



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico-Biológicas

“Evaluación *in silico* de la interacción del cannabidiol con dianas biológicas relacionadas con la epilepsia”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Químico-Biológicas

Presenta:

Q.F.B. César Luis Alegría González

Dirigida por:

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas

Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado

Secretario

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Vocal

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez

Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro

Noviembre 2019

México

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No. CVU: 858410) para la realización de los estudios de maestría.

Para la realización de las simulaciones de dinámica molecular reportadas en este trabajo, se contó con el apoyo de Luis Aguilar, Alejandro de León, Carlos Flores y Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS-UNAM).

Dirección General de Bibliotecas UNAM

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ACRÓNIMOS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Epilepsia</i>	3
2.1.1. Tipos de crisis convulsivas	4
2.1.2. Etiología de la epilepsia.....	6
2.1.3. Fármacos anticonvulsivos.....	7
2.2. <i>Sistema endocannabinoide</i>	10
2.2.1. Biosíntesis y degradación de los endocannabinoides	12
2.2.1. Sistema endocannabinoide y epilepsia	13
2.3. <i>Generalidades de Cannabis spp.</i>	14
2.3.1. Fitocannabinoides	15
2.3.2. Cannabidiol	16
2.3.3. Efecto anticonvulsivo del cannabidiol	17
2.4. <i>Técnicas in silico en la búsqueda y diseño de fármacos</i>	19
2.4.1. Modelado molecular por homología.....	20
2.4.2. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	22
2.4.3. Simulaciones de dinámica molecular.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. <i>Objetivo general</i>	27
5.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. <i>Materiales</i>	28
6.2. <i>Métodos</i>	28
6.2.1. Construcción de una red de interacción de dianas biológicas que incluye la información sobre la afinidad del cannabidiol y las interacciones de sus dianas biológicas	28
6.2.2. Construcción de la estructura tridimensional de las dianas biológicas seleccionadas utilizando modelado por homología.....	30
6.2.3. Acoplamiento molecular del cannabidiol con las dianas biológicas elegidas	30

6.2.4.	Cálculo de la afinidad del cannabidiol a las dianas biológicas observando cambios estructurales en las mismas	31
6.2.5.	Cuadro metodológico	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
7.1.	<i>Selección de las dianas biológicas más relevantes en el proceso de la epilepsia a partir de las redes de interacción</i>	33
7.2.	<i>Modelos tridimensionales</i>	40
7.3.	<i>Dinámica molecular de los modelos tridimensionales</i>	42
7.3.1.	Determinación de los clústeres más numerosos	44
7.4.	<i>Acoplamientos moleculares (dockings)</i>	45
7.4.1.	SV2A	45
7.4.2.	FAAH	49
7.4.3.	GPR55	53
7.4.4.	TRPV1	57
7.4.5.	Receptor de glicina $\alpha 1\beta$	61
7.4.6.	Subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T	64
7.5.	<i>Simulaciones de dinámica molecular</i>	68
7.5.1.	Complejos de SV2A	68
7.5.2.	Complejos de FAAH	72
7.5.3.	Complejos de GPR55	77
7.5.4.	Complejos de TRPV1	82
7.5.5.	Complejos del receptor de glicina $\alpha 1\beta$	88
7.5.6.	Complejos de la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T 92	
7.6.	<i>Modelo de interacción del cannabidiol</i>	98
8.	CONCLUSIONES	101
9.	PERSPECTIVAS	103
10.	REFERENCIAS	104
11.	ANEXO	115

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Subtipos de crisis convulsivas focales (Fisher, 2017)	5
Tabla 2. Subtipos de crisis convulsivas generalizadas (Fisher, 2017)	5
Tabla 3. Algunos receptores y enzimas con los que interactúa cannabidiol (Pertwee, 2014)	18
Tabla 4. Ventajas y desventajas de la química computacional	20
Tabla 5. Dianas biológicas que son blanco de cannabidiol	34
Tabla 6. Fármacos anticonvulsivos con su índice de Tanimoto calculado con respecto al cannabidiol y dianas biológicas a las cuales se unen	35
Tabla 7. Valores de calidad para los modelos construidos	42
Tabla 8. Número de conformaciones para cada clúster de las dianas biológicas	44
Tabla 9. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del cluster 1 y 2 de SV2A con CBD y LEV	46
Tabla 10. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de FAAH con CBD y AND	51
Tabla 11. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de GPR55 con CBD y RBT	54
Tabla 12. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del cluster 1 y 2 de TRPV1 con CBD y CAP	58
Tabla 13. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 del receptor de glicina $\alpha 1\beta$ con CBD y GLY	62
Tabla 14. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Prevalencia mundial de la epilepsia (OMS, 2017)	4
Figura 2. Generaciones de fármacos anticonvulsivos (Targas-Yacubian, 2014)	8
Figura 3. Dianas biológicas de los fármacos anticonvulsivos (Löscher, 2017, tomado de: Chavez-Elias, 2018)	10
Figura 4. Sistema endocannabinoide EtNH ₂ : etanolaminas, AA: ácido araquidónico, FAAH: ácido graso amida hidrolasa, MAGL: monoacilglicerol lipasa, DAGL: diacilglicerol lipasa, NAPE-PLD: fosfolipasa D de <i>N</i> -acilfosfatidiletanolamina (Di Marzo, 2014)	11
Figura 5. Esquema general de la síntesis de los endocannabinoides, a) síntesis de la anandamida, b) síntesis del 2-araquidonoilglicerol, NAT: <i>N</i> -aciltransferasa, NAPE-PLD: fosfolipasa D de <i>N</i> -acilfosfatidiletanolamina, PLC: fosfolipasa C, DAGL: diacilglicerol lipasa (Muccioli, 2010) ...	13
Figura 6. (A) Planta, (B) flores, (C) pistilo, (D) porción de una flor, y (E) semillas de <i>Cannabis sativa</i> (Farag y col., 2016)	15
Figura 7. Biosíntesis de cannabionoides a partir del ácido cannabigerólico (Degenhart y col., 2016)	16
Figura 8. Proceso general del modelado por homología (Krieger, 2005)	21
Figura 9. Proceso general del acoplamiento molecular (Young, 2009)	23
Figura 10. Proceso general de dinámica molecular (Cohen, 1996)	24
Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología del presente trabajo	32
Figura 12. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a FAAH	36
Figura 13. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a TRPV1	36
Figura 14. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a GPR55	37
Figura 15. Diagrama de interacción basado en el porcentaje de similitud estructural entre dianas biológicas.....	38
Figura 16. Modelos tridimensionales de las dianas biológicas seleccionadas: A) SV2A B) GPR55 C) Receptor de glicina $\alpha 1\beta$ D) FAAH E) TRPV1 F) CACNA1G	41
Figura 17. Valores de temperatura, presión, densidad, volumen, densidad, energía total, RMSD de las simulaciones de dinámica molecular de 50 ns	43

Figura 18. Cavidades más importantes encontradas en SV2A: A) Estructura representativa del cluster 1, B) Estructura representativa del cluster 2, El rectángulo rojo indica la región del sitio de unión a racetams	46
Figura 19. Sitio de unión de cannabidiol en la proteína SV2A: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la proteína SV2A, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión	47
Figura 20. Sitio de unión de levetiracetam en la proteína SV2A: A) Posición del sitio de unión de levetiracetam en la proteína SV2A, B) Acomodo tridimensional e interacciones del levetiracetam en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del levetiracetam en el sitio de unión.....	48
Figura 21. Cavidades más importantes encontradas en FAAH: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2, C) Mecanismo enzimático de la FAAH	50
Figura 22. Sitio de unión de cannabidiol en la enzima FAAH: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la proteína FAAH, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión	52
Figura 23. Sitio de unión de la anandamida en la enzima FAAH: A) Posición del sitio de unión de la anandamida en la proteína FAAH, B) Acomodo tridimensional e interacciones de la anandamida en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de la anandamida en el sitio de unión.....	53
Figura 24. Cavidades más importantes encontradas en GPR55: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2	54
Figura 25. Sitio de unión del cannabidiol en el receptor GPR55: A) Posición del sitio de unión del cannabidiol en receptor GPR55, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión	55
Figura 26. Sitio de unión de rimonabant en el receptor GPR55: A) Posición del sitio de unión de rimonabant en el receptor GPR55, B) Acomodo tridimensional e interacciones de rimonabant en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de rimonabant en el sitio de unión	56
Figura 27. Cavidades más importantes encontradas en TRPV1: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2	57

Figura 28. Sitio de unión de cannabidiol en el receptor TRPV1: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en el receptor TRPV1, B) Acomodo tridimensional e interacciones de cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de cannabidiol en el sitio de unión	59
Figura 29. Sitio de unión de capsaicina en el receptor TRPV1: A) Posición del sitio de unión de capsaicina en el receptor TRPV1, B) Acomodo tridimensional e interacciones de capsaicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de capsaicina en el sitio de unión	60
Figura 30. Cavidades más importantes encontradas en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2	61
Figura 31. Sitio de unión de cannabidiol en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$, B) Acomodo tridimensional e interacciones de cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de cannabidiol en el sitio de unión	63
Figura 32. Sitio de unión de glicina en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$: A) Posición del sitio de unión de glicina en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión ...	64
Figura 33. Sitio de unión de cannabidiol en la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión	66
Figura 34. Sitio de unión de etosuximida en la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T: A) Posición del sitio de unión de etosuximida en la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión.....	67
Figura 35. Valores de diferencia de RMSF de los complejos SV2A-CBD y SV2A-LEV. CBD: cannabidiol, LEV: levetiracetam.....	69
Figura 36. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos SV2A-CBD y SV2A-LEV. CBD: cannabidiol, LEV: levetiracetam	70

Figura 37. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo SV2A-LEV durante la dinámica molecular: A) conformación representativa del lapso de 0 a 1850 ps, B) conformación representativa del lapso de 4000 a 10000 ps.....	70
Figura 38. Conformación representativa del complejo SV2A-CBD durante la simulación de dinámica molecular.....	71
Figura 39. Valores de diferencia de RMSF de los complejos FAAH-CBD y FAAH-AEA. CBD: cannabidiol, AEA: anandamida.....	73
Figura 40. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos FAAH-CBD y FAAH-AEA. CBD: cannabidiol, AEA: anandamida.....	74
Figura 41. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo FAAH-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 2500 a 3750 ps, B) Conformación representativa del lapso de 0 a 10000 ps.....	75
Figura 42. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo FAAH-AEA durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 0 a 5000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 5000 a 7500 ps, C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	76
Figura 43. Valores de diferencia de RMSF de los complejos GPR55-CBD y GPR55-AEA. CBD: cannabidiol, RBT: rimonabant.....	77
Figura 44. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos GPR55-CBD y GPR55-RBT. CBD: cannabidiol, RBT: rimonabant.....	79
Figura 45. Conformación representativa del complejo GPR55-CBD durante la simulación de dinámica molecular.....	79
Figura 46. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo GPR55-RBT durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 5200 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 3750 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	80
Figura 47. Valores de diferencia de RMSF de los complejos TRPV1-CBD y TRPV1-CAP. CBD: cannabidiol, CAP: capsaicina.....	83
Figura 48. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos TRPV1-CBD y TRPV1-CAP. CBD: cannabidiol, CAP: capsaicina.....	84

Figura 49. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo TRPV1-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 3750 a 4200 ps, B) Conformación representativa del lapso de 4200 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	85
Figura 50. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo TRPV1-CAP durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 7500 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 2500 a 3000 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	86
Figura 51. Valores de diferencia de RMSF de los complejos GLICINA-CBD y GLICINA-GLY. CBD: cannabidiol, GLY: glicina.....	88
Figura 52. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos GLICINA-CBD y GLICINA-GLY. CBD: cannabidiol, GLY: Glicina.....	89
Figura 53. Conformación representativa del complejo GLICINA-CBD durante la simulación de dinámica molecular A) Conformación tridimensional B) Diagrama de interacción bidimensional	90
Figura 54. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo GLICINA-GLY durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 8750 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 3750 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	91
Figura 55. Valores de diferencia de RMSF de los complejos CACNA1G-CBD y CACNA1G-ETO. CBD: cannabidiol, ETO: etosuximida	93
Figura 56. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos CACNA1G-CBD y CACNA1G-ETO. CBD: cannabidiol, ETO: Etosuximida.....	94
Figura 57. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo CACNA1G-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 7500 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 0 a 2500 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	95
Figura 58. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo CACNA1G-ETO durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 0 a 2500 ps, B)	

Conformación representativa del lapso de 5000 a 6250 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad.....	96
Figura 59. Propuesta de mecanismo anticonvulsivo del cannabidiol.	100
Figura 60. Diagrama de interacción metabólico.....	115
Figura 61. Diagramas de Ramachandran de las dianas biológicas antes (izquierda) y después de la simulación (derecha). A) SV2A B) FAAH.....	116
Figura 62. Diagramas de Ramachandran de las dianas biológicas antes (izquierda) y después de la simulación (derecha). A) GPR55 B) TRPV1	117
Figura 63. Diagramas de Ramachandran de las dianas biológicas antes (izquierda) y después de la simulación (derecha). A) Receptor de Glicina $\alpha 1\beta$ B) Receptor de calcio voltaje-dependiente de tipo T.	118
Figura 64. Estabilidad de la simulación de los complejos de SV2A	119
Figura 65. Estabilidad de la simulación de los complejos de FAAH.....	120
Figura 66. Estabilidad de la simulación de los complejos de GPR55.....	121
Figura 67. Estabilidad de la simulación de los complejos de TRPV1	122
Figura 68. Estabilidad de la simulación de los complejos del receptor de Glicina $\alpha 1\beta$	123
Figura 69. Estabilidad de la simulación de los complejos del receptor de calcio voltaje-dependiente de tipo T.	124

