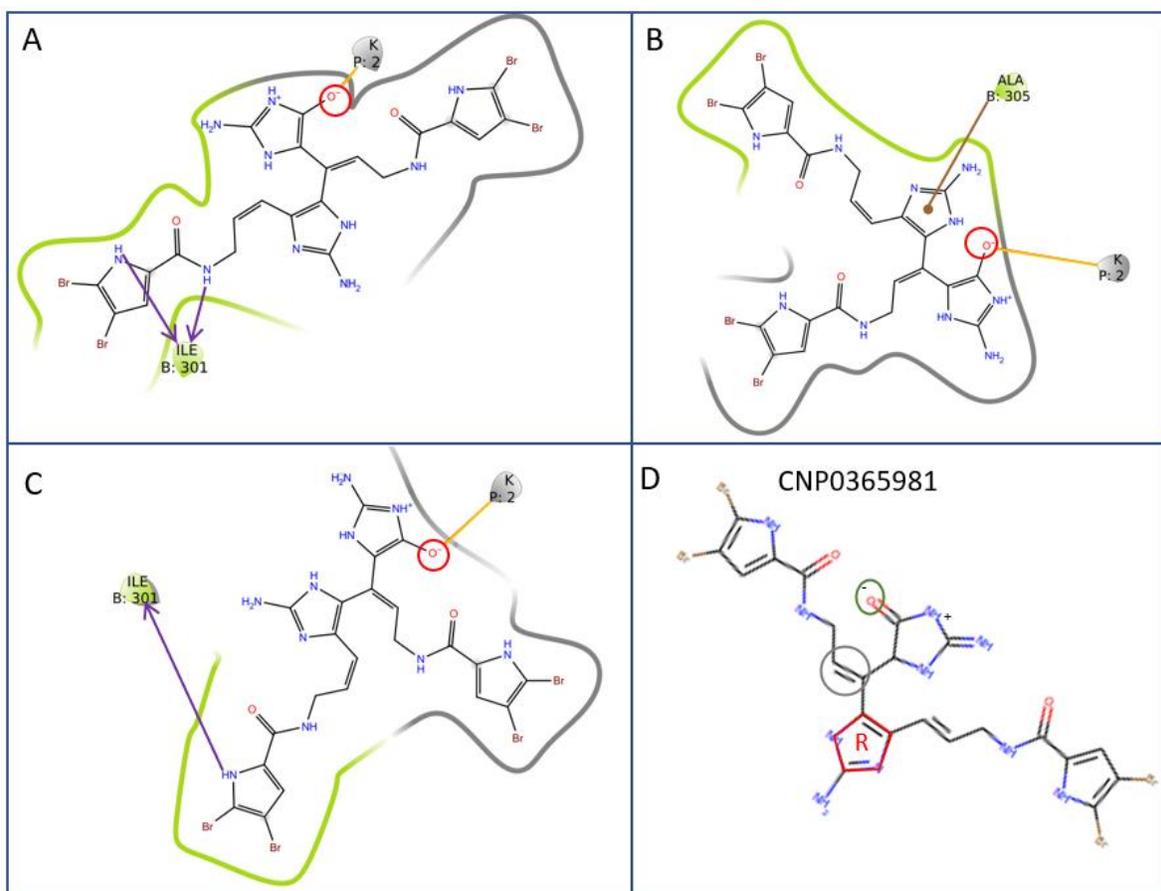


**Gráfico 4: Contactos Proteína-Ligando en BKCa:** Porcentaje de interacciones durante la dinámica molecular. Ej.: El residuo ILE301 de la cadena B posee un 0.4 de interacción con el ligando CNP0365981. Esto indica que esta interacción se mantiene durante un 40% de la DM (60ns de los 150ns). Los residuos del sitio de unión que interactúan con el compuesto son ILE301, ALA305 e ILE308 de la cadena B, y ALA305, ILE308 y PRO309 de la cadena C. Enlaces de hidrógeno en verde, interacciones hidrofóbicas en morado, interacciones iónicas en rosa y puentes de agua en azul.



**Gráfico 5: Mapa de contacto de residuos del sitio de unión de BKCa:** Se muestra el número de interacciones de residuos reportados en cada frame de la DM. Las barras de color naranja oscuro reflejan aminoácidos que tienen cuatro o más interacciones con el ligando en cada frame de la DM. Ej.: F304 de la cadena C tienen más de 1 interacción en algunos frames.

El residuo I301 de la cadena B según los gráficos 4 y 5 es, de los residuos del sitio de unión, el que más interacciones forma a lo largo de la producción, formando puentes de agua, enlaces de hidrógeno y contactos hidrofóbicos con el CN, siendo este último el que más se genera. En la pose inicial (Figura 24a) este residuo se encuentra estableciendo dos interacciones a la vez con el ligando (Tabla 5). Mientras que para 100 ns este no forma interacciones, solo la A305 B forma una interacción hidrofóbica marcada en café (Figura 24b) con la parte aromática del farmacóforo CN (Figura 24d). En el nanosegundo 250 la I301 B forma nuevamente un puente de hidrógeno.



**Figura 24: Interacciones formadas entre BKCa y CNP0365981 a (A) Pose del *docking*, (B) 100 ns y (C) 250 ns de la producción.** La carga negativa de CNP0365981 se encuentra encerrada en rojo. Los residuos que forman interacción se encuentran escritos. Interacciones: *h-bond* (flecha morada), *salt bridge* (amarillo), interacción hidrofóbica (café). Residuos hidrofóbicos (verde). **(D) CNP0365981** y los grupos del farmacóforo correspondientes. El grupo cargado negativamente se encuentra encerrado en un círculo verde, el grupo hidrofóbico en un círculo gris y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.

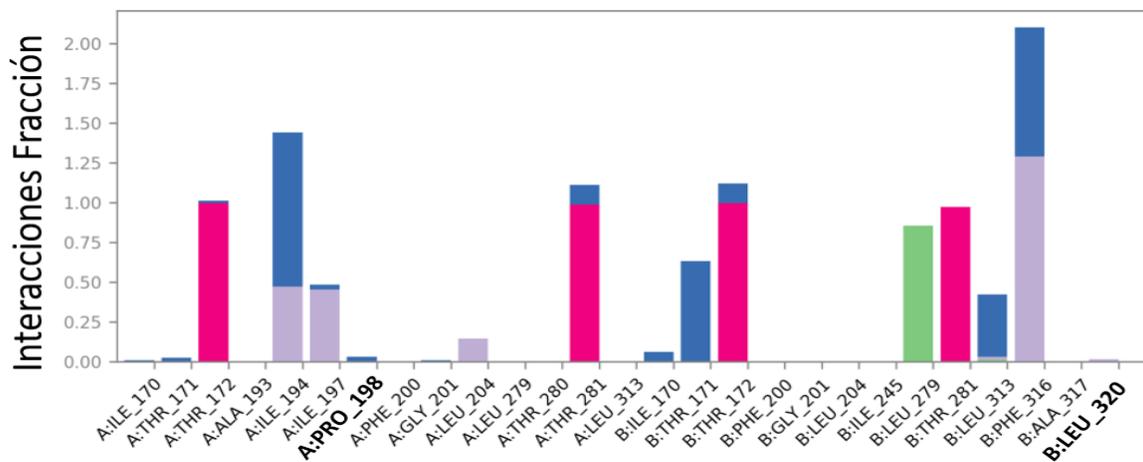
Es importante que la carga negativa de CNP0365981 en BK<sub>Ca</sub> se encuentre posicionada por debajo del filtro de selectividad a lo largo de la producción de dinámica molecular. En la Figura 24 se puede observar cómo es que la parte cargada negativamente del CN se encuentra haciendo contactos con el ión potasio en la pose *docking*, a los 100 ns y 250 ns. En la Figura Suplementaria 2 se aprecia que desde 125 ns la distancia entre la carga negativa y el ión se mantiene entre 2.5 Å y 3.2 Å, sugiriendo la formación de esta interacción en la gran mayoría de la DM.

Pose inicial			Pose 100 ns			Pose 250 ns		
Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å
I301 B	<i>h-bond (a)</i>	2,12	A305 B	hidrofóbica	3,2	I301 B	<i>h-bond</i>	2,77
I301 B	<i>h-bond (b)</i>	1,88	Ión potasio	<i>salt bridge</i>	3,37	Ión potasio	<i>salt bridge</i>	3,02
Ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,76						

**Tabla 5. Residuos/ión y tipos de interacción generados con el CN en BK<sub>Ca</sub>, y sus distancias.** Los residuos que se encuentran coloreados son los que se repiten en al menos dos de las tres poses indicadas. La I301 de la cadena B se repite en dos poses.

### 5.6.3.- Análisis de la trayectoria del ligando CNP0365981 con el canal TREK-2.

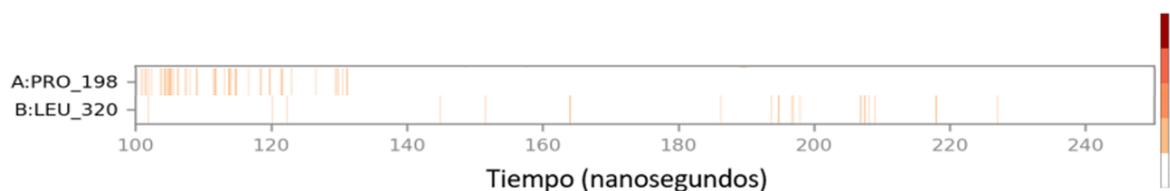
Al realizar los análisis de trayectoria en TREK-2 estos indican que, en la producción de la dinámica molecular, CNP0365981 posee interacciones con residuos que se encuentran a un cutoff de 5 Å, pero no con los residuos del sitio de unión (P198, L320, S321 e I323). Con P198 y L320 establece contactos en algún punto de la producción, pero aproximadamente en un 2% y 1% respectivamente (gráfico 6), lo cual es despreciable. Para el caso de P198, los contactos se establecen entre el inicio de la producción y los 130 ns, mientras que L320 forma interacciones desde los 100 ns hasta los 228 ns, las cuales como se aprecia en el gráfico 7 son bastante reducidas.



**Gráfico 6: Contactos Proteína-Ligando en TREK-2:** Porcentaje de interacciones durante la dinámica molecular. Ej.: El residuo P198 de la cadena A posee un 0.02 de interacción con el ligando CNP0365981. Esto indica que esta interacción se mantiene durante un 2% de la DM (3ns de los 150ns). Los residuos importantes del sitio de unión son PRO198 de la cadena A, y LEU320 de la cadena B. Enlaces de Hidrógeno en verde, interacciones hidrofóbicas en morado, interacciones iónicas en rosa y puentes de agua en azul.

Al comparar la posición estructural que adopta el compuesto natural con la del ligando de referencia (Figura 19b), se puede observar que incluso durante la DM, no se superponen entre sí. Es por ello que el CN se encuentra alejado de los residuos reportados L320, S321 y I323, dificultando la formación de contactos entre ellos y el ligando.

La formación del puente salino entre K<sup>+</sup> y la carga negativa del CN se cumple ya que la parte cargada del CN se encuentra abajo del FS en la posición inicial, generando esta interacción, lo cual se puede ver a los 100 ns y a los 250 ns (Figura 25 y Tabla 6), manteniendo una distancia menor a 3 Å. A su vez, en la Figura Suplementaria 3 se observa como la distancia entre la carga negativa del CN y el ión se mantiene entre 2.5 Å y 3 Å, cumpliendo con la formación de esta interacción.

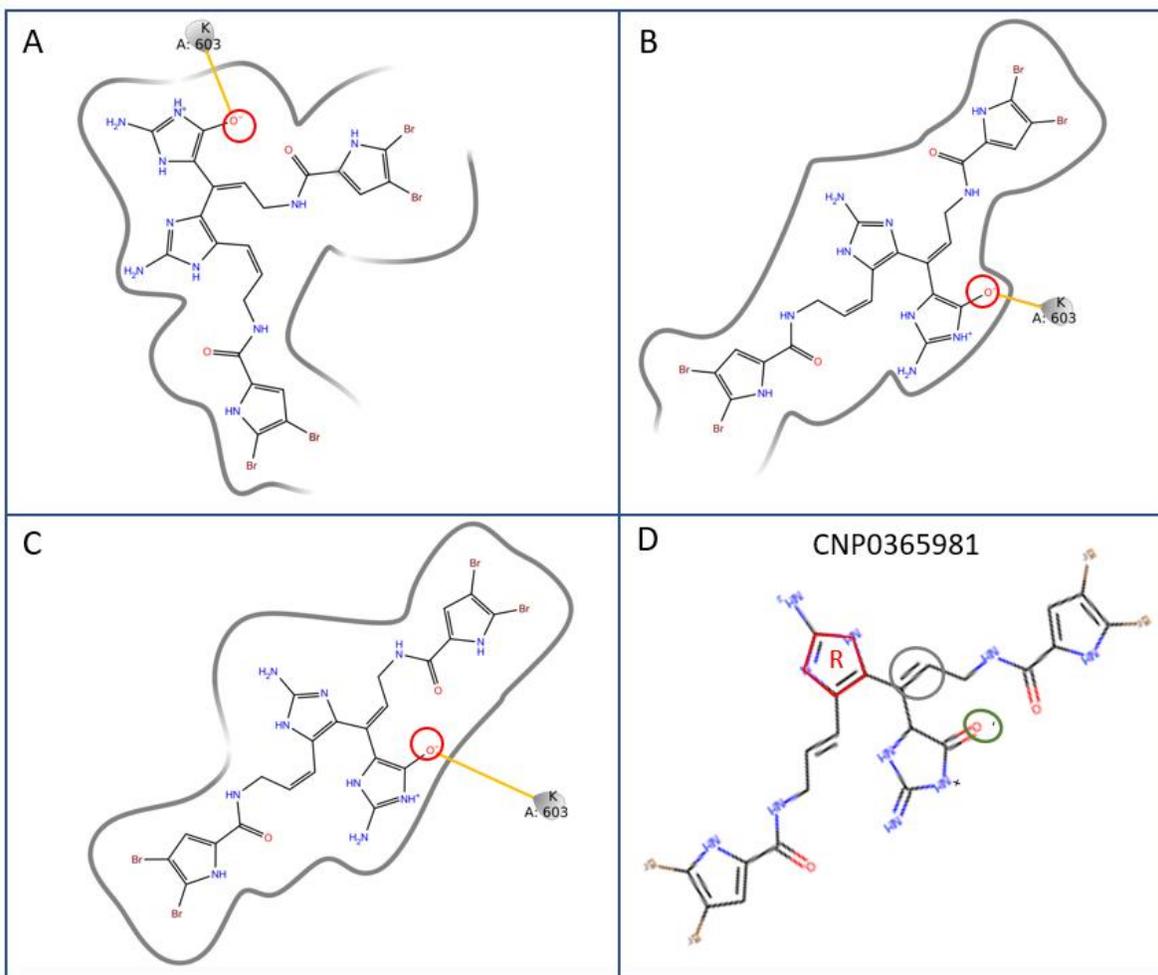


**Gráfico 7: Mapa de contacto de residuos del sitio de unión de TREK-2:** Se muestra el número de interacciones de residuos reportados en cada frame de la DM. Las barras de color naranja oscuro reflejan aminoácidos que tienen cuatro o más interacciones con el ligando en cada frame de la DM. Ej.: P198 cadena A tiene sólo 1 tipo de interacción en algunos *frames*.

De los aminoácidos no reportados como parte del sitio de unión y que forman una interacción con el CN, la L279, I194 y F316 (gráfico 6) han sido objeto de estudio debido a su implicancia en la unión de la norfluoxetina a TREK-2 (Dong y col., 2015), un inhibidor del canal. Se sugiere realizar mutagénesis sitio-dirigida en estos residuos para entender el mecanismo de activación de este canal por el compuesto CNP0365981, en el caso que este active a TREK-2.

Pose inicial			Pose 100 ns			Pose 250 ns		
Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å	Residuo/ión	Tipo interacción con el CN	Distancia Å
ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,98	ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,74	ión potasio	<i>salt bridge</i>	2,85

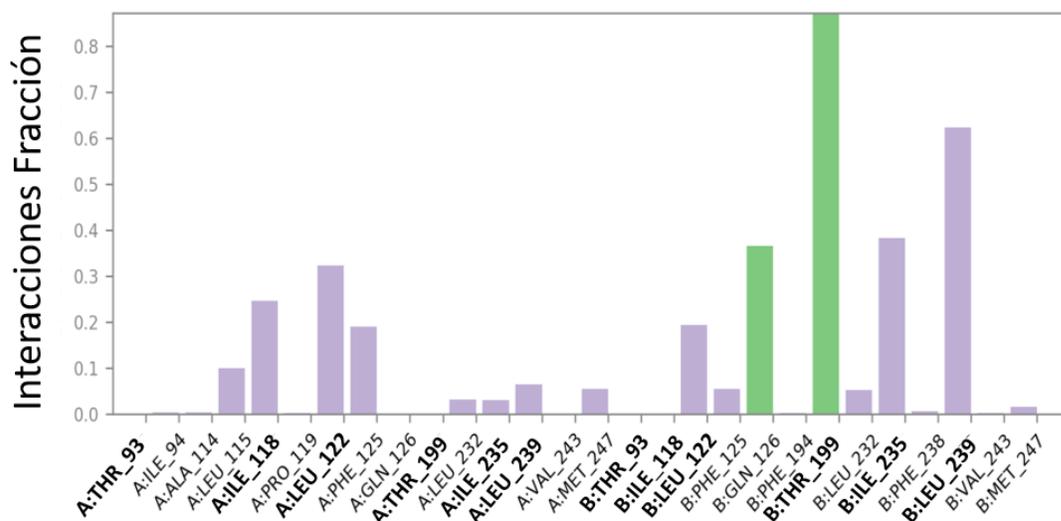
**Tabla 6. Residuos/ión y tipos de interacción generados con el CN en TREK-2, junto a sus distancias.** El puente salino formado entre la parte cargada negativamente del CN y el K<sup>+</sup> se encuentra presente en las 3 poses.



**Figura 25: Interacciones formadas entre TREK-2 y CNP0365981 a (A) Pose del *docking*, (B) 100 ns y (C) 250 ns de la producción. La carga negativa de CNP0365981 se encuentra encerrada en rojo. Interacciones: *h-bond* (flecha morada) y *salt bridge* (amarillo). (D) CNP0365981 y los grupos del farmacóforo correspondientes. El grupo cargado negativamente se encuentra encerrado en un círculo verde, el grupo hidrofóbico en un círculo gris y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.**

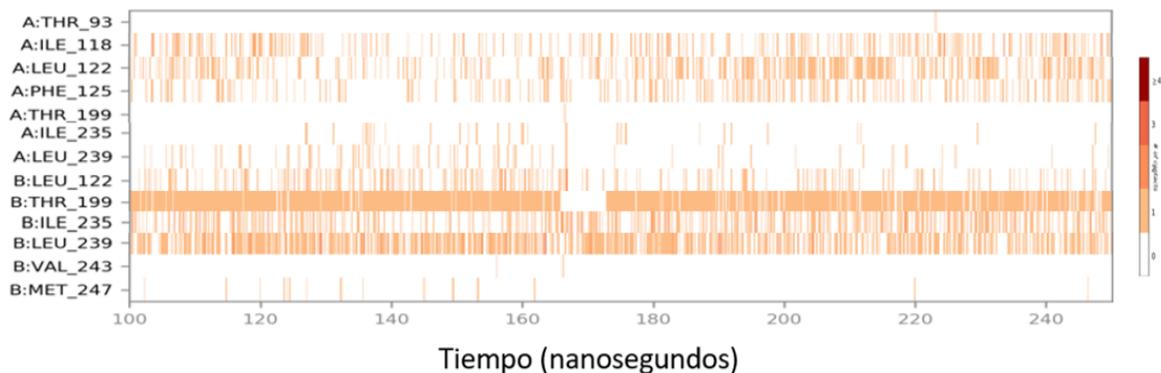
#### 5.6.4.- Análisis de trayectoria del ligando ZINC9708083 en el canal TASK-1.

Al analizar la trayectoria de TASK-1 mediante los gráficos 8 y 9 se observó que 8 de los 12 residuos del sitio de unión reportados en literatura (T93, I118, L122, T199, I235, L239, V243 y M247), mantienen interacciones en un <1%, 25%, 35%, 90%, 40%, 63%, 1% y 5% respectivamente con el CN.



**Gráfico 8: Contactos Proteína-Ligando en TASK-1:** Porcentaje de interacciones durante la dinámica molecular. Ej.: El residuo L239 de la cadena B posee un 0.63 de interacción con el ligando ZINC000009708083. Esto indica que esta interacción se mantiene en un 63% de la DM (94 ns de 150ns). Los residuos importantes del sitio de unión son T92, T93, I118, L122, T198, T199, I235, G236, L239, N240, V243 y M247. Enlaces de Hidrógeno en verde, interacciones hidrofóbicas en morado, interacciones iónicas en rosa y puentes de agua en azul.

En la Figura 26a se puede apreciar cómo el CN no está generando interacciones con los residuos reportados del sitio de unión en la posición *docking* lo cual cambia al comenzar la producción de la dinámica, llegando a estar presente contactos en algunos casos en un 90% de la DM como es con la T199 B, interacción que se puede apreciar en la Figura 26 como puente de hidrógeno. Se muestra este residuo en tres poses distintas (*docking*, 100ns y 250ns); En las poses a 100 ns y 250 ns se aprecia a L122 B generando interacciones hidrofóbicas con anillos aromáticos del CN (Figuras 26b y 26c).