ACRÓNIMOS

AA	Ácido araquidónico
AEA	Anandamida
AMP_c	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolilpropiónico
CACNA1G	Subunidad α 1G del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T
CB1	Receptor cannabinoide de tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide de tipo 2
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DOF	Diario Oficial de la Federación
EtNH₂	Etanolaminas
FAAH	Ácido graso amida hidrolasa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA_A	Receptor de ácido γ -aminobutírico de tipo A
GPR18	Receptor acoplado a proteína G 18
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55
ILAE	Liga Internacional Contra la Epilepsia
KA	Kainato
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PLC	Fosfolipasa C
PPARα	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo α
PPARγ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo γ
PPE	Programa Prioritario de Epilepsia
TRPA1	Receptor de potencial transitorio A1
TRPM8	Receptor de potencial transitorio M8
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
TRPV2	Receptor de potencial transitorio V2
2-AG	2-Araquidonoilglicerol
5HT_{1A}	Receptor de 5-hidroxitriptamina tipo 1A

RESUMEN

Al ser la epilepsia uno de los trastornos neurológicos con más incidencia y prevalencia en el mundo, ha cobrado importancia el desarrollo de nuevos fármacos para tratar este padecimiento. Entre los candidatos a prototipo para el tratamiento de la epilepsia está el cannabidiol, fitocannabinoide que puede interactuar con varias dianas biológicas del sistema nervioso central, para modular ciertos procesos que están involucrados en el proceso epiléptico; sin embargo, estas interacciones que se generan son desconocidas. Una de las herramientas del diseño de fármacos para evaluar las interacciones del cannabidiol con dianas biológicas de interés farmacológico para la epilepsia son las técnicas *in silico*, las cuales proveen información de estas interacciones de manera eficaz, en un corto periodo de tiempo y a bajo costo. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar las interacciones y afinidades teóricas del cannabidiol con dianas biológicas relacionadas con la epilepsia, obtenidas mediante técnicas *in silico*, para conocer más acerca del mecanismo antiepiléptico del cannabidiol. Los resultados demostraron que la proteína vesicular SV2A, la enzima FAAH, los receptores GPR55, glicina $\alpha 1\beta$, TRPV1 y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T se presentaron como las dianas biológicas más relevantes en procesos anticonvulsivos de acuerdo con los diagramas de interacción realizados; además, los modelos tridimensionales construidos cumplieron con los criterios de calidad establecidos. Los acoplamientos moleculares realizados revelaron que los sitios de unión de cannabidiol en las dianas biológicas son de naturaleza hidrofóbica y las dinámicas moleculares de los complejos proteína-ligando de SV2A, FAAH y GPR55 mostraron cambios relacionables con la actividad anticonvulsiva; en contraste, los complejos de los receptores glicina $\alpha 1\beta$, TRPV1 y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo T no mostraron cambios relevantes, lo que sugiere que se necesita de más tiempo de simulación para observar posibles cambios relacionables con una actividad anticonvulsiva.

Palabras clave: epilepsia, cannabidiol, dianas biológicas, *in silico*, interacciones

ABSTRACT

Epilepsy is one of the neurological disorders with more incidence and prevalence in the world; therefore, is important to develop new drugs to treat this ailment. Among the new prototype candidates to treat the epilepsy, exist cannabidiol, which is a phytocannabinoid that can interact with many biological targets of the central nervous system to modulate certain processes that are involved in the epileptic process; however, these interactions are unknown. One of the tools of drug design to evaluate the interactions of cannabidiol and biological targets with pharmacological interest for epilepsy are *in silico* techniques, which provide information about protein-ligand interactions in efficiently way, in a short time and low cost. The present work aims to evaluate the interactions and affinities of cannabidiol with biological targets related with epilepsy, obtained through *in silico* techniques to elucidate the possible mechanism of action of cannabidiol. The results show that the vesicular protein SV2A, the enzyme FAAH, the GPR55, TRPV1, glycine $\alpha 1\beta$ receptors, and the $\alpha 1G$ subunit of Ca^{2+} T-type voltage-gated channel were likely to be the most relevant biological targets in anticonvulsant process in agreement with interactions maps; on the other hand, the three-dimensional models were built successfully according to the established quality criteria. The molecular dockings made shows that the binding site of cannabidiol in the biological targets are hydrophobic, and the molecular dynamics of SV2A, FAAH and GPR55 protein-ligand complexes shows changes related with anticonvulsant effect; on the other hand, the TRPV1 and glycine $\alpha 1\beta$ receptors, as well as the $\alpha 1G$ subunit of Ca^{2+} T-type voltage-gated channel do not show relevant changes, which suggest that more extended simulation times are needed to observe changes related with anticonvulsant activity.

Keywords: epilepsy, cannabidiol, biological targets, *in silico*, interactions

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia es un trastorno neuronal, de los más comunes en el mundo, con cerca de 50 millones de personas que lo padecen; este trastorno se caracteriza por la aparición de crisis convulsivas, generadas a partir de despolarizaciones anormales y sincrónicas de las neuronas (OMS, 2017; Bueno Valenzuela y col., 2014). Estos eventos se clasifican en crisis focales, en las cuales se generan varios focos convulsivos en el cerebro que se restringen a solo una pequeña área, las generales, que se originan en una parte del cerebro y se diseminan en ambos hemisferios del cerebro, y las desconocidas en donde no se sabe su origen (Fisher, 2017). La epilepsia es generada por diversos factores como lesiones en el cerebro, predisposición genética, infecciones, deficiencias metabólicas, alteraciones inmunológicas, los cuales provocan alteraciones en el sistema inhibitorio y excitatorio del sistema nervioso (Scheffer y col., 2017).

Se han desarrollado diversos fármacos a lo largo de la historia para tratar el problema de la epilepsia, los cuales se dividen en 3 generaciones acorde al tiempo en el que fueron lanzados al mercado (Targas-Yacubian, 2014); sin embargo, no todos los tratamientos desarrollados han sido efectivos en todos los pacientes con este padecimiento, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos es una tarea de interés para generar nuevas estrategias terapéuticas (OMS, 2017).

Entre los blancos promisorios para el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos están los componentes del sistema endocannabinoide, los cuales están involucrados en varios procesos biológicos de los mamíferos y que podrían ayudar en la inhibición o prevención de las crisis convulsivas (Wallace, 2003). Uno de estos compuestos que puede interactuar con dianas biológicas del sistema endocannabinoide y sistema nervioso central para producir una respuesta favorable en las crisis convulsivas es el cannabidiol. Este fitocannabinoide presente en las plantas del género *Cannabis*, ha sido blanco de diversas investigaciones debido a sus propiedades terapéuticas y a su nula capacidad psicoactiva (Mechoulam y col., 2014).

Actualmente, debido al avance tecnológico, se pueden emplear herramientas computacionales para la evaluación de moléculas biológicamente activas y el desarrollo de nuevos fármacos (Ou-Yang y col., 2012). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es emplear técnicas *in silico* para determinar las dianas biológicas del sistema endocannabinoide y sistema nervioso central más relevantes en el proceso de crisis convulsiva y la interacción del cannabidiol con estas dianas biológicas para comprender las repercusiones moleculares en el proceso epiléptico que se generan a partir de la unión del cannabidiol con estas moléculas diana.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Epilepsia*

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central, por lo general de tipo crónico, que se caracteriza por la repetición de dos o más crisis convulsivas provocadas por una descarga neuronal excesiva e hipersincrónica en el cerebro o a un defecto en la inhibición neuronal (Bueno Valenzuela y col., 2014). Dicho padecimiento es uno de los trastornos neurológicos más comunes en el mundo, ya que afecta a cerca de 50 millones de personas (OMS, 2017). Las estimaciones de incidencia de la epilepsia son de unos 2,4 millones de casos nuevos por año. En el caso de la población infantil la incidencia es mayor y más variable, la cual está en el rango de 25 a 840 personas por cada 100,000 personas por año. En el caso de los países desarrollados, la incidencia es de 30 a 50 por cada 100,000 personas, mientras que en los países en vías de desarrollo la incidencia es hasta el doble, debido a que hay una mayor exposición a ciertos factores de riesgo como el paludismo, la neurocisticercosis, traumatismos derivados del parto, mayor incidencia de traumatismos relacionados con accidentes de tránsito y la menor disponibilidad de programas de salud preventiva (OMS, 2017). Los datos de prevalencia, mostrados en la Figura 1, indican que en los países desarrollados este valor se sitúa en 5.8 personas por cada 1,000 habitantes, mientras en países con recursos limitados es de 10.3 personas por cada 1,000 habitantes en áreas urbanas, y en áreas rurales está en 15.4 personas por cada 1,000 habitantes (Bell y col., 2014). En México se calcula que existen cerca de 2 millones de personas con epilepsia (PPE, 2017).

En el aspecto cognitivo, los pacientes con epilepsia pueden presentar comorbilidad con otros problemas neurológicos, por lo que tienen problemas en el aprendizaje, lenguaje e intelectuales, necesitando así de cuidados especiales para su vida diaria. Por otra parte, en el aspecto social estas personas pueden sufrir discriminación, lo que provoca desmoralización, aislamiento y depresión, además de que el propio padecimiento puede inducir estados de depresión de manera fisiológica.

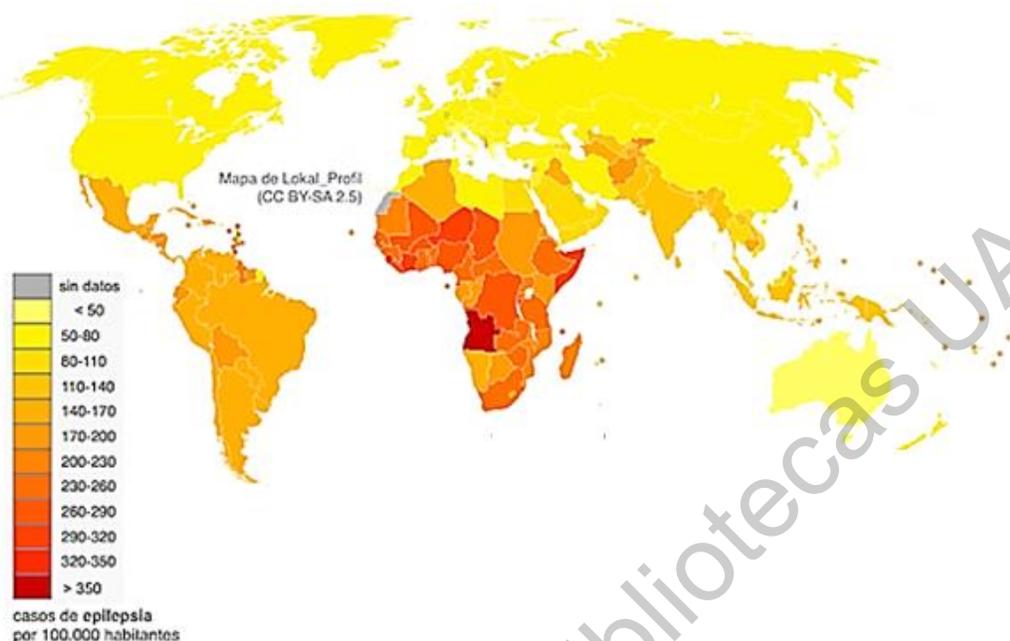


Figura 1. Prevalencia mundial de la epilepsia (OMS, 2017)

Estas razones psicosociales presentan un reto a resolver para poder crear conciencia entre la población y así poder integrar a las personas que sufren epilepsia en la sociedad (Mula y col., 2016).

2.1.1. Tipos de crisis convulsivas

De acuerdo con la clasificación hecha por la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) en 2017, las crisis se dividen en focales, generalizadas y desconocidas. Las crisis focales se originan mediante focos convulsivos y se restringen a una pequeña área, las crisis generalizadas se originan en una parte del cerebro y se propagan en ambos hemisferios del cerebro, y las desconocidas son aquellas en donde no se conoce la causa de la crisis (Fisher, 2017).

Las crisis focales pueden dividirse en motoras y no motoras, éstas a su vez se dividen en subtipos los cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Subtipos de crisis convulsivas focales (Fisher, 2017)

MOTORAS	NO MOTORAS
Automatizadas: Se presentan movimientos robóticos repetitivos.	Autonómicas: Se presenta una alteración en sistema nervioso autónomo (piloerección, presión sanguínea, ritmo cardiaco, etc.).
Atónicas: Hay pérdida de tono y fuerza muscular en las extremidades.	Detención del movimiento: Hay pérdida de movimiento.
Clónicas: Implica movimientos rítmicos de las extremidades.	Cognitiva: Hay pérdida cognitiva durante la crisis.
Mioclónicas: Se presentan sacudidas musculares breves y recurrentes.	Emocional: Se presentan sensaciones espontáneas de miedo, ansiedad, o alegría.
Tónicas: Hay contracciones breves de miembros superiores.	Sensorial: Se presentan sensaciones visuales, sonidos, olores, vértigo, frío o calor.
Espasmos epilépticos: Se presentan flexiones de los brazos y la cintura.	
Hipercinéticas: Implican movimientos de golpeo y pedaleo.	

Las crisis generalizadas también se dividen en motoras y no motoras (crisis de ausencia), los subtipos de estas se muestran en la Tabla 2. En el caso de las desconocidas, se podrían clasificar en focales o generalizadas cuando alguna información novedosa que dé un indicio de su causa esté disponible (Fisher, 2017).

Tabla 2. Subtipos de crisis convulsivas generalizadas (Fisher, 2017)

MOTORAS	NO MOTORAS
Tónicas: Se presenta rigidez de las extremidades, seguido de una fase de espasmos.	Típicas: Se presenta un cese en el movimiento, a veces hay movimiento involuntario de los ojos, de la cabeza y otros movimientos automáticos.
Mioclónicas: Se muestran contracciones bilaterales irregulares no sostenidas de extremidades, cara, ojos y párpados.	Atípicas: Son similares a las crisis típicas, sin embargo, hay una aparición o recuperación más lenta y cambios más pronunciados en el tono muscular.
Tónico-clónicas: Hay pérdida de conciencia, seguido de rigidez de la extremidades y contracciones rítmicas de estas mismas.	Mioclónicas: Se presentan pocas contracciones y después una crisis de ausencia.
Clónicas: Se presentan espasmos bilaterales sostenidos en extremidades y movimientos irregulares en cara, ojos y párpados.	Mioclónía de los párpados: Hay sacudidas de los párpados y desviación hacia arriba de los ojos.

Mioclónicas-tónico-clónicas: Es similar a los ataques tónico-clónicos, pero es precedido de espasmos mioclónicos en ambos lados del cuerpo.