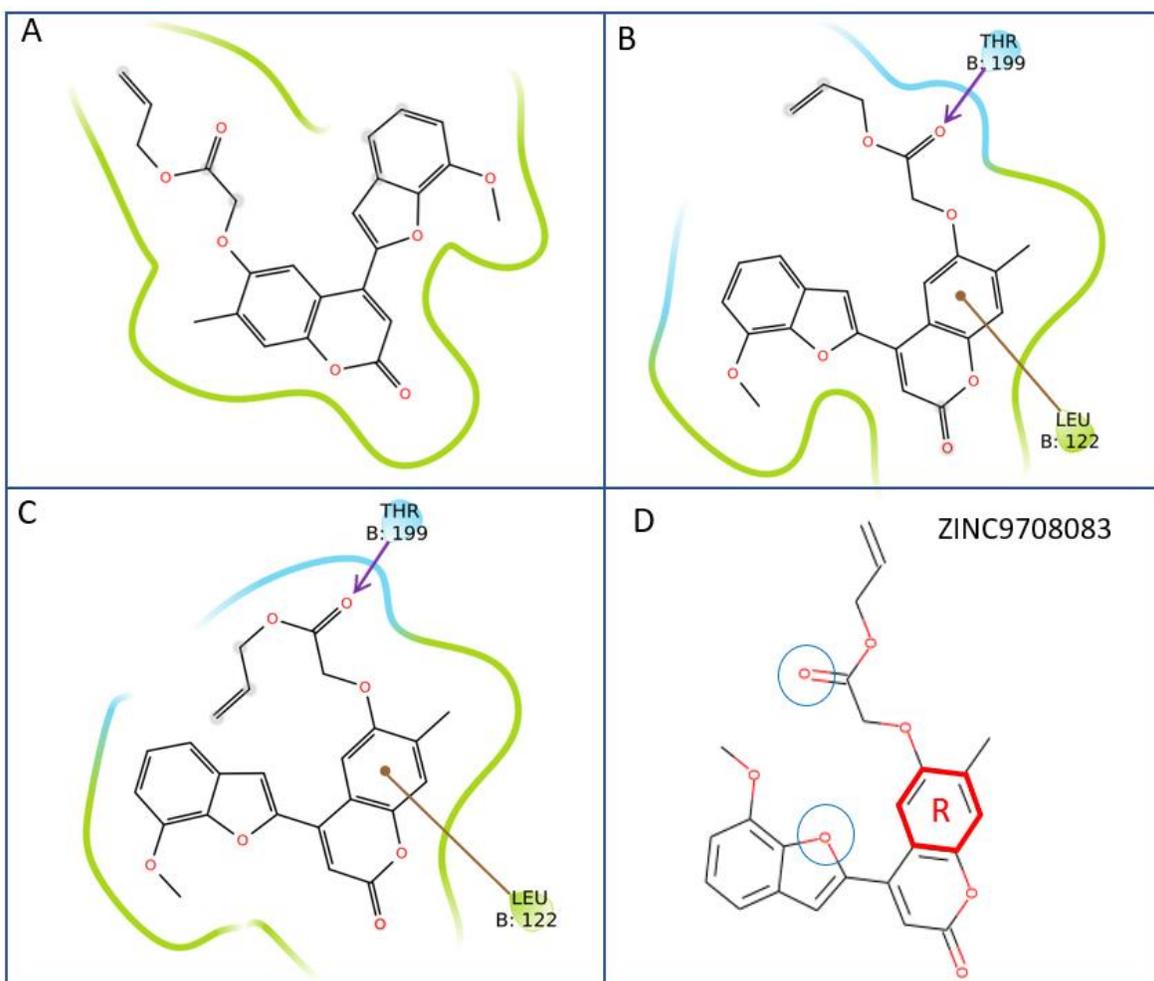


**Gráfico 9: Mapa de contacto de residuos del sitio de unión de TASK-1:** Se muestra el número de interacciones de residuos reportados en cada *frame* de la DM. Las barras de color naranja oscuro reflejan aminoácidos que tienen cuatro o más interacciones con el ligando en cada *frame* de la DM. Ej.: L239 de la cadena B tienen más de 1 interacción en algunos *frames*.

Los tipos de contactos formados por T199 B y L122 B se pueden encontrar en la Tabla 7, en donde como ya se señaló se establecen puentes de hidrógeno con la T199 B e interacciones hidrofóbicas con la L122 B. En la Tabla 7 se observa que la distancia entre T199 B y ZINC9708083 es menor a 2.8 Å a los 100 y 250 ns. Mientras que las interacciones hidrofóbicas también tienen una distancia menor a 4.0 Å (Tabla 7), lo que permite que este tipo de interacción se forme, debido a que se encuentra interactuando la parte hidrofóbica del residuo junto a un anillo aromático. La interacción que forma la T199 B se genera con el grupo aceptor de enlace de hidrógeno del CN, definido por el farmacóforo (Figura 26b c y d), como se sugiere en la literatura (Kiper y col., 2015). Mientras que la interacción hidrofóbica formada con L122 B también es con el grupo aromático definido por el farmacóforo (Figura 26b c y d), por lo que las partesceptoras de enlace de hidrógeno y aromática están generando los contactos esperados.

Pose inicial			Pose 100 ns			Pose 250 ns		
Residuo	Tipo interacción	Distancia Å	Residuo	Tipo interacción	Distancia Å	Residuo	Tipo interacción	Distancia Å
			T199 B	<i>h-bond</i>	2,31	T199 B	<i>h-bond</i>	2,76
			L122 B	hidrofóbica	3,66	L122 B	hidrofóbica	3,32

**Tabla 7. Residuos y tipos de interacción generados con el CN en TASK-1, con sus distancias.** Los residuos que se encuentran coloreados son los que se repiten en al menos dos de las tres poses indicadas. La T199 de la cadena B se repite en la pose 100ns y 250ns.

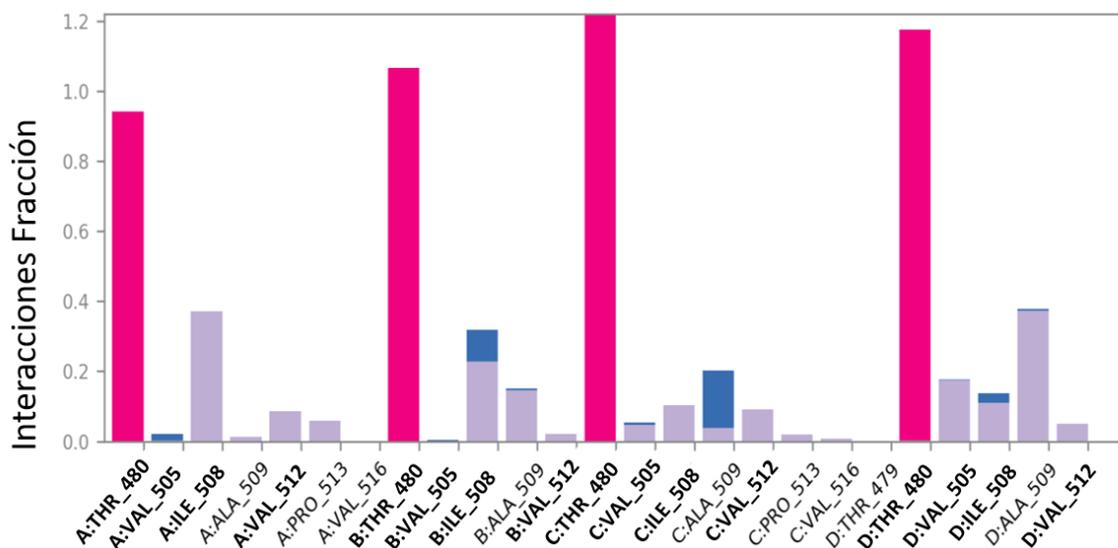


**Figura 26: Interacciones formadas entre TASK-1 y ZINC000009708083 a (A) Pose del *docking*, (B) 100 ns y (C) 250 ns. Los residuos que forman interacción se encuentran escritos. Interacciones: *h-bond* (flecha morada) e hidrofóbica (café). Residuos hidrofóbicos (verde) y polares (celeste). (D) ZINC000009708083 y los grupos del farmacóforo correspondientes. Los grupos aceptores de enlace de hidrógeno están encerrados en un círculo azul y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.**

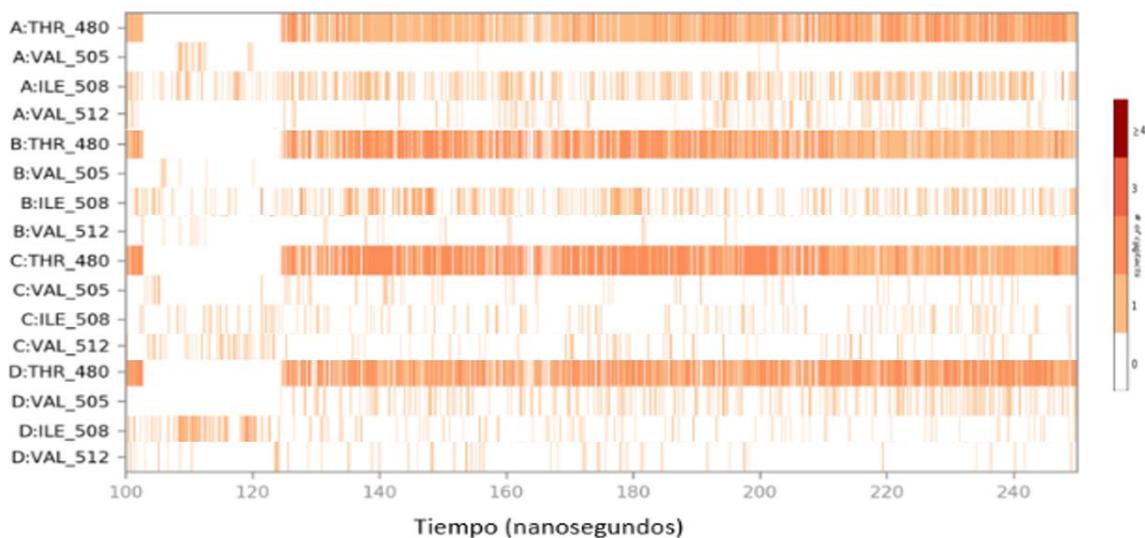
### 5.6.5.- Análisis de trayectoria del ligando ZINC9708083 con el canal Kv1.5.

Al observar los residuos que generan interacciones con el CN se puede apreciar que los 4 aminoácidos del sitio de unión (T480, V505, I508, V512) establecen en algún momento de la producción, a lo menos un tipo de contacto. Las T480 en las cuatro cadenas mantienen interacciones desde un 95% en adelante, teniendo incluso valores superiores al 100% como es el caso de la cadena B, C y D (gráfico 10 y 11). Estos aminoácidos desde los 125 nanosegundos comienzan a generar varios contactos en un solo *frame*. El contacto que forman es del tipo iónico, el cual significa que la T480

está formando una interacción con el K<sup>+</sup>, y a su vez, el K<sup>+</sup> forma una interacción con el CN.



**Gráfico 10: Contacto Proteína-Ligando en Kv1.5:** Porcentaje de interacciones durante la dinámica molecular. Ej.: El residuo A509 de la cadena D posee un 0.4 de interacción con el ligando ZINC000009708083. Esto indica que esta interacción se mantiene en un 40% de la DM (60ns de 150ns). Los residuos importantes del sitio de unión son T480, V505, I508 y V512. Enlaces de Hidrógeno en verde, interacciones hidrofóbicas en morado, interacciones iónicas en rosa y puentes de agua en azul.

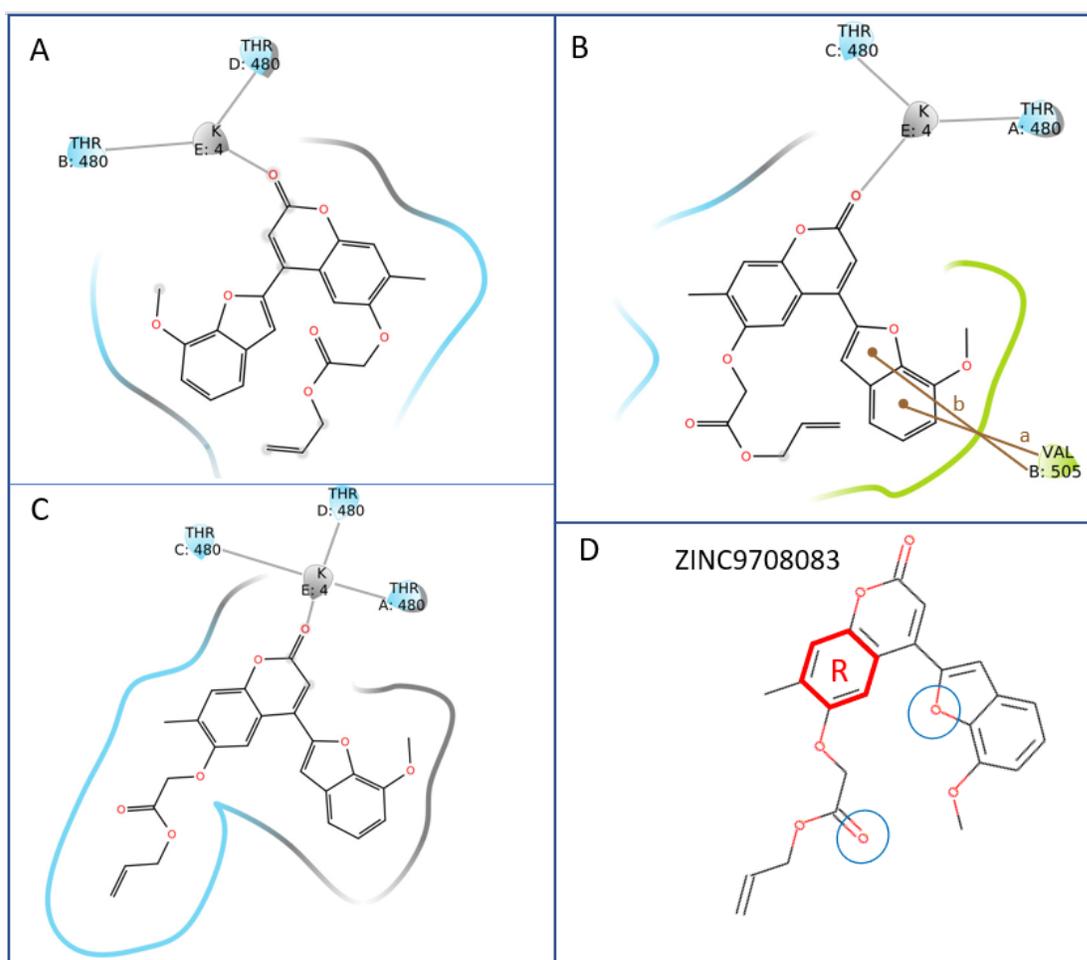


**Gráfico 11: Mapa de contacto de Interacciones Proteína-Ligando en Kv1.5:** Se muestra el número de interacciones en cada frame de la DM. Las barras de color naranja oscuro reflejan aminoácidos que tienen cuatro o más interacciones con el ligando en cada frame de la DM. Ej.: T480 cadena D tienen más de 1 interacción en algunos frames.

Por otro lado, los residuos V505, I508 y V512 si bien no mantienen por más de un 40% la interacción, generan algún tipo de contacto a lo largo de la producción de la dinámica, siendo estos mayoritariamente hidrofóbicos (Figura 27b). Por ejemplo, la

I508 A mantiene interacciones en un 37% de la DM mientras que la I508 B posee un 35%. La V505 alcanza su máximo con un 20% en la cadena D y la V512 C interactúa un 9% de la DM (gráfico 10). En el gráfico 11 se puede ver como los residuos I508 A y B establecen a lo largo de la producción de la dinámica más interacciones que sus homólogos de las cadenas C y D. De los cuatro residuos, V505 D es el que más contactos forma a lo largo de la producción de DM.

En la Figura 27 se pueden apreciar las interacciones que se forman entre los residuos reportados y el CN. En esta Figura y en la Tabla 8 se observa que el tipo de contacto formado es una interacción iónica entre las T480 del filtro de selectividad con  $K^+$ , y este ión con el CN. Este es un contacto proteína-metal-ligando, el cual es similar al enlace de hidrógeno, siendo ambos enlaces polares. Sin embargo, la interacción PML es mucho más fuerte que la del enlace de hidrógeno).



**Figura 27: Interacciones formadas entre Kv1.5 y ZINC000009708083 a (A) Pose del docking, (B) 100 ns y (C) 250 ns de la producción. Los residuos que forman interacción se encuentran escritos. Interacciones: Iónica (gris), Hidrofóbica (café). Residuos hidrofóbicos (verde) y polares (celeste). (D) ZINC000009708083 y los grupos del**

farmacóforo correspondientes. Los grupos aceptores de enlace de hidrógeno están encerrados en un círculo azul y el anillo aromático en rojo, con una R al centro.

Pose inicial			Pose 100 ns			Pose 250 ns		
Residuo/ion	Tipo interacción	Distancia Å	Residuo/ion	Tipo interacción	Distancia Å	Residuo/ion	Tipo interacción	Distancia Å
T480 B - lón	lónica	3,26	T480 A- lón	lónica	3,12	T480 A- lón	lónica	3,04
T480 D- lón	lónica	3,4	T480 C- lón	lónica	2,97	T480 C- lón	lónica	3,37
lón - CN	lónica	3,18	lón - CN	lónica	3,1	T480 D- lón	lónica	2,93
			V505 B	hidrofóbica (a)	3,3	lón - CN	lónica	3,26
			V505 B	hidrofóbica (b)	3,44			

**Tabla 8. Residuos/lón y tipos de interacción generados con el CN en Kv1.5 y sus distancias.** Se observan los tipos de interacción formados con los residuos reportados

Si bien no todas las interacciones que se formaron entre los residuos reportados del sitio de unión se mantienen por encima de un 50%, sí se formaron contactos entre todos los residuos del sitio de unión y el compuesto natural. Siendo las T480 del filtro de selectividad los aminoácidos que más interacciones mantienen. Este tipo de interacción que generan las T480 ha sido reportado en el trabajo de Strutz-Seebohm y col., 2007 para ICAGEN y S9947 que son compuestos que contiene el farmacóforo (Figura 5).

## 6.- Conclusión

En esta tesis de investigación se buscaron compuestos naturales con rol agonista para los canales TREK-2, hERG y BK<sub>Ca</sub>, y rol antagonista para los canales TASK-1 y Kv1.5.

Se confeccionó una BDU de 642.594 compuestos naturales, obteniendo 45.853 compuestos naturales con posible rol agonista y 320.617 con posible rol antagonista, al realizar un cribado virtual de la BDU con los farmacóforos de referencia. Estos compuestos se redujeron a 5000 CN al ocupar el PhaseScreenScore.

Al emplear a los 5000 CN con posible rol agonista o antagonista en cribados virtuales basados en estructura y usar distintos filtros (DockingScore, MMGBSA, Polifarmacología, etc.), se logró encontrar un CN que contiene el farmacóforo agonista (CNP0365891) para los canales TREK-2, hERG y BK<sub>Ca</sub> y un CN que contiene el farmacóforo antagonista (ZINC000009708083) para los canales TASK-1 y Kv1.5. Se observó durante dinámicas moleculares, que ZINC000009708083 interactúa con los residuos del sitio de unión en TASK-1 y Kv1.5, manteniendo interacciones en su mayoría con los residuos de treonina del filtro de selectividad de cada canal. Para el caso de CNP0365891 si bien este compuesto no interactuó con los residuos del sitio de unión en TREK-2, sí lo hizo en los canales hERG y BK<sub>Ca</sub>. CNP0365891 estableció interacciones con 4 de los 6 residuos del sitio de unión en hERG, y 3 de los 4 residuos del sitio de unión en BK<sub>Ca</sub>.

El próximo paso de esta investigación será realizar experimentos en laboratorio húmedo para observar si es que, efectivamente, los CN están actuando de la forma deseada en los canales. Se recomienda realizar mediciones de electrofisiología mediante la técnica de *patch-clamp* con los compuestos ZINC000009708083 y CNP0365891 en los canales correspondientes, para determinar si es que estos pueden ser postulados como compuestos líderes para el desarrollo de fármacos para tratar la fibrilación atrial, accidentes cerebrovasculares (isquemias) o epilepsia.