Mioclónicas-atónicas: Se presentan pequeñas contracciones mioclónicas, seguido de un estado de flacidez muscular.

Atónicas: Se presenta una pérdida repentina del tono muscular y la fuerza por lo que provoca caídas.

Espasmos epilépticos: Son convulsiones breves con flexiones en el tronco y las extremidades.

2.1.2. Etiología de la epilepsia

La epilepsia es el resultado de una sincronización anormal de las neuronas en el cerebro que interrumpe la correcta comunicación de éstas (Moshé y col., 2014). Existen diversos factores que pueden desencadenar las crisis convulsivas, entre las cuales se encuentran: lesiones en el cerebro, predisposición genética, infecciones, deficiencias metabólicas, alteraciones inmunológicas, entre otras (Scheffer y col., 2017). Estos factores tienen como resultado la muerte neuronal o la incorrecta comunicación sináptica. A nivel molecular, la actividad convulsiva puede inducirse mediante el bloqueo de los mecanismos de inhibición neuronal y la estimulación de los mecanismos de excitación neuronal (Staley, 2015).

Los mecanismos de excitación están regulados por los canales de Na^+ dependientes de voltaje y receptores ionotrópicos glutamatérgicos de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolilpropiónico (AMPA), y kainato (KA), por lo que, al ser activados, permiten la entrada de los iones Na^+ (receptores AMPA y KA) y pequeñas cantidades de Ca^{2+} (receptor NMDA) lo que provoca la despolarización de la membrana neuronal estimulando así la actividad neuronal. En el caso de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, al ser activados estimulan la liberación de neurotransmisores como el glutamato por la entrada de Ca^{2+} , lo que también provoca el incremento de la actividad neuronal. Los mecanismos de inhibición neuronal están regulados por los receptores ionotrópicos

de ácido γ -aminobutírico de tipo A (GABA_A), los cuales al ser activados sufren un cambio conformacional que permite la entrada del ion Cl⁻; ésto da como resultado la hiperpolarización de la membrana neuronal, inhibiendo su actividad (Noebels y col., 2012).

Otros receptores involucrados en el mecanismo molecular de la epilepsia son los receptores de potencial transitorio de tipo V1 (TRPV1), que al ser activados por temperaturas corporales de 42°C permiten la entrada de Ca²⁺, produciendo la excitación de la neurona; por lo cual están involucrados en las crisis febriles que son comunes en los niños (Saffarzadeh y col., 2016).

Los receptores y canales iónicos involucrados en la excitación e inhibición neuronal pueden sufrir cambios estructurales a causa de mutaciones en los genes que los codifican; adicionalmente, la desregulación de la concentración de iones (Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻, K⁺) en el espacio intra y extracelular tienen como resultado la generación de las crisis convulsivas en la epilepsia (Staley, 2015).

2.1.3. Fármacos anticonvulsivos

Históricamente, los fármacos anticonvulsivos pueden clasificarse en 3 generaciones, como se observa en la Figura 2. La primera generación comprende aquellos comercializados entre 1857 y 1958, como el bromuro de potasio, el fenobarbital, la primidona, la trimetadiona, y la etosuximida. La segunda generación comprende entre 1960 y 1975, entre estos se incluyen a la carbamazepina, el valproato, y las benzodiazepinas. Después del año 1980, se comercializaron compuestos de tercera generación, como la progabida, la gabapentina, la vigabatrina y la tiagabina. Actualmente, el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos va enfocado en la generación de nuevos compuestos con mejores propiedades farmacocinéticas (Targas-Yacubian, 2014).

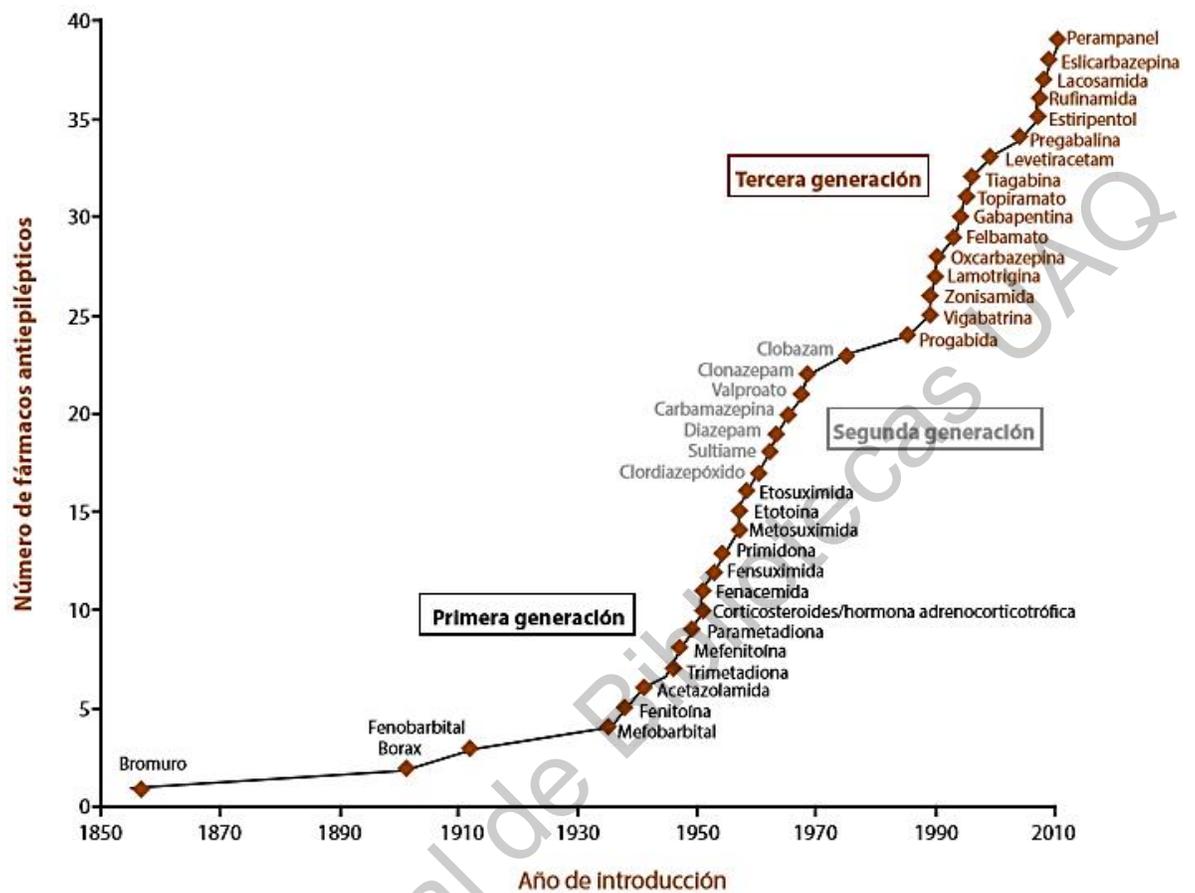


Figura 2. Generaciones de fármacos anticonvulsivos (Targas-Yacubian, 2014)

Los mecanismos de acción de los fármacos anticonvulsivos son variados y tienen como blancos biológicos aquellos que están involucrados en el mecanismo molecular de la epileptogénesis, como se indica en la Figura 3.

Entre los mecanismos de los fármacos antiepilépticos están:

- Inhibición de los canales de sodio: El bloqueo de los canales de sodio postsinápticos tiene como objetivo evitar la despolarización de las neuronas, lo que no permite una excitación neuronal (Florez, 2014).
- Potenciación de la inhibición GABAérgica: El GABA activa el canal de cloro del receptor GABA_A, lo que permite la entrada de este ion produciéndose una hiperpolarización de la membrana neuronal. Su efecto puede

potenciarse aumentando la concentración de GABA, o facilitando su acción sobre el receptor (Florez, 2014).

- Inhibición de la excitación glutamatérgica: Los receptores NMDA, AMPA y KA son canales iónicos dependientes de ligando que permiten la entrada de sodio y calcio. Al activarse estos receptores se permite la entrada de estas iones, provocando la despolarización de la membrana neuronal, por lo que reduciendo la liberación de glutamato y antagonizando su efecto se puede conseguir efectos anticonvulsivos (Florez, 2014).
- Inhibición de los canales de calcio: La inhibición de estos canales impide la entrada del ion calcio que es promotor de la liberación de neurotransmisores como el ácido glutámico y que da lugar a la despolarización sostenida de las neuronas (Florez, 2014).
- Activación de los canales de potasio: Los canales de potasio de KCNQ2 y KCNQ3 permiten la entrada de K^+ a la neurona, lo que permite la repolarización de la membrana. La activación de estos canales mediante fármacos permite la regulación de las despolarizaciones membranales que ocasionan las crisis epilépticas (Florez, 2014).
- Regulación de proteínas específicas involucradas con la síntesis, degradación o liberación de neurotransmisores: Algunos fármacos tienen la capacidad de unirse a enzimas que tienen la capacidad de regular a los neurotransmisores, como la inhibición de GABA transaminasa y el ácido succínico deshidrogenasa, que participan en la degradación de GABA, lo que resulta en una mayor disponibilidad de este neurotransmisor. Además, existe otro tipo de fármacos, que inactiva a la proteína SV2A, involucrada en la fusión de las vesículas sinápticas para la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico (Targas-Yacubian, 2014).

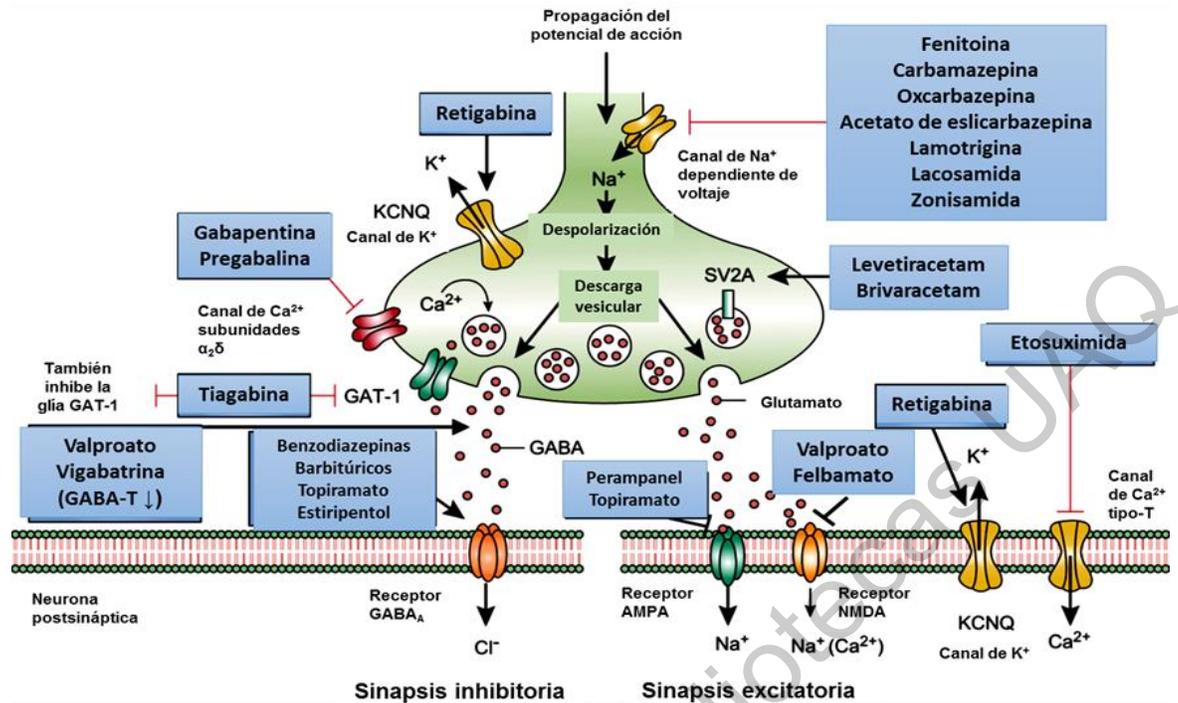


Figura 3. Dianas biológicas de los fármacos anticonvulsivos (Löscher, 2017, tomado de: Chavez-Elias, 2018)

No todos los pacientes responden al tratamiento farmacológico, cerca del 70 % de los casos que han sido tratados solo con un fármaco antiepiléptico han tenido éxito en controlar las crisis convulsivas; sin embargo, el otro 30 % de los casos no responden al tratamiento, por lo que se deben asociar otros medicamentos anticonvulsivos. Ante esto, es importante la búsqueda de nuevos fármacos para asegurar una mayor eficacia en el tratamiento de la epilepsia (OMS, 2017).

2.2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide está compuesto por ligandos lipídicos endógenos y es de suma importancia debido a que participa en aspectos fisiológicos de los mamíferos como la regulación del hambre, la ansiedad, dolor, neuroprotección, entre otros. Existen dos endocannabinoides que son los principales ligandos de este sistema, la anandamida y 2-araquidonoilglicerol, los cuales son afines a los

receptores cannabinoides CB1 y CB2 y son sintetizados por las enzimas FAAH y DAGL, como se observa en la Figura 4 (Di Marzo, 2014).