## 7.- Bibliografía

- Alexander, S. P., Peters, J. A., Kelly, E., Marrion, N. V., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Southan, C., Davies, J. A., & CGTP Collaborators. (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels: THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 174, S130-S159. <https://doi.org/10.1111/bph.13879>
- Amir, M., Mohammad, T., Prasad, K., Hasan, G. M., Kumar, V., Dohare, R., Islam, A., Ahmad, F., & Imtaiyaz Hassan, Md. (2020). Virtual high-throughput screening of natural compounds in-search of potential inhibitors for protection of telomeres 1 (POT1). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(15), 4625-4634. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1682052>
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200-216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología la vida en la tierra, anatomía y fisiología animal, evolución y ecología*. Pearson Educación.
- Aung, T., Qu, Z., Kortschak, R., & Adelson, D. (2017). Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 656. <https://doi.org/10.3390/ijms18030656>
- Baggetta, A. M., Bayliss, D. A., Czirják, G., Enyedi, P., Goldstein, S. A. N., Lesage, F., Minor, Jr., D. L., Plant, L. D., Sepúlveda, F., & Winn, B. T. (2021). Two P domain potassium channels in GtoPdb v.2021.2. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2021(2). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F79/2021.2>
- Bai, Y., Yu, X., Chen, H., Horne, D., White, R., Wu, X., Lee, P., Gu, Y., Ghimire-Rijal, S., Lin, D. C.-H., & Huang, X. (2020). Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *ELife*, 9, e53311. <https://doi.org/10.7554/eLife.53311>
- Bajorath, J. (2009). Pharmacophore. En M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 2310-2312). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-47648-1\\_4502](https://doi.org/10.1007/978-3-540-47648-1_4502)
- Bausch, A. E., Dieter, R., Nann, Y., Hausmann, M., Meyerdierks, N., Kaczmarek, L. K., Ruth, P., & Lukowski, R. (2015). The sodium-activated potassium channel Slack is required for optimal cognitive flexibility in mice. *Learning & Memory*, 22(7), 323-335. <https://doi.org/10.1101/lm.037820.114>
- Berthold, M. R., Cebon, N., Dill, F., Gabriel, T. R., Kötter, T., Meinel, T., Ohl, P., Sieb, C., Thiel, K., & Wiswedel, B. (2008). KNIME: The Konstanz Information Miner. En C. Preisach, H. Burkhardt, L. Schmidt-Thieme, & R. Decker (Eds.), *Data Analysis, Machine Learning and Applications* (pp. 319-326). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-78246-9\\_38](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78246-9_38)
- Bosshard, H. R., Marti, D. N., & Jelesarov, I. (2004). Protein stabilization by salt bridges: Concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition*, 17(1), 1-16. <https://doi.org/10.1002/jmr.657>
- Brendel, J., & Peukert, S. (2003). Blockers of the Kv1.5 Channel for the Treatment of Atrial Arrhythmias [1]. *Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents*, 1(3), 273-287. <https://doi.org/10.2174/1568016033477441>
- Brennecke, J. T., & de Groot, B. L. (2018). Mechanism of Mechanosensitive Gating of the TREK-2 Potassium Channel. *Biophysical Journal*, 114(6), 1336-1343. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.01.030>
- Burke, K. J., & Bender, K. J. (2019). Modulation of Ion Channels in the Axon: Mechanisms and Function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 221. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00221>
- Cabral, J. H. M., Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M., & Mackinnon, R. (1998). Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N Terminus. *Cell*, 95(5), 649-655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81635-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81635-9)
- Cadaveira Mosquera, A. (2013). *Caracterización de los canales de la subfamilia TREK (K2P) en neuronas del ganglio cervical superior en cultivo*. [Universidad de Vigo]. <http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/135/Caracterización%20de%20los%20canales%20de%20la%20subfamilia%20TREK.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Capener, C. E. (2002). Ion channels: Structural bioinformatics and modelling. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2425-2433. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.20.2425>
- Catterall, W. A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution: Voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Experimental Physiology*, 99(1), 35-51. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071969>
- Dadi, P. K., Vierra, N. C., Days, E., Dickerson, M. T., Vinson, P. N., Weaver, C. D., & Jacobson, D. A. (2017). Selective Small Molecule Activators of TREK-2 Channels Stimulate Dorsal Root Ganglion c-Fiber Nociceptor Two-Pore-Domain Potassium Channel Currents and Limit Calcium Influx. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(3), 558-568. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00301>

- de Haan, S., Greiser, M., Harks, E., Blaauw, Y., van Hunnik, A., Verheule, S., Alessie, M., & Schotten, U. (2006). AVE0118, Blocker of the Transient Outward Current ( $I_{to}$ ) and Ultrarapid Delayed Rectifier Current ( $I_{Kur}$ ), Fully Restores Atrial Contractility After Cardioversion of Atrial Fibrillation in the Goat. *Circulation*, *114*(12), 1234-1242. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.630905>
- de Lera Ruiz, M., & Kraus, R. L. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(18), 7093-7118. <https://doi.org/10.1021/jm501981g>
- Delmas, P., Hao, J., & Rodat-Despoix, L. (2011). Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(3), 139-153. <https://doi.org/10.1038/nrn2993>
- Deng, N. (2019). Using Molecular Dynamics Free Energy Simulation to Compute Binding Affinities of DNA G-Quadruplex Ligands. En D. Yang & C. Lin (Eds.), *G-Quadruplex Nucleic Acids* (Vol. 2035, pp. 177-199). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9666-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9666-7_10)
- Dhasmana, A., Raza, S., Jahan, R., Lohani, M., & Arif, J. M. (2019). High-Throughput Virtual Screening (HTVS) of Natural Compounds and Exploration of Their Biomolecular Mechanisms. En *New Look to Phytomedicine* (pp. 523-548). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00020-3>
- Dietrich, A., & Gudermann, T. (2014). TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. En B. Nilius & V. Flockerzi (Eds.), *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (Vol. 222, pp. 157-188). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_7)
- Diness, J. G., Bentzen, B. H., Sørensen, U. S., & Grønnet, M. (2015). Role of Calcium-activated Potassium Channels in Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *66*(5), 441-448. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000249>
- Dixon, S. L., Smondyrev, A. M., & Rao, S. N. (2006). PHASE: A Novel Approach to Pharmacophore Modeling and 3D Database Searching. *Chemical Biology* <html\_ent Glyph="@amp;" Ascii="&"/> *Drug Design*, *67*(5), 370-372. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2006.00384.x>
- Doggrell, S. A., & Hancox, J. C. (2014). Cardiac safety concerns for domperidone, an antiemetic and prokinetic, and galactagogue medicine. *Expert Opinion on Drug Safety*, *13*(1), 131-138. <https://doi.org/10.1517/14740338.2014.851193>
- Dong, Y. Y., Pike, A. C. W., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., Ruda, G. F., Clausen, M. V., Cao, L., Brennan, P. E., Burgess-Brown, N. A., Sansom, M. S. P., Tucker, S. J., & Carpenter, E. P. (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science*, *347*(6227), 1256-1259. <https://doi.org/10.1126/science.1261512>
- Donner, B. C., Schullenberg, M., Geduldig, N., Hüning, A., Mersmann, J., Zacharowski, K., Kovacevic, A., Decking, U., Aller, M. I., & Schmidt, K. G. (2011). Functional role of TASK-1 in the heart: Studies in TASK-1-deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability. *Basic Research in Cardiology*, *106*(1), 75-87. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0128-x>
- Eastman, P., Friedrichs, M. S., Chodera, J. D., Radmer, R. J., Bruns, C. M., Ku, J. P., Beauchamp, K. A., Lane, T. J., Wang, L.-P., Shukla, D., Tye, T., Houston, M., Stich, T., Klein, C., Shirts, M. R., & Pande, V. S. (2013). OpenMM 4: A Reusable, Extensible, Hardware Independent Library for High Performance Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *9*(1), 461-469. <https://doi.org/10.1021/ct300857j>
- El Khoury, L., Santos-Martins, D., Sasmal, S., Eberhardt, J., Bianco, G., Ambrosio, F. A., Solis-Vasquez, L., Koch, A., Forli, S., & Mobley, D. L. (2019). Comparison of affinity ranking using AutoDock-GPU and MM-GBSA scores for BACE-1 inhibitors in the D3R Grand Challenge 4. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *33*(12), 1011-1020. <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00240-w>
- Elmaaty, A. A., Alhajjar, R., Hamed, M. I. A., Khattab, M., Khalifa, M. M., & Al-Karmalawy, A. A. (2021). Revisiting activity of some glucocorticoids as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: Theoretical study. *RSC Advances*, *11*(17), 10027-10042. <https://doi.org/10.1039/D0RA10674G>
- Feliciangeli, S., Chatelain, F. C., Bichet, D., & Lesage, F. (2015). The family of K<sub>2P</sub> channels: Salient structural and functional properties: The family of K<sub>2P</sub> channels. *The Journal of Physiology*, *593*(12), 2587-2603. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287268>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., & Shenkin, P. S. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, *47*(7), 1739-1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., & Mainz, D. T. (2006). Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *49*(21), 6177-6196. <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
- Gada, K., & Plant, L. D. (2019). Two-pore domain potassium channels: Emerging targets for novel analgesic drugs: IUPHAR Review 26. *British Journal of Pharmacology*, *176*(2), 256-266. <https://doi.org/10.1111/bph.14518>

- Gallego-Yerga, L., Ochoa, R., Lans, I., Peña-Varas, C., Alegría-Arcos, M., Cossio, P., Ramírez, D., & Peláez, R. (2021). Application of ensemble pharmacophore-based virtual screening to the discovery of novel antimetabolic tubulin inhibitors. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 4360-4372. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.039>
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(5), 449-461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Ginsburg, H., & Deharo, E. (2011). A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malaria Journal*, 10(S1), S1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S1>
- González-Cota, A. L., Santana-Calvo, C., Servín-Vences, R., Orta, G., & Balderas, E. (2021). Regulatory mechanisms of mitochondrial BK<sub>ca</sub> channels. *Channels*, 15(1), 424-437. <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1919463>
- Goswami, S. K., Ponnalagu, D., Hussain, A. T., Shah, K., Karekar, P., Gururaja Rao, S., Meredith, A. L., Khan, M., & Singh, H. (2019). Expression and Activation of BKCa Channels in Mice Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury of Isolated Hearts by Modulating Mitochondrial Function. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 194. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00194>
- Grassi, S. M. (2012). Mechanisms of Carrier-Mediated Transport. En *Cell Physiology Source Book* (pp. 153-165). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00011-1>
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(3), 243-265. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.870154>
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7), 1750-1759. <https://doi.org/10.1021/jm030644s>
- He, G., Gong, B., Li, J., Song, Y., Li, S., & Lu, X. (2018). An Improved Receptor-Based Pharmacophore Generation Algorithm Guided by Atomic Chemical Characteristics and Hybridization Types. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1463. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01463>
- Hegazy, L., Gill, L. E., Pyles, K. D., Kaiho, C., Kchouk, S., Finck, B. N., McCommis, K. S., & Elgendy, B. (2022). Identification of Novel Mitochondrial Pyruvate Carrier Inhibitors by Homology Modeling and Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Biomedicines*, 10(2), 365. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020365>
- Herrera-Pérez, S., Campos-Ríos, A., Rueda-Ruzafa, L., & Lamas, J. A. (2021). Contribution of K2P Potassium Channels to Cardiac Physiology and Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6635. <https://doi.org/10.3390/ijms22126635>
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., & Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiological Reviews*, 90(1), 291-366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>
- Hildebrand, P. W., Rose, A. S., & Tiemann, J. K. S. (2019). Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(11), 902-913. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.06.004>
- Institute of Electrical and Electronics Engineers, Association for Computing Machinery, IEEE Computer Society, IEEE Computer Society, & Association for Computing Machinery (Eds.). (2006). *Powerful beyond imagination: SC 06, [2006 IEEE/ACM SC Conference]; November 11 - 17, 2006, Tampa Convention Center, Tampa, Florida; proceedings*. IEEE.
- Irwin, J. J., Tang, K. G., Young, J., Dandarchuluun, C., Wong, B. R., Khurelbaatar, M., Moroz, Y. S., Mayfield, J., & Sayle, R. A. (2020). ZINC20—A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(12), 6065-6073. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00675>
- Iwata, H., Kanda, N., Araki, M., Sagae, Y., Masuda, K., & Okuno, Y. (2021). Discovery of natural TRPA1 activators through pharmacophore-based virtual screening and a biological assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 31, 127639. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127639>
- Jensen, E. A., Berryman, D. E., Murphy, E. R., Carroll, R. K., Busken, J., List, E. O., & Broach, W. H. (2019). Heterogeneity spacers in 16S rDNA primers improve analysis of mouse gut microbiomes via greater nucleotide diversity. *BioTechniques*, 67(2), 55-62. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0025>
- Kanjhan, R., Pow, D. V., Noakes, P. G., & Bellingham, M. C. (2010). The two-pore domain K<sup>+</sup> channel TASK-1 is closely associated with brain barriers and meninges. *Journal of Molecular Histology*, 41(6), 315-323. <https://doi.org/10.1007/s10735-010-9293-3>
- Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K.-H., Daut, J., & Karschin, A. (2001). Expression Pattern in Brain of TASK-1, TASK-3, and a Tandem Pore Domain K<sup>+</sup> Channel Subunit, TASK-5, Associated with the Central Auditory Nervous System. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(6), 632-648. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1045>
- Kaserer, T., Beck, K., Akram, M., Odermatt, A., & Schuster, D. (2015). Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Molecules*, 20(12), 22799-22832. <https://doi.org/10.3390/molecules201219880>
- Kevin J. Bowers, Edmond Chow, Huafeng Xu, Ron O. Dror, Michael P. Eastwood, Brent A. Gregersen, John L. Klepeis, Istvan Kolossvary, Mark A. Moraes, Federico D. Sacerdoti, John K. Salmon, Yibing Shan, and David E. Shaw, "Scalable Algorithms for Molecular

- Kchouk, S., & Hegazy, L. (2022). Pharmacophore modeling for biological targets with high flexibility: LXR $\beta$  case study. *Medicine in Drug Discovery*, 15, 100135. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100135>
- Kim, D., & Kang, D. (2015). Role of K2P channels in stimulus-secretion coupling. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(5), 1001-1011. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1663-3>
- Kiper, A. K., Rinné, S., Rolfes, C., Ramírez, D., Seebohm, G., Netter, M. F., González, W., & Decher, N. (2015). Kv1.5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(5), 1081-1090. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1665-1>
- Knapp, B., Frantal, S., Cibena, M., Schreiner, W., & Bauer, P. (2011). Is an Intuitive Convergence Definition of Molecular Dynamics Simulations Solely Based on the Root Mean Square Deviation Possible? *Journal of Computational Biology*, 18(8), 997-1005. <https://doi.org/10.1089/cmb.2010.0237>
- Kumar, A., Rathi, E., & Kini, S. G. (2020a). Drug repurposing approach for the identification and designing of potential E6 inhibitors against cervical cancer: An in silico investigation. *Structural Chemistry*, 31(1), 141-153. <https://doi.org/10.1007/s11224-019-01378-x>
- Kumar, A., Rathi, E., & Kini, S. G. (2020b). Identification of potential tumour-associated carbonic anhydrase isozyme IX inhibitors: Atom-based 3D-QSAR modelling, pharmacophore-based virtual screening and molecular docking studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(7), 2156-2170. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1626285>
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2002). Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. *ChemBioChem*, 3(7), 604. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7<604::AID-CBIC604>3.0.CO;2-X)
- Kurczyńska, M., Konopka, B. M., & Kotulska, M. (2017). Role of Bioinformatics in the Study of Ionic Channels. En J. Kulbacka & S. Satkauskas (Eds.), *Transport Across Natural and Modified Biological Membranes and its Implications in Physiology and Therapy* (Vol. 227, pp. 17-37). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9_2)
- Lacinová, L., & Hofmann, F. (2001). Voltage-Dependent Calcium Channels. En *Heart Physiology and Pathophysiology* (pp. 247-257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12656975-9/50015-8>
- Lai, H. C., & Jan, L. Y. (2006). The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 548-562. <https://doi.org/10.1038/nrn1938>
- Lee, A. G. (2018). A Database of Predicted Binding Sites for Cholesterol on Membrane Proteins, Deep in the Membrane. *Biophysical Journal*, 115(3), 522-532. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.022>
- Lenaeus, M. J., Gamal El-Din, T. M., Ing, C., Ramanadane, K., Pomès, R., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2017). Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(15), E3051-E3060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700761114>
- Lengyel, M., Czirják, G., Jacobson, D. A., & Enyedi, P. (2020). TRESK and TREK-2 two-pore-domain potassium channel subunits form functional heterodimers in primary somatosensory neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 295(35), 12408-12425. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014125>
- Levitan, E. S., Gealy, R., Trimmer, J. S., & Takimoto, K. (1995). Membrane Depolarization Inhibits Kv1.5 Voltage-gated K<sup>+</sup> Channel Gene Transcription and Protein Expression in Pituitary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 6036-6041. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.6036>
- Levitt, M., & Perutz, M. F. (1988). Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors. *Journal of Molecular Biology*, 201(4), 751-754. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90471-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90471-8)
- Lewis, A. H., & Grandl, J. (2021). Stretch and poke stimulation for characterizing mechanically activated ion channels. En *Methods in Enzymology* (Vol. 654, pp. 225-253). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.024>
- Li, M.-H., Luo, Q., Xue, X.-G., & Li, Z.-S. (2011). Molecular dynamics studies of the 3D structure and planar ligand binding of a quadruplex dimer. *Journal of Molecular Modeling*, 17(3), 515-526. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0746-0>
- Li, S., Wong, A. H. C., & Liu, F. (2014). Ligand-gated ion channel interacting proteins and their role in neuroprotection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00125>
- Li, Z.-Y., Su, C.-Y., & Ding, B. (2019). Molecular dynamics simulation of  $\beta$ -adrenoceptors and their coupled G proteins. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(14), 6346-6351. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201907\\_18458](https://doi.org/10.26355/eurrev_201907_18458)
- Ma, Z., Lou, X. J., & Horrigan, F. T. (2006). Role of Charged Residues in the S1-S4 Voltage Sensor of BK Channels. *Journal of General Physiology*, 127(3), 309-328. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509421>

- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221-234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
- Manetti, F., Stecca, B., Santini, R., Maresca, L., Giannini, G., Taddei, M., & Petricci, E. (2020). Pharmacophore-Based Virtual Screening for Identification of Negative Modulators of GLI1 as Potential Anticancer Agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(5), 832-838. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00639>
- Martínez Ávalos, G., González, W., Alzate, J., & Caballero, J. (2012). *Modelamiento Molecular y Análisis Estructural de TASK-1, TASK-3 y TASK-2 en interacción con A1899*. [Tesis Pregrado, Universidad de Talca]. <http://dspace.utalca.cl/handle/1950/9255>
- Martínez-Serrano, S., Izquierdo-Vega, J., Sánchez-Gutiérrez, M., & Zúñiga-Pérez, C. (2012). Membrana Plasmática. *Educación y Salud Boletín Científico de Ciencias de la Salud del ICsA*, 1(1). <https://doi.org/10.29057/icsa.v1i1.690>
- Marzian, S., Stansfeld, P. J., Rapedius, M., Rinné, S., Nematian-Ardestani, E., Abbruzzese, J. L., Steinmeyer, K., Sansom, M. S. P., Sanguinetti, M. C., Baukowitz, T., & Decher, N. (2013). Side pockets provide the basis for a new mechanism of Kv channel-specific inhibition. *Nature Chemical Biology*, 9(8), 507-513. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1271>
- Mazola, Y., Márquez Montesinos, J. C. E., Ramírez, D., Zúñiga, L., Decher, N., Ravens, U., Yarov-Yarovoy, V., & González, W. (2022). Common Structural Pattern for Flecainide Binding in Atrial-Selective Kv1.5 and Nav1.5 Channels: A Computational Approach. *Pharmaceutics*, 14(7), 1356. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071356>
- Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., & Ackerman, M. J. (2007). Clínica y genética en el síndrome de QT largo. *Revista Española de Cardiología*, 60(7), 739-752. <https://doi.org/10.1157/13108280>
- Mercadante, D., Gräter, F., & Daday, C. (2018). CONAN: A Tool to Decode Dynamical Information from Molecular Interaction Maps. *Biophysical Journal*, 114(6), 1267-1273. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.01.033>
- Miller, C. (2000). [No title found]. *Genome Biology*, 1(4), reviews0004.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-4-reviews0004>
- N'Gouemo, P. (2014). BK<sub>Ca</sub> channel dysfunction in neurological diseases. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00373>
- Nieves-Cordones, M., Al Shiblawi, F. R., & Sentenac, H. (2016). Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. En A. Sigel, H. Sigel, & R. K. O. Sigel (Eds.), *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life* (Vol. 16, pp. 291-324). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_9)
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>
- Olschewski, A., Veale, E. L., Nagy, B. M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Czirják, G., Enyedi, P., & Mathie, A. (2017). TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: From cell biology to clinical implications. *European Respiratory Journal*, 50(5), 1700754. <https://doi.org/10.1183/13993003.00754-2017>
- Pacheco, M. A. (2007). Receptor Types and Subtypes. En *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60007-8>
- Petkov, G. V. (2009). Ion Channels. En *Pharmacology* (pp. 387-427). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369521-5.00016-6>
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
- Plant, L. D., Rajan, S., & Goldstein, S. A. (2005). K2P channels and their protein partners. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.008>
- Poblete, H., Oyarzún, I., Olivero, P., Comer, J., Zuñiga, M., Sepulveda, R. V., Báez-Nieto, D., González Leon, C., González-Nilo, F., & Latorre, R. (2015). Molecular Determinants of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P2) Binding to Transient Receptor Potential V1 (TRPV1) Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), 2086-2098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.613620>
- Prieto-Martínez, F. D., Peña-Castillo, A., Méndez-Lucio, O., Fernández-de Gortari, E., & Medina-Franco, J. L. (2016). Molecular Modeling and Chemoinformatics to Advance the Development of Modulators of Epigenetic Targets. En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 105, pp. 1-26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.05.001>
- Puig, R. P. (2020, 18 diciembre). *Canales iónicos: estructura, funciones, tipos*. Lifeder. Recuperado 10 de septiembre de 2021, de <https://www.lifeder.com/canales-ionicos/>