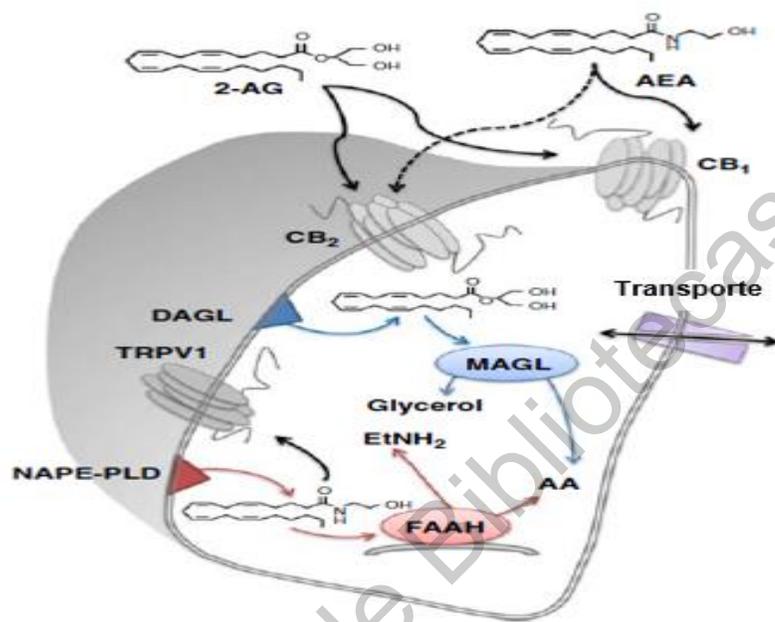


Figura 4. Sistema endocannabinoide EtNH₂: etanolaminas, AA: ácido araquidónico, FAAH: ácido graso amida hidrolasa, MAGL: monoacilglicerol lipasa, DAGL: diacilglicerol lipasa, NAPE-PLD: fosfolipasa D de *N*-acilfosfatidiletanolamina (Di Marzo, 2014)

Existen otros tipos de ligandos de naturaleza lipídica derivados de ácido araquidónico, como la virhodamina y el *N*-araquidonoidopamina, los cuales pueden activar también a los receptores cannabinoides, además, de unirse a otros receptores como PPAR α , GPR55 y TRPV1. Además, de estos compuestos existen otros estructuralmente parecidos a los endocannabinoides antes mencionados, como *N*-palmitoiletanolamida, *N*-oleiletanolamida y *N*-esteroiletanolamida, que no presentan afinidad a CB1 o CB2, pero son sustratos o moduladores de las enzimas metabólicas o de los receptores no endocannabinoides a los que se unen los compuestos endocannabinoides (Hansen y col., 2014).

2.2.1. Biosíntesis y degradación de los endocannabinoides

La biosíntesis de los compuestos endocannabinoides se origina por medio de los fosfolípidos de membrana, principalmente por las vías de las *N*-aciletanolamidas y del ácido 2-araquidonoilglicerol, como se observa en la Figura 5. La biosíntesis de las *N*-aciletanolamidas, como la anandamida, es generada a partir de las *N*-acilfosfatidiletanolamidas; estos compuestos son generados primero por una acilación SN1 de fosfatidiletanolamina con 1,2-diacilglicerofosfolípidos o 1-acilfosfolípidos por acción de una enzima *N*-aciltransferasa. El segundo paso consiste en la hidrólisis de *N*-acilfosfatidiletanolamidas a *N*-aciletanolamidas, mediante una fosfolipasa D sensible a Ca^{2+} (Muccioli, 2010).

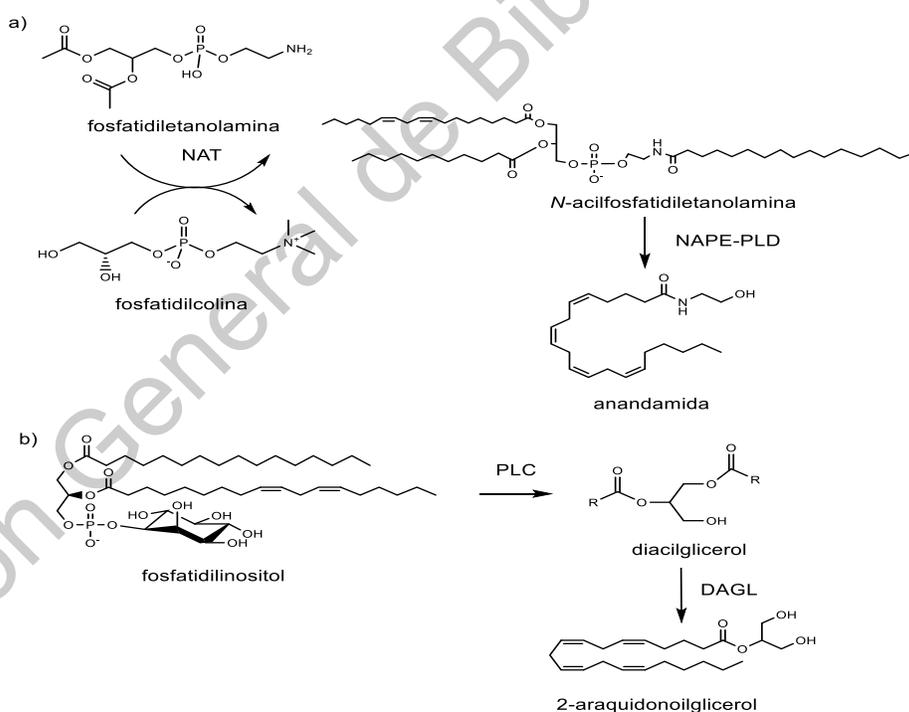


Figura 5. Esquema general de la síntesis de los endocannabinoides, a) síntesis de la anandamida, b) síntesis del 2-araquidonoilglicerol, NAT: *N*-aciltransferasa, NAPE-PLD: fosfolipasa D de *N*-acilfosfatidiletanolamina, PLC: fosfolipasa C, DAGL: diacilglicerol lipasa (Muccioli, 2010)

La siguiente vía consiste en la biosíntesis de 2-araquidonoilglicerol, primero la formación de diacilglicerol se lleva a cabo mediante fosfatidilinositol, por medio de la actividad de PLC; después, el diacilglicerol es hidrolizado a 2-araquidonoil glicerol mediante la enzima DAGL (Muccioli, 2010).

La hidrólisis de las *N*-aciletanolamidas, como la anandamida, ocurre por la acción de la enzima FAAH, que degrada estos compuestos a ácido araquidónico y etanolaminas. En el caso de la degradación del 2-araquidonoilglicerol, esto ocurre por medio de la enzima MAGL que hidroliza a la 2-araquidonoilglicerol en ácido araquidónico y monoacilglicerol (Muccioli, 2010).

2.2.1. Sistema endocannabinoide y epilepsia

En el proceso de las crisis convulsivas, la entrada de calcio a la membrana de la neurona postsináptica fomenta la biosíntesis de los compuestos endocannabinoides, que a su vez interactúan con diversos receptores como CB1, PPAR α o GPR55, los cuales son reguladores de la liberación de neurotransmisores y por lo tanto están asociados con una actividad anticonvulsiva (Wallace, 2003).

El mecanismo anticonvulsivo de CB1 al ser activado por endocannabinoides se explica debido a que su activación, produce la disociación de la subunidad α_i del trímero que conforma a la proteína G, en este caso una proteína G_i , por lo que promueve la inhibición del adenilato ciclasa, provocando una disminución de AMPc. Esto causa una disminución de la actividad de la proteína cinasa A, lo que a su vez resulta en la inhibición de la fosforilación de canales de Ca^{2+} presinápticos, lo que impide la entrada de este ion y con esto la supresión de liberación de neurotransmisores (Fernández-Ruiz y col., 2014).

En el caso del receptor PPAR α , se sabe que está asociado a diferentes genes que expresan proteínas involucradas en la regulación de la inflamación y en la liberación de neurotransmisores de tipo aminoácido como GABA, por lo que su activación estimula la expresión de estas proteínas produciendo una neuroprotección (Cullingford, 2008).

La inhibición del receptor GPR55 implica la regulación de entrada de Ca²⁺, lo que impide la liberación de neurotransmisores excitatorios como glutamato, los cuales promueven la excitabilidad neuronal (Sharir, 2012).

Debido a la capacidad regulatoria de la actividad neuronal por parte del sistema endocannabinoide, sus componentes resultan atractivos como blancos de posibles fármacos anticonvulsivos.

2.3. Generalidades de *Cannabis spp.*

Cannabis es un género de plantas de origen asiático que pertenece a la familia Cannabaceae la cual se puede observar en la Figura 6, se reconocen 13 especies, entre las que están: *C. americana*, *C. chinensis*, *C. erratica*, *C. faetens*, *C. generalis*, *C. gigantea*, *C. intersita*, *C. kafiristanica*, *C. lupulus*, *C. macrosperma* y *C. ruderalis* (Ángeles-López y col., 2014).

Estas plantas han sido utilizadas desde la antigüedad hasta nuestros tiempos como fibras textiles, combustible, alimento y fuente de medicamentos. Además, se les ha atribuido propiedades analgésicas, relajantes musculares, antidepresivas, hipnóticas e inmunosupresoras, debido a que contienen importantes compuestos medicinales como cannabinoides, terpenoides, flavonoides y alcaloides (Faray y col., 2016).

En el año 1972, mediante el protocolo del régimen global de control de drogas, las Naciones Unidas incluyeron normas contra la manufactura y el tráfico ilícito de drogas estupefacientes, entre estas sustancias fueron incluidos el *Cannabis*, las resinas y extractos de *Cannabis*, por lo que se le dio el estatus de ilegal de manera

global debido al abuso de esta sustancia. Recientemente, acontecimientos como la regulación del mercado de marihuana en Uruguay, la aprobación del uso médico e incluso el uso recreacional en algunos estados en Estados Unidos, la autorización por primera vez de una investigación científica sobre el uso medicinal de la marihuana por parte del departamento de salud de dicho país (Téllez-Mosquera, 2013), y la legalización del uso medicinal y científico en México (DOF, 2017); han generado una atención y una mirada más profunda hacia el tema de la marihuana.



Figura 6. (A) Planta, (B) flores, (C) pistilo, (D) porción de una flor, y (E) semillas de *Cannabis sativa* (Frag y col., 2016)

2.3.1. Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides son sustancias químicas que presentan un esqueleto de 21 carbonos de naturaleza terpenólica, estas sustancias se encuentran en las plantas del género *Cannabis*.

Se han aislado 104 fitocannabinoides clasificados en 11 tipos, los cuales son: Δ^9 -*trans*-tetrahidrocannabinol, Δ^8 -*trans*-tetrahidrocannabinol, cannabigerol, cannabicromeno, cannabidiol, cannabinodiol, cannabielsoina, cannabicitrol, cannabinol, cannabitriol y cannabionides de varios tipos (Elsohly y col., 2014).

La ruta de estos compuestos se origina a partir de la condensación de los precursores ácido olivetóico y genarildifosfato, para formar al ácido cannabigerólico, el cual es el precursor clave para formar a los diferentes cannabinoides. El ácido cannabigerólico es convertido mediante tres enzimas: la sintasa de ácido tetrahidrocannabinólico, la sintasa de ácido cannabidiólico, y la sintasa de ácido cannabicroménico que catalizan la estereoselectividad, y la ciclización para formar ácido tetrahidrocannabinólico, ácido cannabidiólico y ácido cannabicroménico. Estos compuestos a su vez sufren de distintas reacciones de oxidación, descarboxilaciones y reacciones asistidas por ultravioleta para formar a los distintos cannabinoides (Degenhart y col., 2016), como se describe en la Figura 7.

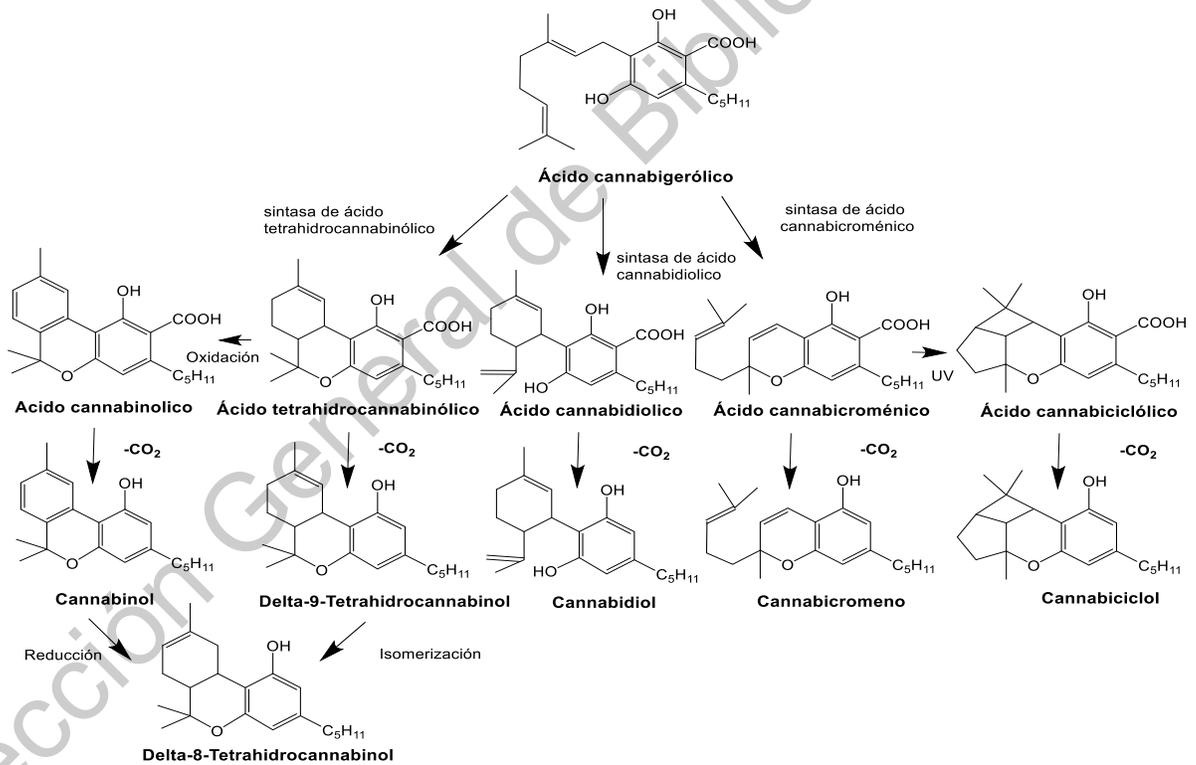


Figura 7. Biosíntesis de cannabinoides a partir del ácido cannabigerólico (Degenhart y col., 2016)

2.3.2. Cannabidiol

El cannabidiol es un componente de *Cannabis sativa* y constituye cerca del 40% del extracto de la planta; sin embargo, las concentraciones son variables dependiendo de las condiciones de crecimiento, diferentes fenotipos, y de la parte de la planta que se analiza (Bergamisch, 2011).