- Ramírez, D., Bedoya, M., Kiper, A. K., Rinné, S., Morales-Navarro, S., Hernández-Rodríguez, E. W., Sepúlveda, F. V., Decher, N., & González, W. (2019). Structure/Activity Analysis of TASK-3 Channel Antagonists Based on a 5,6,7,8 tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidine. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2252. <https://doi.org/10.3390/ijms20092252>
- Ramírez, D., Concha, G., Arévalo, B., Prent-Peñaloza, L., Zúñiga, L., Kiper, A. K., Rinné, S., Reyes-Parada, M., Decher, N., González, W., & Caballero, J. (2019). Discovery of Novel TASK-3 Channel Blockers Using a Pharmacophore-Based Virtual Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 4014. <https://doi.org/10.3390/ijms20164014>
- Ramírez, D., Mejía-Gutiérrez, M., Insuasty, B., Rinné, S., Kiper, A. K., Platzk, M., Müller, T., Decher, N., Quiroga, J., De-la-Torre, P., & González, W. (2021). 5-(Indol-2-yl)pyrazolo[3,4-b]pyridines as a New Family of TASK-3 Channel Blockers: A Pharmacophore-Based Regioselective Synthesis. *Molecules*, *26*(13), 3897. <https://doi.org/10.3390/molecules26133897>
- Rampe, D., & Brown, A. M. (2013). A history of the role of the hERG channel in cardiac risk assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *68*(1), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.03.005>
- Ranade, S. S., Syeda, R., & Patapoutian, A. (2015). Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*, *87*(6), 1162-1179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.032>
- Reuss, L. (2011). Ion Transport across Nonexcitable Membranes. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* (p. a0001264.pub3). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001264.pub3>
- Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinné, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L., Delbeck, M., Hahn, M., Meier, H., Platzk, M., Quigley, A., Speedman, D., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Tucker, S. J., Mueller, T., Decher, N., & Carpenter, E. P. (2019). A unique lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule [Preprint]. *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/706168>
- Rödström, K. E. J., Kiper, A. K., Zhang, W., Rinné, S., Pike, A. C. W., Goldstein, M., Conrad, L. J., Delbeck, M., Hahn, M. G., Meier, H., Platzk, M., Quigley, A., Speedman, D., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S. M. M., Burgess-Brown, N. A., Tucker, S. J., Müller, T., Decher, N., & Carpenter, E. P. (2020). A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule. *Nature*, *582*(7812), 443-447. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2250-8>
- Rubaiy, H. N. (2017). A Short Guide to Electrophysiology and Ion Channels. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, *20*, 48. <https://doi.org/10.18433/J32P6R>
- Sakkiah, S., Thangapandian, S., John, S., & Lee, K. W. (2011). Pharmacophore based virtual screening, molecular docking studies to design potent heat shock protein 90 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(7), 2937-2947. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.018>
- Sánchez-Moreiras, A. M., Graña, E., Reigosa, M. J., & Araniti, F. (2020). Imaging of Chlorophyll a Fluorescence in Natural Compound-Induced Stress Detection. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 583590. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583590>
- Saxena, P., Zangerl-Plessl, E.-M., Linder, T., Windisch, A., Hohaus, A., Timin, E., Hering, S., & Stry-Weinzinger, A. (2016). New potential binding determinant for hERG channel inhibitors. *Scientific Reports*, *6*(1), 24182. <https://doi.org/10.1038/srep24182>
- Strutz-Seebohm, N., Gutcher, I., Decher, N., Steinmeyer, K., Lang, F., & Seebohm, G. (2007). Comparison of Potent Kv1.5 Potassium Channel Inhibitors Reveals the Molecular Basis for Blocking Kinetics and Binding Mode. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *20*(6), 791-800. <https://doi.org/10.1159/000110439>
- Scheurer, M., Rodenkirch, P., Siggel, M., Bernardi, R. C., Schulten, K., Tajkhorshid, E., & Rudack, T. (2018). PyContact: Rapid, Customizable, and Visual Analysis of Noncovalent Interactions in MD Simulations. *Biophysical Journal*, *114*(3), 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.003>
- Schewe, M., Sun, H., Mert, Ü., Mackenzie, A., Pike, A. C. W., Schulz, F., Constantin, C., Vowinkel, K. S., Conrad, L. J., Kiper, A. K., Gonzalez, W., Musinszki, M., Tegtmeier, M., Pryde, D. C., Belabed, H., Nazare, M., de Groot, B. L., Decher, N., Fakler, B., ... Baukrowitz, T. (2019). A pharmacological master key mechanism that unlocks the selectivity filter gate in K<sup>+</sup> channels. *Science*, *363*(6429), 875-880. <https://doi.org/10.1126/science.aav0569>
- Schwingshackl, A., Lopez, B., Teng, B., Luellen, C., Lesage, F., Belperio, J., Olcese, R., & Waters, C. M. (2017). Hyperoxia treatment of TREK-1/TREK-2/TRAAK-deficient mice is associated with a reduction in surfactant proteins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *313*(6), L1030-L1046. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00121.2017>
- Seidel, T., Wieder, O., Garon, A., & Langer, T. (2020). Applications of the Pharmacophore Concept in Natural Product inspired Drug Design. *Molecular Informatics*, *39*(11), 2000059. <https://doi.org/10.1002/minf.202000059>
- Seo, M., Shin, H. K., Myung, Y., Hwang, S., & No, K. T. (2020). Development of Natural Compound Molecular Fingerprint (NC-MFP) with the Dictionary of Natural Products (DNP) for natural product-based drug development. *Journal of Cheminformatics*, *12*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-0410-3>
- Singh, H., Stefani, E., & Toro, L. (2012). Intracellular BK<sub>Ca</sub> (iBK<sub>Ca</sub>) channels: IBK<sub>Ca</sub> channels. *The Journal of Physiology*, *590*(23), 5937-5947. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.215533>

- Sorokina, M., Merseburger, P., Rajan, K., Yirik, M. A., & Steinbeck, C. (2021). COCONUT online: Collection of Open Natural Products database. *Journal of Cheminformatics*, 13(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00478-9>
- Sorokina, M., & Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases: Where to find data in 2020. *Journal of Cheminformatics*, 12(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00424-9>
- Taberner, F. J., Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2015). TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(9), 1818-1827. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.022>
- Tai, Y., Yang, S., Liu, Y., & Shao, W. (2017). TRPC Channels in Health and Disease. En Y. Wang (Ed.), *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases* (Vol. 976, pp. 35-45). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1088-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1088-4_4)
- Talley, E. M., Lei, Q., Sirois, J. E., & Bayliss, D. A. (2000). TASK-1, a Two-Pore Domain K<sup>+</sup> Channel, Is Modulated by Multiple Neurotransmitters in Motoneurons. *Neuron*, 25(2), 399-410. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80903-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80903-4)
- Talley, E. M., Sirois, J. E., Lei, Q., & Bayliss, D. A. (2003). Two-Pore-Domain (Kcnk) Potassium Channels: Dynamic Roles in Neuronal Function. *The Neuroscientist*, 9(1), 46-56. <https://doi.org/10.1177/1073858402239590>
- Tan, S., Tan, H. T., & Chung, M. C. M. (2008). Membrane proteins and membrane proteomics. *PROTEOMICS*, 8(19), 3924-3932. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800597>
- Terlau, H., & Stühmer, W. (1998). Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels. *Naturwissenschaften*, 85(9), 437-444. <https://doi.org/10.1007/s001140050527>
- Ulrichová, J., Dvořák, Z., Vičar, J., Lata, J., Smržová, J., Šedo, A., & Šimánek, V. (2001). Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models. *Toxicology Letters*, 125(1-3), 125-132. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00430-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00430-1)
- van Santen, J. A., Jacob, G., Singh, A. L., Aniebok, V., Balunas, M. J., Bunsko, D., Neto, F. C., Castaño-Espriu, L., Chang, C., Clark, T. N., Cleary Little, J. L., Delgadillo, D. A., Dorrestein, P. C., Duncan, K. R., Egan, J. M., Galey, M. M., Haeckl, F. P. J., Hua, A., Hughes, A. H., ... Linington, R. G. (2019). The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. *ACS Central Science*, 5(11), 1824-1833. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00806>
- Velasco-Charpentier, C., Pizarro-Mora, F., & Navarro, N. P. (2016). Variación en la concentración de aminoácidos tipo micosporinas en macroalgas de las regiones de Valparaíso y Magallanes, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3), 703-708. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300023>
- Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., & Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(3), 321-329. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80056-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80056-1)
- Vetri, F., Saha Roy Choudhury, M., Sundivakkam, P., & Pelligrino, D. A. (2014). BKCa channels as physiological regulators: A focused review. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 3. <https://doi.org/10.2147/JRLCR.S36065>
- Vicente, R., Escalada, A., Villalonga, N., Texidó, L., Roura-Ferrer, M., Martín-Satué, M., López-Iglesias, C., Soler, C., Solsona, C., Tamkun, M. M., & Felipe, A. (2006). Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the Major Voltage-dependent K<sup>+</sup> Channel in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37675-37685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605617200>
- Wang, B., Chen, Q. H., & Brenner, R. (2009). ION CHANNELS | Proepileptic Effects of BK Channel Gene Mutations. En *Encyclopedia of Basic Epilepsy Research* (pp. 662-669). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373961-2.00282-4>
- Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., & Zhu, M. X. (2020). TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & Therapeutics*, 209, 107497. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107497>
- Wang, W., & MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go -Related K<sup>+</sup> Channel hERG. *Cell*, 169(3), 422-430.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.048>
- Weaver, A. K., Bomben, V. C., & Sontheimer, H. (2006). Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells. *Glia*, 54(3), 223-233. <https://doi.org/10.1002/glia.20364>
- Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, 70(5), 1129-1143. <https://doi.org/10.1351/pac199870051129>
- Wettwer, E., & Terlau, H. (2014). Pharmacology of voltage-gated potassium channel Kv1.5—Impact on cardiac excitability. *Current Opinion in Pharmacology*, 15, 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.02.001>
- Wieder, M., Perricone, U., Seidel, T., & Langer, T. (2016). Pharmacophore Models Derived From Molecular Dynamics Simulations of Protein-Ligand Complexes: A Case Study. *Natural Product Communications*, 11(10), 1499-1504.