Este compuesto no se considera psicoactivo, a diferencia del tetrahidrocanabinol, debido a su baja afinidad a los receptores CB1 y CB2 (Mead, 2017). En ensayos con animales se ha reportado tener propiedades neuroprotectoras, ansiolíticas, antieméticas y antiinflamatorias. Mientras que en pacientes humanos ha mostrado efectos ansiolíticos y anticonvulsivos, por lo que se considera una buena opción para el tratamiento de la epilepsia (Mechoulam y col., 2014).

2.3.3. Efecto anticonvulsivo del cannabidiol

Se han realizado diversos estudios para probar el efecto anticonvulsivo de cannabidiol. En uno de ellos, realizado en 2017 en la Universidad de Minas Gerais, Brasil, se usó un modelo de pentilentetrazol en ratón. En este estudio se observó que la administración de 60 mg/kg de cannabidiol, 30 minutos antes de la inducción epiléptica de los ratones con pentilentetrazol, produjo un efecto anticonvulsivo. Además, se necesitó de una mayor concentración de pentilenterazol para inducir el estado epiléptico en los ratones previamente tratados con cannabidiol (Vilela y col., 2017).

En estudios realizados por Karler y Turkanis en 1988 en modelos de ratón, se evaluaron distintos cannabinoides para determinar la concentración efectiva media a la cual producían el efecto anticonvulsivo. Dichos autores encontraron que el cannabidiol produjo este efecto a una concentración de 120 mg/kg comparándolo con el Δ^9 -tetrahidrocanabinol que produjo el efecto anticonvulsivo a una concentración de 100 mg/kg, y el Δ^8 -tetrahidrocanabinol, el cual tuvo un efecto anticonvulsivo a 80 mg/kg (Devinsky y col., 2014).

En humanos, se llevó a cabo el estudio clínico abierto en 11 centros de epilepsia de Estados Unidos entre enero del 2014 y enero del 2015, en donde 169 pacientes

epilépticos con resistencia farmacológica entre las edades de 1-30 años fueron tratados con cannabidiol a una dosis de 2 a 5 mg/kg por día para aumentar la dosis hasta 25 mg/kg por día, además del tratamiento farmacológico base de cada persona. Los resultados mostraron, que hubo una reducción media de las convulsiones motrices mensuales del 36,5 %, con una buena seguridad y tolerabilidad del cannabidiol, ya que solo el 3 % de los pacientes detuvo el tratamiento con cannabidiol por los efectos adversos provocados como somnolencia excesiva, intolerancia gastrointestinal e hiperamonemia. (Devinsky y col., 2016).

El mecanismo anticonvulsivo de cannabidiol se puede explicar por su unión a ciertos receptores implicados en el mecanismo de la epilepsia, como los mostrados en la Tabla 3. Por ejemplo, este cannabinoide reduce la liberación sináptica de glutamato, como resultado de su actividad antagonista al receptor GPR55. Además, su unión a receptores TRPV1 y TRPV2 provoca su desensibilización, impidiendo la entrada de Ca^{2+} a la neurona evitando su excitabilidad (Devinsky y col., 2014).

Tabla 3. Algunos receptores y enzimas con los que interactúa cannabidiol (Pertwee, 2014)

Receptores y enzimas	Concentración efectiva media	Receptores y enzimas	Concentración efectiva media
CB1 (B)	<1 μ M	Canales iónicos dependiente de glicina subtipo α 1 y α 1 β (P)	>10 μ M
CB2 (B)	<1 μ M	TRPM8 (B)	<1 μ M
TRPV2 (A)	1-10 μ M	TRPA1 (A)	<1 μ M
5HT _{1A} (P)	<1 μ M	GPR18 (A o B)	>10 μ M
GPR55 (B)	<1 μ M	Canales de Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo T (-)	1-10 μ M
PPAR γ (A)	1-10 μ M	Receptores μ y δ opioides (B)	>10 μ M
FAAH (-)	>10 μ M	Fosfolipasa A ₂ (A)	1-10 μ M

(A) activación, (B) bloqueo, (P) potenciación, (-) inhibición o antagonismo

El cannabidiol también regula la acción de FAAH, esta enzima se encuentra relacionada con la regulación del sistema GABAérgico y glutamatérgico. La afinidad

del cannabidiol por los receptores 5HT_{1A} es otro importante factor en su actividad antiepiléptica debido a que la activación de este receptor tiene como resultado un efecto ansiolítico, relajante y antidepresivo (Samba y col., 2016).

La actividad anticonvulsiva derivada de la unión de cannabidiol con las dianas biológicas relacionadas con las crisis convulsivas, es interesante para el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces contra la epilepsia, por lo que un estudio *in silico* puede contribuir a determinar la manera de actuar del cannabidiol con estas dianas biológicas y descubrir que rol está jugando este compuesto cannabinoide en su actividad anticonvulsiva.

2.4. Técnicas *in silico* en la búsqueda y diseño de fármacos

El proceso de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos generalmente consume mucho tiempo, recursos y es arriesgado. El típico ciclo de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos tarda aproximadamente de 7 a 14 años y el costo va de los 800 a 1000 millones de dólares; como consecuencia de esto y al gran avance tecnológico de la actualidad, varias técnicas *in silico* se han desarrollado para acortar el ciclo de búsqueda, reducir los gastos y el riesgo de fallar en el descubrimiento de nuevos fármacos (Ou-Yang y col., 2012).

La aplicación de técnicas *in silico*, como la relación cuantitativa estructura actividad, acoplamiento molecular, dinámica molecular y modelado molecular por homología; tienen como objetivo la búsqueda virtual y el cálculo de un perfil de afinidad, lo cual es útil en la identificación de moléculas activas para un objetivo de interés (Sacan y col., 2012). Dentro de estas técnicas existen ventajas y limitaciones en comparación con los métodos experimentales; sin embargo, no se debe de considerar que éstas son el reemplazo de los estudios experimentales, sino un complemento (Gilbert, 2011). En la Tabla 4, se muestran algunas ventajas y desventajas de las técnicas *in silico* en comparación con los métodos experimentales.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de la química computacional (Valles-Sanchez, 2014)

Ventajas	Desventajas
Son seguras ya que no se emplean reactivos o materiales dañinos.	En algunas ocasiones los cálculos obtenidos pueden ser erróneos debido a posibles problemas con los programas.
Son limpias con el medio ambiente debido a que no se utilizan sustancias contaminantes.	Existe la probabilidad de obtener en los resultados falsos positivos o falsos negativos ya que los cálculos son aproximaciones.
El costo invertido es barato en comparación con los resultados obtenidos.	Conforme los modelos computacionales de estudio sean más complejos, habrá una menor reproducibilidad en los resultados.
Son técnicas que se pueden aplicar cuando las condiciones en los métodos experimentales son difíciles (altas temperaturas, condiciones de vacío, altas presiones, etc).	En algunos casos donde se aplica la mecánica cuántica, los cálculos son demasiado lentos y los métodos muy complicados de usar.

2.4.1. Modelado molecular por homología

El modelado por homología es una técnica de construcción predictiva de la estructura terciaria y cuaternaria de una secuencia de aminoácidos, basado en la premisa de que las proteínas relacionadas evolutivamente comparten una estructura similar. Esta herramienta es útil cuando las estructuras de proteínas grandes o proteínas transmembranales no pueden ser elucidadas mediante cristalografía de rayos X o espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, además de ofrecer ventajas ante estas dos técnicas, como el tiempo requerido para llevar acabo estos procesos y los costos (Vyas, 2012).

En la práctica, el modelado por homología es un proceso que puede ser resumido en 7 pasos, mismos que también se pueden observar en la Figura 8:

1. Modelado de reconocimiento y alineación inicial.
2. Corrección de la alineación.
3. Generación de la estructura base.
4. Modelado del *loop*.
5. Modelado de las cadenas laterales
6. Optimización del modelo.
7. Validación del modelo.

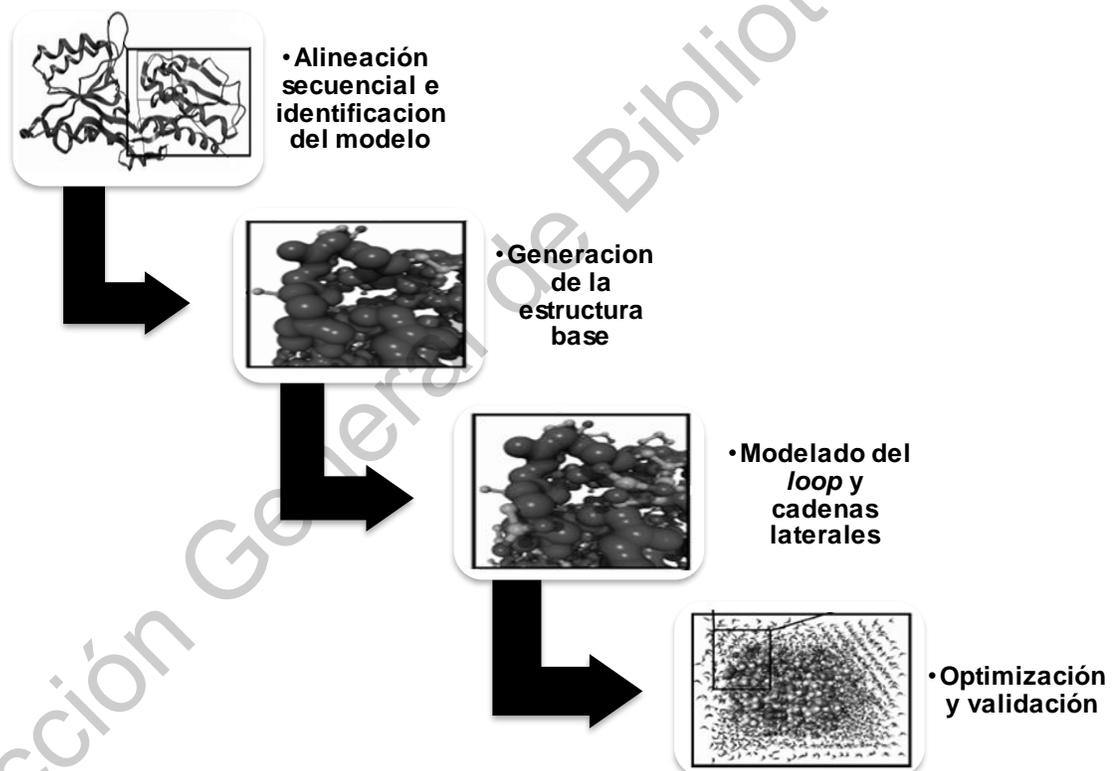


Figura 8. Proceso general del modelado por homología (Krieger, 2005)

Esta técnica permite a los usuarios utilizar de forma segura modelos de proteínas *in silico* generados rápidamente, en todos los contextos donde sólo las técnicas experimentales podían hacerlo (Krieger, 2005).

2.4.2. Acoplamiento molecular (*docking*)

Las herramientas computacionales pueden proveer el conocimiento de cuales proteínas interactúan con determinados ligandos, y como están interactuando. Las predicciones de estas interacciones pueden llevarse a cabo con el acoplamiento molecular para identificar los modos de unión más promisorios, acorde al puntaje de las interacciones moleculares y estéricas (Kuzu y col., 2012).

El acoplamiento molecular es aplicado como una técnica estándar del diseño basado en la estructura para la identificación temprana de compuestos prototipo, en donde el puntaje se usa para elegir a los compuestos potencialmente afines a las estructuras proteicas elegidas (Von Grafenstein y col., 2014), para realizar un acoplamiento molecular y conseguir resultados exactos y confiables es necesario seguir diferentes pasos que se describen en la Figura 9.

Existen diferentes técnicas de acoplamiento molecular basadas en la rigidez o flexibilidad del ligando y la proteína de estudio, éstas son:

- *Docking* rígido: En esta técnica de *docking* tanto los ligandos como las proteínas son rígidas, por lo que los algoritmos se basan en las características de la compatibilidad a distancia. Estas características incluyen, interacciones de puente de hidrógeno, distancias o segmentos de volumen del sitio de unión de la proteína con los ligandos.
- *Docking* con ligando flexible: En este caso el ligando es flexible tomando en cuenta la rotación de los enlaces del compuesto asumiendo que la proteína es rígida, por lo que el ligando puede adoptar diferentes conformaciones que contribuyen en la afinidad del ligando con la proteína.
- *Docking* con proteínas semiflexibles: En ambos casos, el ligando es flexible y la proteína se considera flexible en la vecindad del sitio de unión, se adoptó esta modalidad debido a que en muchos casos la proteína ajusta su conformación por la unión con algún ligando (Muegge y col., 2004).

2.4.3. Simulaciones de dinámica molecular

La dinámica molecular es útil para analizar los mecanismos que la proteína muestra cuando su sitio activo interactúa con algún ligando, mostrando una descripción más realista del proceso debido a que las corridas experimentales de la proteína, el ligando y el solvente de los alrededores del complejo; muestran una simulación “animada” de cómo la estructura de la proteína cambia cuando el ligando entra al sitio activo (Young, 2009).

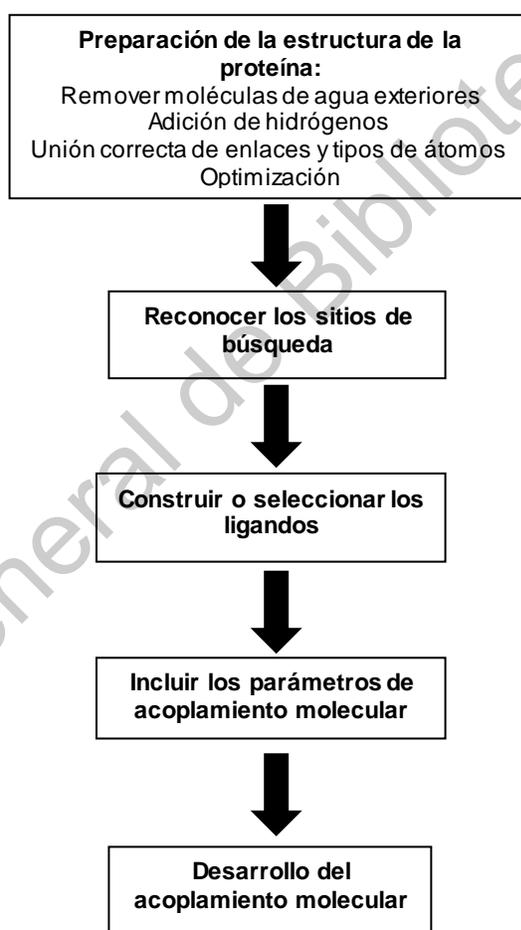


Figura 9. Proceso general del acoplamiento molecular (Young, 2009)

Esta técnica es descrita como el estudio de un sistema químico aplicando constantes termodinámicas a lo largo del tiempo, en donde el cálculo de las ecuaciones de Newton representa el movimiento para cada átomo del sistema

molecular, por lo que los átomos son representados como una colección de “bolas de billar”, que mediante su interacción generan fuerzas intermoleculares, las cuales pueden ser calculadas mediante campos de fuerza (Marshall y col., 2002).

La estrategia general en la dinámica molecular mostrada en la Figura 10, es calcular las fuerzas sobre los átomos en el sistema y luego permitir que los átomos se muevan bajo la influencia de esta fuerza, por lo general para un femtosegundo después, se calculan nuevas fuerzas a partir de estas posiciones para ser aplicadas en el siguiente paso de la dinámica y así sucesivamente, además se aplican diferentes parámetros de presión, volumen, temperatura y solvatación en el campo de fuerza. Esto permite concebir un modelo apropiado y más cercano a la realidad (Hubbard y col., 1996).



Figura 10. Proceso general de dinámica molecular (Cohen, 1996)

3. JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es un trastorno neurológico que lo padecen cerca de 50 millones de personas por lo que se considera uno de los trastornos neurológicos más comunes en el mundo; de éstos, cerca del 30 % no encuentra una opción eficaz para tratar sus crisis convulsivas, por lo que la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas cobra gran importancia.

Ciertos acontecimientos actuales, como la autorización del Departamento de Salud de Estados Unidos para la investigación de *Cannabis* como un agente terapéutico, la legalización de la marihuana con motivos científicos y medicinales en Uruguay y recientemente en México, han abierto la posibilidad de realizar investigaciones relacionadas con *Cannabis* y sus constituyentes, los fitocannabinoides, para el desarrollo de nuevos fármacos que pueden ser empleados contra distintas enfermedades.

Dentro de la búsqueda experimental de cannabinoides como agentes terapéuticos, sobresale el cannabidiol, que ha mostrado tener efectos anticonvulsivos en diferentes estudios, tanto en modelo de rata, como en estudios clínicos. Por otra parte, el cannabidiol no posee actividad psicoactiva como otros cannabinoides; por lo tanto, este compuesto es de gran interés como una alternativa para el tratamiento de la epilepsia.

El cannabidiol se une con diferentes dianas biológicas del sistema nervioso central y sistema endocannabinoide, modulando su actividad y produciendo así un efecto anticonvulsivo; sin embargo, no se conoce con certeza las interacciones y los cambios conformacionales que produce en sus dianas biológicas, para generar el efecto antiepiléptico. Así mismo, la interacción del cannabidiol con estas dianas biológicas tiene consecuencias metabólicas que, vistas en un contexto de sistemas biológicos, tendrán mayor o menor participación en la manifestación del efecto anticonvulsivo. Un estudio de sistemas metabólicos permitirá definir cuáles dianas son relevantes en los efectos biológicos del cannabidiol, ya que sólo se ha descrito

la afinidad de este compuesto a ciertas dianas biológicas, pero la relevancia de éstas en la manifestación del efecto antiepiléptico no ha sido definida claramente.

Bajo estas interrogantes, las técnicas computacionales, como la generación de redes de interacción, el acoplamiento molecular, la dinámica molecular y el modelado por homología; pueden proveer información acerca de las interacciones, la afinidad y los cambios conformacionales que produce el cannabidiol con dianas biológicas que tienen relevancia en el proceso epiléptico, con el propósito de comprender mejor el mecanismo antiepiléptico del cannabidiol.

4. HIPÓTESIS

El cannabidiol interactúa con las dianas biológicas seleccionadas induciendo un cambio estructural y conformacional del complejo ligando-receptor, observable mediante técnicas *in silico*.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

Evaluar las interacciones moleculares del cannabidiol con dianas biológicas relacionadas con la manifestación de las crisis convulsivas en la epilepsia, a través de técnicas *in silico*.

5.2. *Objetivos específicos*

- Describir la afinidad experimental del cannabidiol por medio de la construcción de una red de interacciones proteína-proteína de dianas biológicas relacionadas con la epilepsia y el cannabidiol, para seleccionar a las más relevantes en la manifestación de las crisis convulsivas en la epilepsia.
- Construir, utilizando modelado molecular por homología, la estructura tridimensional de las dianas biológicas seleccionadas del perfil de afinidad.
- Calcular y describir la interacción, en forma y modo de unión, del cannabidiol con las dianas biológicas seleccionadas, utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.
- Proponer un modelo de interacción ligando-proteína general que defina los requerimientos estructurales ideales, para la posible manifestación anticonvulsiva del cannabidiol.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Materiales*

Los siguientes programas computacionales, bases de datos, y servidores web se emplearon para evaluar la interacción del cannabidiol con las dianas biológicas seleccionadas:

- Base de datos: UniProt (The Uniprot Consortium, 2018).
- Servidor web para la obtención de las interacciones de las proteínas diana: String 10.5 (Szklarczyk y col., 2017).
- Software para el análisis de cavidades: Caver Analyst 2.0 (Jurcik y col., 2018).
- Software para la realización del diagrama de interacción de dianas biológicas relacionadas con la epilepsia: Cytoscape 3.5.1, (Shannon y col., 2003).
- Servidor web para la realización del diseño de proteínas basado por homología: I-TASSER 5.1 (Yang y col., 2015).
- Software para la preparación del ligando y visualización de resultados: Schrödinger-Maestro 2017-4, versión académica (Schrodinger, 2017).
- Software para la realización de los acoplamientos moleculares: MGLTools 1.5.4, AutoGrid 4.2.6 y AutoDock 4.2.6. (Morris, 2009).
- Servidor web para la preparación de archivos para las simulaciones de dinámica molecular: Charmm-GUI (Jo y col., 2008).
- Software para la realización de las dinámicas moleculares: Gromacs 2016.4 (Pronk y col., 2013).

6.2. *Métodos*

- 6.2.1. Construcción de una red de interacción de dianas biológicas que incluye la información sobre la afinidad del cannabidiol y las interacciones de sus dianas biológicas

Para identificar las posibles interacciones proteína-proteína, se realizó la búsqueda de información acerca de las dianas biológicas relacionadas con la epilepsia y el cannabidiol mediante la base de datos UniProt, para obtener información general de las proteínas como su función, taxonomía, localización celular, interacciones, estructura, familia y dominios, y proteínas similares.

Posteriormente, se hizo una búsqueda de las interacciones entre dianas biológicas relacionadas con la epilepsia y el cannabidiol mediante la base de datos String 10.5, en el cual se utilizaron los parámetros de búsqueda basada en la vecindad cromosómica, determinaciones experimentales, anotaciones de bases de datos y concurrencia filogenética. Se usaron los resultados que tuvieron una alta confiabilidad (del 70 al 90%), y con un máximo número de interacciones no mayor a 10. Con esta información, se llevó a cabo la construcción de dos diagramas de interacción entre proteínas con el software Cytoscape 3.5.1.

En el primer diagrama se incluyeron las interacciones entre dianas biológicas relacionadas con la epilepsia y cannabidiol, obtenidas de la base de datos de String 10.5, después se determinaron como atributos de interacción de la red a los parámetros de búsqueda de vecindad cromosómica, fusión génica, concurrencia filogenética, coexpresión, interacción determinada experimentalmente, anotaciones de datos de base, menciones textuales y puntaje combinado, esta red tuvo como objetivo poder observar las interacciones y la influencia metabólica de cada una de las dianas biológicas a las cuales se une cannabidiol.

La segunda red de interacción se construyó a partir del índice de Tanimoto (el cual es un valor entre 0 y 1 que determina la similitud estructural de moléculas) calculado entre cannabidiol y fármacos anticonvulsivos; los fármacos que presentaron un índice de Tanimoto mayor o igual al promedio de los valores de todos los fármacos se seleccionaron para la red de interacción y se determinaron las dianas farmacológicas de estos fármacos. A partir de estas dianas farmacológicas se calculó el porcentaje de similitud estructural entre éstas y dianas biológicas a las

cuales se une el cannabidiol. La información obtenida se tomó como base para la construcción de la segunda red de interacción, posteriormente se incluyeron los datos de número de reacciones adversas graves por cada fármaco anticonvulsivo en la red de interacción.

6.2.2. Construcción de la estructura tridimensional de las dianas biológicas seleccionadas utilizando modelado por homología

Se construyeron las estructuras tridimensionales de las dianas biológicas, seleccionadas mediante los diagramas de interacción proteína-proteína, utilizando los servidores web I-TASSER, ROBETTA y SWISS-MODEL en el cual se introdujo la secuencia primaria de aminoácidos de las dianas biológicas, restricciones de contacto/distancia y restricciones de la estructura secundaria para construir el modelo tridimensional.

Para validar los modelos por homología construidos por los servidores web, se calcularon los diagramas de Ramachandran con el servidor web MOL-PROBITY, y se realizó una simulación de dinámica molecular con el programa GROMACS 2016.4 utilizando el campo de fuerza CHARMM36, previamente preparando los archivos en el servidor web CHARMM-GUI.

6.2.3. Acoplamiento molecular del cannabidiol con las dianas biológicas elegidas

Se obtuvo la estructura tridimensional del cannabidiol de la base de datos PubChem y se sometió a una optimización de geometría utilizando el programa Maestro 2017-4 de Schrödinger. Posteriormente, se identificaron los enlaces rotables (raíz y ramas torsionales) y se asignaron cargas atómicas tipo Gasteiger-Marsilli con el programa MGLTools 1.5.4. Este archivo preparado se guardó en el formato PDBQT para su uso en el acoplamiento molecular en AutoDock 4.2.6.

Por otra parte, se calcularon los mapas atómicos (*grids*) necesarios para realizar el acoplamiento molecular en AutoGrid 4.2.6 usando una malla cúbica lo

suficientemente grande para cubrir las regiones de las proteínas que tengan cavidades lo suficientemente grandes para albergar a cannabidiol, con espaciamiento entre puntos de 0.375 Å, la búsqueda de estas cavidades se realizó con el programa Caver Analyst 2.0.

Finalmente, los acoplamientos moleculares de las dianas biológicas elegidas y el cannabidiol se llevaron a cabo con el software AutoDock versión 4.2.6. Se utilizó un algoritmo genético de tipo Lamarkiano como método de búsqueda conformacional, en 20 corridas con un máximo de 5×10^6 evaluaciones de energía y una población inicial de 150 conformaciones del cannabidiol.

6.2.4. Cálculo de la afinidad del cannabidiol a las dianas biológicas observando cambios estructurales en las mismas

Para el estudio de los complejos cannabidiol-proteína, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el software Gromacs versión 2016.4 usando el campo de fuerza CHARMM36 y preparando las proteínas con el servidor web CHARMM-GUI. En estas simulaciones se utilizaron moléculas de agua tipo punto triple (TIP3) en una celda unitaria suficientemente grande para tener 15 Å de espacio libre en condiciones periódicas de frontera y una concentración total de 0.15 M neutralizando la carga del sistema con iones Na^+ y Cl^- . Cuando se requirió, se construyó una membrana homogénea de fosfatidilcolina (POPC).

El sistema preparado se sometió a una minimización de energía con un algoritmo de gradiente conjugado de 1000 pasos máximo y una tolerancia de 1000 kJ/mol nm. Posteriormente, se sometió a una serie de procesos de equilibrio de variables termodinámicas de 25 ps cada una, disminuyendo gradualmente las restricciones torsionales de la proteína o del complejo proteína-ligando, en un ensamble isotérmico-isobárico (1 atm).

Los sistemas ligando-proteína, solvatados y en equilibrio, se sometieron a una simulación de dinámica molecular sin restricciones de 10 ns en un ensamble isotérmico-isobárico (310.15K y 1 atm). A las trayectorias obtenidas se les realizó

un análisis matricial de la desviación de la media cuadrática (RMSD) de los átomos de la proteína para elegir las conformaciones representativas, y a éstas últimas se les calcularon los diagramas de interacción ligando-proteína, según fue necesario.

Por último, el cálculo de la energía de unión se realizó utilizando la ecuación de energía de interacción lineal (método LIE) (Aguayo-Ortiz y col., 2013).