- Williams, T. N., Van Den Driessche, G. A., Valery, A. R. B., Fourches, D., & Freeman, H. S. (2018). Toward the Rational Design of Sustainable Hair Dyes Using Cheminformatics Approaches: Step 2. Identification of Hair Dye Substance Database Analogs in the Max Weaver Dye Library. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11), 14248-14256. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02882>
- Witchel, H. J. (2011). Drug-induced hERG Block and Long QT Syndrome: HERG, drugs, and LQTS. *Cardiovascular Therapeutics*, 29(4), 251-259. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00154.x>
- Wolber, G., Dornhofer, A. A., & Langer, T. (2007). Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(12), 773-788. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9078-7>
- Wolber, G., & Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 160-169. <https://doi.org/10.1021/ci049885e>
- Wright, L., Pope, C., & Liu, J. (2009). The Nervous System as a Target for Chemical Warfare Agents. En *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 463-480). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012374484-5.00032-8>
- Wu, Y., Yang, Y., Ye, S., & Jiang, Y. (2010). Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channel. *Nature*, 466(7304), 393-397. <https://doi.org/10.1038/nature09252>
- Yadav, D. K., Kumar, S., Choi, E.-H., Chaudhary, S., & Kim, M. (2019). *Computational Modeling on Aquaporin-3 as Skin Cancer Target: A Virtual Screening and Molecular Dynamic Simulation Study* [Preprint]. CHEMISTRY. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0174.v1>
- Ylilauri, M., & Pentikäinen, O. T. (2013). MMGBSA As a Tool To Understand the Binding Affinities of Filamin–Peptide Interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(10), 2626-2633. <https://doi.org/10.1021/ci4002475>
- Zahn, D. (2011). Molecular dynamics simulation of ionic conductors: Perspectives and limitations. *Journal of Molecular Modeling*, 17(7), 1531-1535. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0877-3>
- Zhang, M., Prior, A. M., Maddox, M. M., Shen, W.-J., Hevener, K. E., Bruhn, D. F., Lee, R. B., Singh, A. P., Reinicke, J., Simmons, C. J., Hurdle, J. G., Lee, R. E., & Sun, D. (2018). Pharmacophore Modeling, Synthesis, and Antibacterial Evaluation of Chalcones and Derivatives. *ACS Omega*, 3(12), 18343-18360. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03174>
- Zhang, X. C., Yang, H., Liu, Z., & Sun, F. (2018). Thermodynamics of voltage-gated ion channels. *Biophysics Reports*, 4(6), 300-319. <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0074-y>
- Zhao, G., Yang, L., Wang, S., Cai, M., Sun, S., Dong, H., & Xiong, L. (2019). TREK-2 Mediates the Neuroprotective Effect of Isoflurane Preconditioning Against Acute Cerebral Ischemia in the Rat. *Rejuvenation Research*, 22(4), 325-334. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.2039>
- Zhou, C., Kang, D., Xu, Y., Zhang, L., & Zha, X. (2015). Identification of Novel Selective Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors Using a Pharmacophore-Based Virtual Screening Combined with Docking. *Chemical Biology & Drug Design*, 85(6), 659-671. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12461>
- Zhu, H., Yuan, S., & Saint, D. A. (2006). Expression of the 2-pore potassium channel TREK-2 in human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(4), 746-746. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.06.052>

## 8.- Imágenes y Tablas suplementarias.

Canal					
Parámetros	hERG	BKCa	TREK-2	TASK-1	Kv1.5
Modelo Solvente	TIP4PEW	TIP4PEW	TIP4PEW	TIP4PEW	TIP4PEW
Tamaño Grilla	15X15X15	15X15X15	15X15X15	10X10X10	10X10X10
Ensamble	NPT	NPT	NPT	NPT	NPT
Presión	1,01325	1,01325	1,01325	1,01325	1,01325
Temperatura	310K	310K	310K	310K	310K
Termostato	Langevin	Nose-Hoover	Nose-Hoover	Nose-Hoover	Nose-Hoover
Baróstato	Langevin	MTK	MTK	MTK	MTK

Tabla Suplementaria 1: Parámetros utilizados para las DM en cada canal.

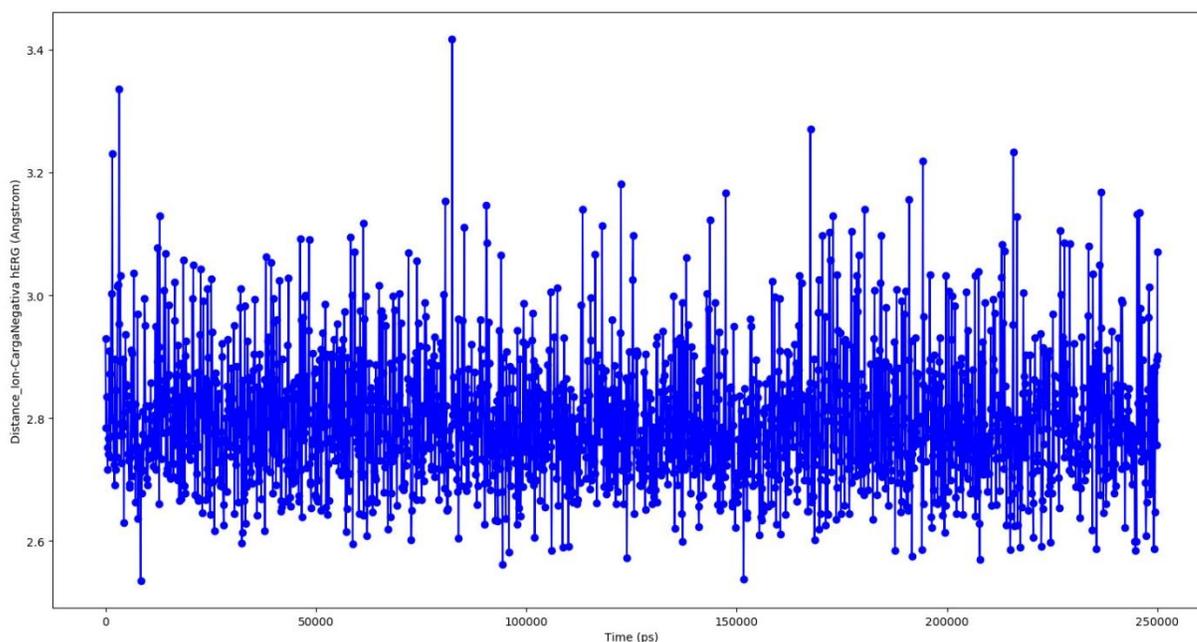
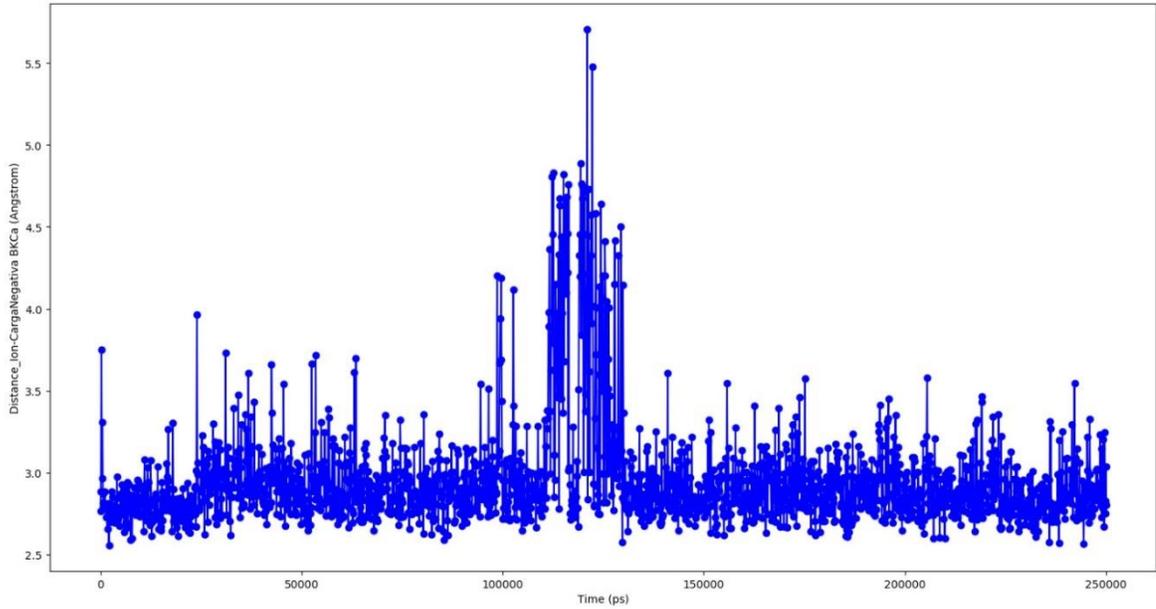
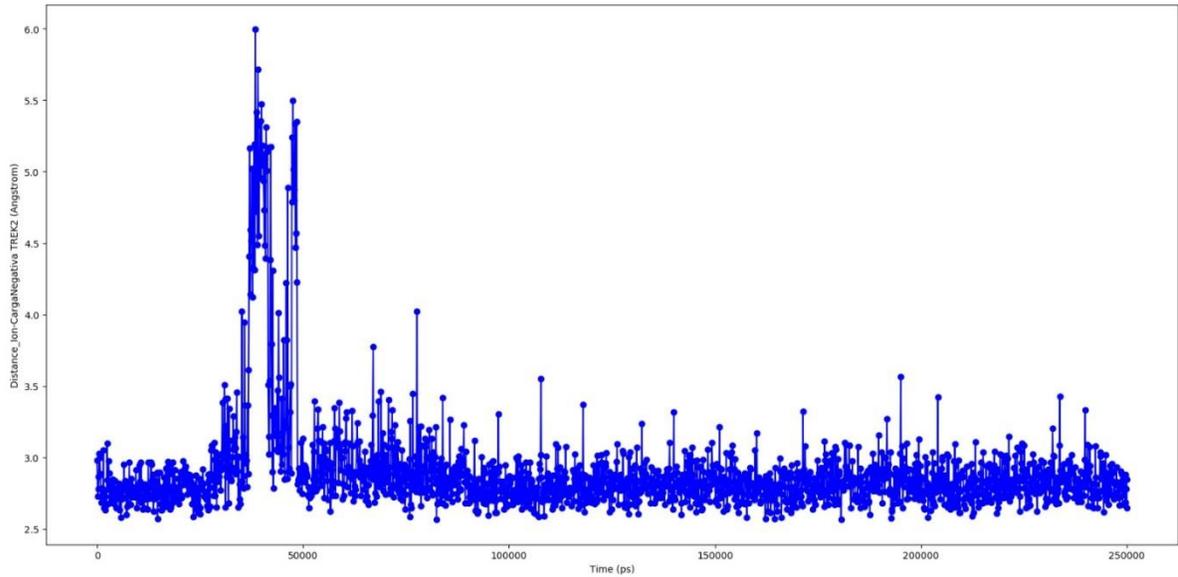


Figura Suplementaria 1: Gráfico distancia vs tiempo en hERG. Se observa que la distancia entre la carga negativa del CN y el ion K+ se mantiene entre 2.6 Å y 3.0 Å desde los 100 ns.



**Figura Suplementaria 2: Gráfico distancia vs tiempo en BKCa.** Se observa que la distancia entre la carga negativa del CN y el ión K+ se mantiene entre 2.5 Å y 3.2 Å desde 125 ns.



**Figura Suplementaria 3: Gráfico distancia vs tiempo en TREK-2.** Se observa que la distancia entre la carga negativa del CN y el ión K+ se mantiene entre 2.5 Å y 3.0 Å desde los 100 ns.