6.2.5. Cuadro metodológico

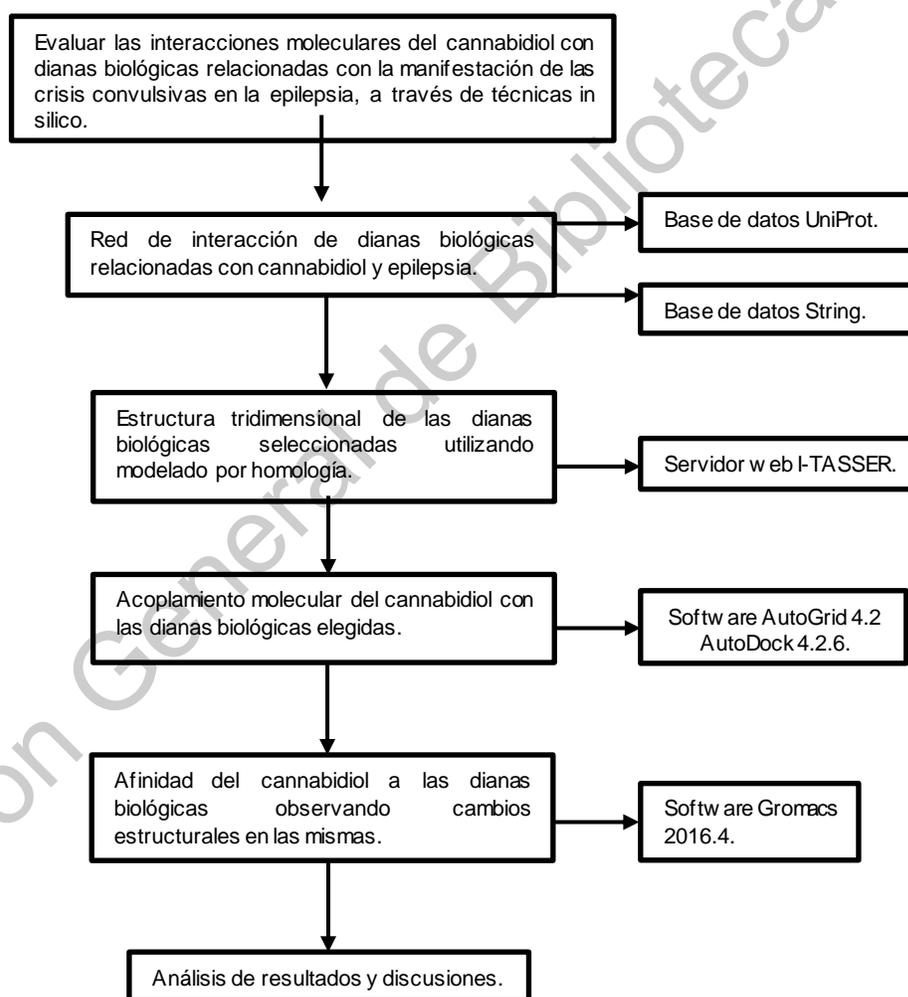


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología del presente trabajo

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Selección de las dianas biológicas más relevantes en el proceso de la epilepsia a partir de las redes de interacción

Se construyeron dos redes de interacción con el programa Cytoscape 3.5.1 para la selección de dianas biológicas. La primera de ellas se construyó con el propósito de observar la influencia metabólica de cada diana biológica de acuerdo al número de interacciones que presentaran cada una de éstas, seleccionando de esta red a aquellas que son blanco de cannabidiol, que estén relacionadas con un proceso convulsivo y presenten pocas interacciones, ya que esto podría sugerir una menor alteración de otros procesos metabólicos. La segunda red de interacción se construyó para determinar la relevancia en el proceso de las crisis convulsivas de dianas biológicas blanco de cannabidiol y de fármacos anticonvulsivos, tomando como base el porcentaje de similitud de la secuencia primaria entre dianas biológicas, el número de interacciones que presentaron, y el número de fármacos anticonvulsivos que se unen a cada diana, seleccionando a aquellas dianas que presentaran un mayor número de interacciones, lo cual es representativo de una mayor relevancia en un proceso anticonvulsivo.

En la Tabla 5 se muestran las dianas biológicas que son blanco de cannabidiol y que se tomaron en cuenta para la construcción de ambas redes. En la Tabla 6 se muestran a los fármacos anticonvulsivos con su correspondiente índice de Tanimoto calculado con respecto al cannabidiol (valor entre 0 y 1 que indica la similitud estructural entre dos moléculas), y las dianas farmacológicas que son blanco de estos fármacos.

De la información de la Tabla 6 se seleccionaron los fármacos fenitoina, vigabatrina, pregabalina, levetiracetam, felbamato, gabapentina, brivaracetam, retigabina, lacosamida, etosuximida, tiagabina, primidona, fenobarbital, y ácido valproico, ya que cumplieron con un índice de tanimoto mayor o igual a 0.3 (promedio), de estos fármacos se seleccionaron sus dianas biológicas y posteriormente se calculó el

índice de similitud entre estas proteínas y con las dianas biológicas de cannabidiol, con esta información se construyó la segunda red de interacción.

Tabla 5. Dianas biológicas que son blanco de cannabidiol

Dianas biológicas		
CB1	TRPV3	Receptor nuclear PPAR γ
CB2	GPR18	5-lipooxigenasa
GPR55	Receptor μ opioide	CYP1A1
5HT _{1A}	Receptor δ opioide	CYP2B6
5HT _{3A}	Receptor de glicina α 1	CYP2C9
TRPM8	Receptor de glicina α 1 β	CYP2D6
TRPA1	Receptor de glicina α 3	CYP3A5
TRPV4	FAAH	CYP2A6
Canal de Cav de tipo T	Indolamida 2-3 dioxigenasa	Glutación peroxidasa
TRPV1	Fosfolipasa A ₂	Glutación reductasa
TRPV2		

En la red de interacción metabólica, la cual se presenta en totalidad en la Figura 59 del Anexo, se observaron diferentes clústeres de dianas biológicas, mientras que en la Figura 12 se observa uno de ellos que contiene a la enzima FAAH, la cual es la encargada de la degradación de los endocannabinoides anandamida, *N*-oleoiletanolamida, oleamida, *N*-palmitoiletanolamida, *N*-stearoiletanolamida (McKinney y Cravatt, 2005). Experimentalmente, cannabidiol ha demostrado tener una actividad inhibitoria de FAAH a una concentración de $15.2 \pm 3.2 \mu\text{M}$, esto puede relacionarse con una actividad anticonvulsiva que depende indirectamente de la activación del receptor CB1 mediado por los endocannabinoides, por lo cual esto representa a FAAH como un blanco con efecto anticonvulsivo (Bih y col., 2015). Del análisis del clúster de la Figura 12, FAAH no parece alterar muchos procesos metabólicos debido a las pocas interacciones que produjo con otras dianas biológicas, ya que se situó en un clúster con pocas dianas biológicas.

Tabla 6. Fármacos anticonvulsivos con su índice de Tanimoto calculado con respecto al cannabidiol y dianas biológicas a las cuales se unen

Fármacos anticonvulsivos	Índice de Tanimoto	Dianas farmacológicas
Lamotrigina	0.16	Canales de Nav, Canales de Cav de tipo T, tipo N, tipo P/Q
Zonisamida	0.20	Canales de Nav, Canales de Cav de tipo T, tipo N, tipo P/Q
Carbamazepina	0.21	Canales de Nav
Clonazepam	0.22	Receptor de GABA _A
Perampanel	0.26	Receptor AMPA
Topiramato	0.27	Receptor AMPA, Receptor de GABA _A , Canales de Nav
Sultiame	0.27	Canales de Nav, Anhidrasa carbonica
Oxcarbazepina	0.28	Canales de K de tipo KCNQ, Canales de Nav, Canales de Cav de tipo N, tipo P/Q
Fenitona	0.31	Canales de sodio Nav
Vigabatrina	0.33	GAT-1
Pregabalina	0.33	Canales de Cav de tipo N, tipo P/Q
Levetiracetam	0.33	SV2A
Felbamato	0.33	Receptor GABA _A
Gabapentina	0.36	GAT-1, Canales de Cav de tipo N, tipo P/Q
Brivaracetam	0.36	SV2A
Retigabina	0.37	GAT-1, Canales de K de tipo KCNQ
Lacosamida	0.39	Canales de Nav
Etosuximida	0.39	Canales de Cav de tipo T
Tiagabina	0.42	GAT-1
Primidona	0.45	Receptor GABA _A
Fenobarbital	0.46	Receptor GABA _A
Ácido valpróico	0.52	Canales de Nav, succinato aldehído deshidrogenasa, GABA transaminasa, Receptor AMPA, Receptor NMDA

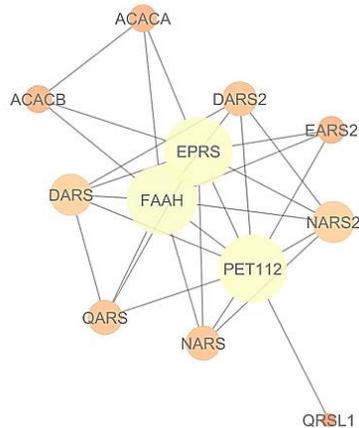


Figura 12. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a FAAH

Otra diana biológica que se eligió para el posterior estudio computacional es TRPV1, del análisis de la red de interacción metabólica TRPV1 se situó en un clúster que contiene pocas dianas biológicas e interacciones, como se puede observar en la Figura 13, por lo que pudiera no alterar muchos procesos metabólicos. Este receptor ionotrópico está asociado a la excitabilidad neuronal debido a que su activación permite el paso de los iones Ca^{2+} y Na^{+} los cuales están involucrados en la etiología de la epilepsia (Naziroglu, 2015). Estudios experimentales demostraron que cannabidiol, a una concentración de $30 \mu M$ activa al receptor TRPV1, seguido de una rápida desensibilización, estos resultados demuestran que cannabidiol puede estar mediando un efecto anticonvulsivo al desensibilizar a este receptor (Iannotti y col, 2014).

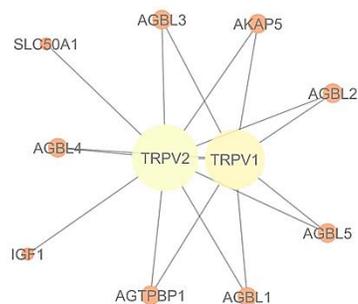


Figura 13. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a TRPV1

Por último, se seleccionó al receptor GPR55, del análisis de la red de interacción metabólica, se observó que esta diana biológica se situó en un clúster con pocas interacciones y dianas biológicas, por lo que su posible influencia en otras rutas metabólicas es poca, como se observa en la Figura 14. Se ha demostrado que la activación este receptor huérfano, favorece la liberación de Ca^{2+} intracelular, lo que facilita la neurotransmisión en el hipocampo y por lo tanto la activación prolongada de este receptor pudiera estar correlacionada con la aparición de las crisis convulsivas en la epilepsia (Marichal-Cancino y col., 2017). El cannabidiol se une con una alta afinidad a GPR55 y se ha reportado que tiene un efecto antagónico, con un IC_{50} de 445 nM, esto tiene como resultado una posible regulación de la transmisión sináptica, que puede estar relacionado con un efecto anticonvulsivo (Ryberg y col., 2007).

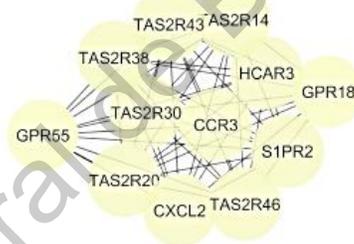


Figura 14. Clúster de la red de interacción metabólica que contiene a GPR55

No se observaron otros nodos de relevancia que pudieran estar relacionados con un efecto anticonvulsivo y que estuvieran implicados en pocos procesos metabólicos en la presente red de interacción.

Del análisis de la red de interacción basada en la similitud de las dianas biológicas de anticonvulsivos, mostrada en la Figura 15, se observa que la subunidad $\alpha 1\text{G}$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, (CACNA1G) se presenta como un nodo central, debido a que posee un mayor número de interacciones. Estos canales de Ca^{2+} de tipo T son una diana importante para el tratamiento de la epilepsia debido a su asociación con la excitabilidad neuronal, siendo blanco de un fármaco anticonvulsivo, la etosuximida (Slobodan y col., 2010). El cannabidiol puede inhibir

2016), los cuales producen pocos efectos adversos en comparación con otros fármacos anticonvulsivos, lo cual es acorde con el tamaño de nodo de los fármacos. Esta proteína se localiza en la membrana de las vesículas secretoras de las neuronas y en células endocrinas con una alta prevalencia en el cerebro (Madeo y col., 2014). La función de SV2A no está bien entendida, aunque se propone que juega un papel importante en la liberación de neurotransmisores (Wan y col. 2011). De manera experimental, estudios realizados en la Universidad de Bonn, Alemania, demostraron que cannabidiol se une con una gran afinidad a SV2A; sin embargo, se desconoce que esto pudiera estar correlacionado con una actividad anticonvulsiva (Danish, 2017).

Otra diana importante que se presentó como relevante en el proceso de la epilepsia y que puede contribuir con un efecto anticonvulsivo, es el receptor ionotrópico de glicina $\alpha 1\beta$. En este caso, el nodo de la subunidad $\alpha 1$ de receptores de glicina (GLRA1) se presentó como un nodo importante debido a su parecido estructural con la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A (GABRA1) ya que ambos nodos se encuentran cercanos, como se observa en la Figura 15 y esto es indicativo de un mayor porcentaje de similitud estructural. Debido a este parecido estructural con la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A y a que este receptor es blanco de muchos fármacos anticonvulsivos se determinó como blanco de estudio al receptor de glicina $\alpha 1\beta$. De manera experimental, se evaluó el efecto de cannabidiol a una concentración de 10 $\mu\text{mol/L}$ en los receptores α y $\alpha 1\beta$ expresándolos en células embrionarias renales, los resultados demostraron que cannabidiol potenció las corrientes mediadas en los receptores de glicina, por lo tanto, esto se asocia con una actividad anticonvulsiva debido a que la potenciación de la actividad de receptores de glicina α y $\alpha 1\beta$ produce una hiperpolarización de la membrana neuronal (Ahrens y col. 2009).

No se observaron otros nodos relevantes que pudieran estar mediando una mayor actividad anticonvulsiva en la red de interacción basada en el porcentaje de similitud entre dianas biológicas.

7.2. Modelos tridimensionales

Los modelos tridimensionales de las dianas biológicas seleccionadas (SV2A, GPR55, receptor de glicina $\alpha 1\beta$, FAAH, TRPV1, canal de calcio voltaje dependiente de tipo T) representados en la Figura 16 se construyeron a partir de diferentes estrategias. En el caso del receptor de glicina $\alpha 1\beta$, que es un heteropentámero constituido por 3 subunidades β y dos subunidades α , y TRPV1 el cual es un homotetrámero, se modelaron las subunidades individuales de cada uno de ellos con el servidor I-TASSER, y posteriormente se alinearon con otros receptores (receptor de glicina $\alpha 1$ y TRPA1) para dar forma y construir de manera completa a estos receptores. El modelo de la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T se construyó a partir de diferentes partes debido a su complejidad, la parte transmembranal correspondiente a los aminoácidos 81-1854, se construyó con el servidor web SWISS-MODEL, la parte citoplasmática correspondiente de los aminoácidos 1-80 se construyó con el servidor web I-TASSER y la parte citoplasmática de 1854-2377 aminoácidos se construyó con el servidor web ROBETTA. Posteriormente estas partes se unieron con el programa Maestro-Schrodinger 10.0. El modelo de SV2A (Correa-Basurto y col., 2015) y el modelo de GPR55 (trabajo de Doctorado en Ciencias Químico-Biológicas de Edna Hurtado Santiago) ya habían sido construidos previamente en nuestro grupo de trabajo. Por último, el modelo de la enzima FAAH se obtuvo en su totalidad con el servidor I-TASSER.

La Tabla 7 muestra información acerca de la validación de los modelos construidos, estos se obtuvieron de los servidores web que se emplearon para su construcción, también se determinó el porcentaje de aminoácidos favorecidos del diagrama de Ramachandran. Los datos de C-score de I-TASSER y GMQE para el caso de SWISS-MODEL son aceptables para todos los modelos ya que se encuentran entre los rangos de -5 a 2 lo que indica una calidad aceptable de los modelos construidos. Para el caso del Z-score de I-TASSER y QMEAN para SWISS-MODEL los valores presentados son de la plantilla con el valor más alto, lo que determina que la plantilla

usada para el modelado presenta una mayor similitud de la secuencia primaria. Los datos de aminoácidos favorecidos calculados en el diagrama de Ramachandran antes de la aplicación de la dinámica molecular, muestran que los modelos de GPR55 y FAAH fueron los que presentaron un mayor porcentaje, por lo que son de una mayor calidad; para los demás modelos los valores son aceptables, estos valores aumentaron con la aplicación de la dinámica molecular, obteniéndose valores mayores al 80% por lo que la calidad de los modelos aumentó; para cada diana biológica los diagramas de Ramachandran se presentan en las Figuras 60, 61 y 62 del Anexo.

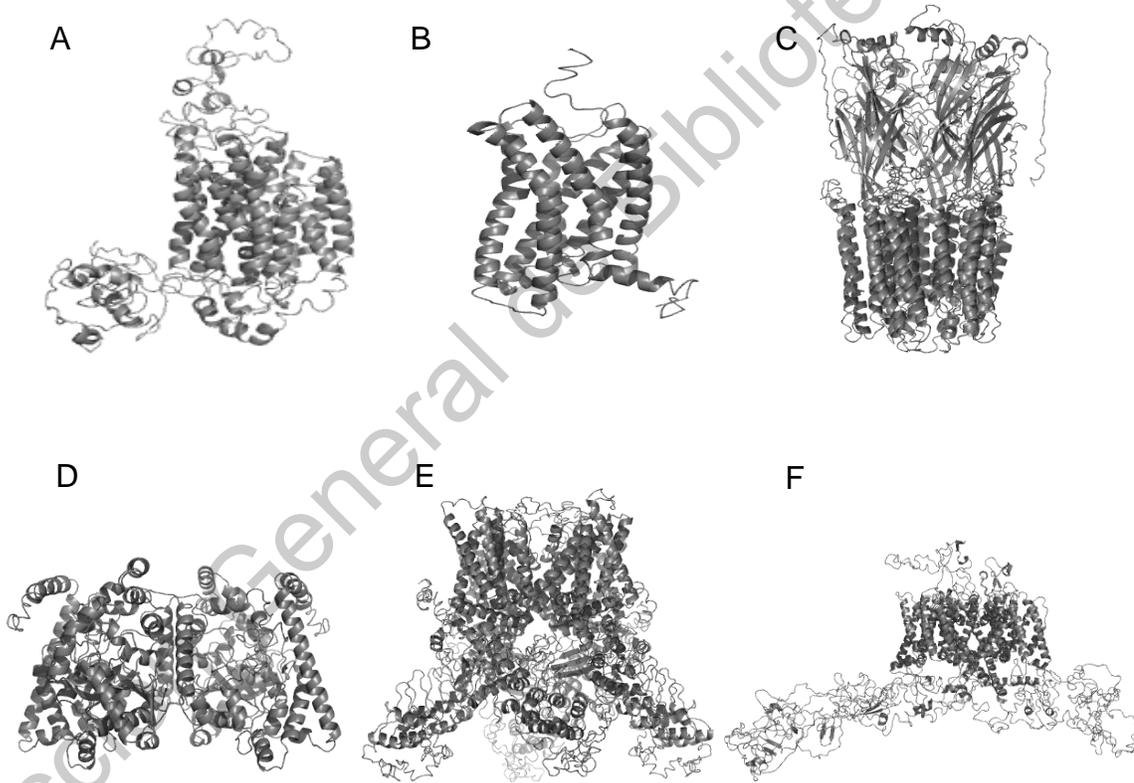


Figura 16. Modelos tridimensionales de las dianas biológicas seleccionadas: A) SV2A B) GPR55 C) Receptor de glicina $\alpha 1\beta$ D) FAAH E) TRPV1 F) CACNA1G

Tabla 7. Valores de calidad para los modelos construidos

Diana biológica	Subunidades o regiones	Plantilla (resolución, Å)	C-score (GMQE)	Z-score (QMEAN)	Aminoácidos favorecidos	
					Antes	Después
SV2A	-	4J05 (2.9)	-0.89	2.12	79.73%	89.64%
GPR55	-	4MBS (2.71)	0.60	4.36	85.80%	91.72%
Receptor de glicina $\alpha 1\beta$	Subunidad α	3JAD (3.9)	-0.63	4.62	67.18%	86.90%
	Subunidad β	4COF (2.97)	-2.39	4.94		
FAAH	-	2WJ2 (2.5)	0.39	5.87	84.40%	89.51%
TRPV1	Subunidad de TRPV1	3J5P (3.2)	-2.18	6.58	69.71%	87.41%
CACNA1G	1-80	5YFP (4.4)	-2.63	1.54	78.21%	85.42%
	81-1854	5GJW (3.9)	0.46	-7.23		
	1855-2377					

7.3. Dinámica molecular de los modelos tridimensionales

Para determinar la estabilidad de las dinámicas moleculares realizadas para cada modelo tridimensional se graficaron los valores de temperatura, presión, densidad, volumen, energía total y RMSD, los cuales se presentan en la Figura 17. Las simulaciones de un tiempo de 50 000 ps fueron suficientes para observar y determinar cambios conformacionales drásticos de cada diana biológica ya que los valores no presentaron gran variación a lo largo del tiempo de simulación.

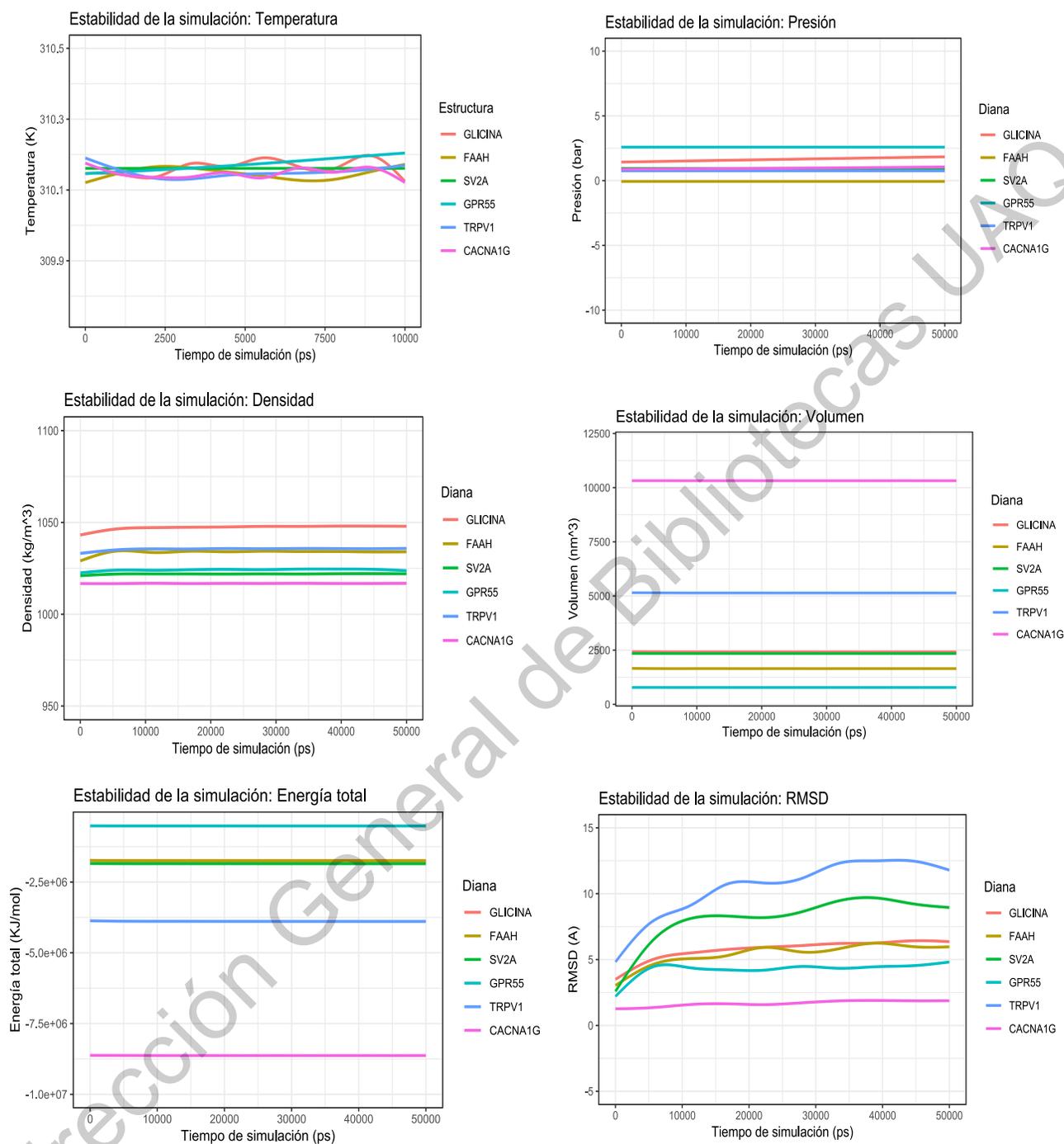


Figura 17. Valores de temperatura, presión, densidad, volumen, densidad, energía total, RMSD de las simulaciones de dinámica molecular de 50 ns

Para el valor de RMSD, la mayoría de los modelos parecen estabilizarse alrededor de los 10 ns, ya que se observa un incremento inicial seguido de una estabilización

antes y a los 10 ns de simulación; sin embargo, algunos modelos presentaron un mayor tiempo en el que se estabilizaron, como TRPV1 donde parece que se estabilizó alrededor de los 30 ns y presentó una mayor fluctuación de los valores de RMSD en todo el tiempo de simulación, por otra parte SV2A parece estabilizarse a los 10 ns pero presentó una mayor fluctuación a lo largo del tiempo de simulación.

7.3.1. Determinación de los clústeres más numerosos

Del análisis matricial de RMSD de la trayectoria de las dinámicas moleculares se obtuvieron los clústeres de las conformaciones presentadas en el tiempo de simulación, que se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Número de conformaciones para cada clúster de las dianas biológicas

Número de Clúster (Cut-off Å):	SV2A (0.5)	FAAH (0.3)	GPR55 (0.25)	Glicina $\alpha 1\beta$ (0.3)	TRPV1 (0.43)	Subunidad $\alpha 1G$ de Cav de tipo T (0.3)
1	3260	3768	2651	8276	3271	465
2	1430	535	1123	1608	1011	435
3	210	458	658	72	546	434
4	88	179	379	40	321	431
5	12	21	105	5	112	430
6	1	20	58	-	55	427
7	-	15	-	-	12	396
8	-	-	-	-	11	381
9	-	-	-	-	2	343
10	-	-	-	-	1	335

De la Tabla 8 se seleccionaron el clúster 1 y clúster 2 para cada diana biológica debido a que incluyeron el 80% o más del número de conformaciones; de cada clúster se determinaron las estructuras más representativas, las cuales se usaron para realizar los acoplamientos moleculares. Por otra parte, el número de clústeres obtenidos para cada simulación da una noción del grado de movimiento de los modelos construidos, por lo que un mayor número de clústeres como en las simulaciones de TRPV1 y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T demostraron un mayor grado de movimiento y por lo tanto un menor grado de estabilidad; por el contrario, a un menor número de clústeres como en las

simulaciones de SV2A, el receptor de glicina $\alpha 1\beta$, FAAH y GPR55 demostraron un menor grado de movimiento y por lo tanto una mayor estabilidad del modelo.

7.4. Acoplamiento moleculares (*dockings*)

Se realizaron acoplamiento moleculares del cannabidiol y un ligando endógeno o exógeno de cada diana biológica con una malla cúbica lo suficientemente grande para abarcar todo el espacio de las dianas biológicas (ciego), posteriormente se hizo un análisis de túneles y cavidades para localizar aquellos sitios de unión lo suficientemente grandes para albergar a cannabidiol. Adicionalmente, se llevaron a cabo acoplamiento moleculares enfocados a los sitios de unión de los ligandos endógenos o exógenos específicos para cada diana, esto con el propósito de comparar la afinidad e interacción del cannabidiol entre ambos acoplamiento moleculares.

7.4.1. SV2A

El ligando seleccionado para realizar los acoplamiento moleculares, además del cannabidiol con la proteína vesicular SV2A, fue el fármaco anticonvulsivo levetiracetam. Del análisis de cavidades se determinó evaluar al cannabidiol en el sitio de unión reportado para los racetams, ya que la región formada por los aminoácidos Phe667, Trp300, Tyr462, Lys694, Phe658, Val661, Gly303, Asn667, Ser294, Met301, Phe227, Cys297, Thr456, Ser665, Trp666, Asp670, y Leu689 (Correa-Basurto y col., 2015; Shi y col., 2011) se presentó como un sitio idóneo de acuerdo a los análisis de cavidades para albergar al cannabidiol debido al espacio que presenta, como se puede observar en la Figuras 18 A y B.

De los resultados presentados, en la Tabla 9, se observa que para el cannabidiol, la conformación de mínima energía obtenida del acoplamiento molecular ciego de la estructura representativa del clúster 1 fue la más favorable, la cual se sitúa en la parte citoplasmática de la proteína, como se puede observar en la Figura 19 A; por otro lado, los resultados de levetiracetam demostraron que el sitio de mayor afinidad fue el que constituye a los aminoácidos antes mencionados del sitio de unión a

racetams de la estructura representativa del clúster 1 localizado, en la parte transmembranal de la proteína, como se observa en la Figura 20 A.

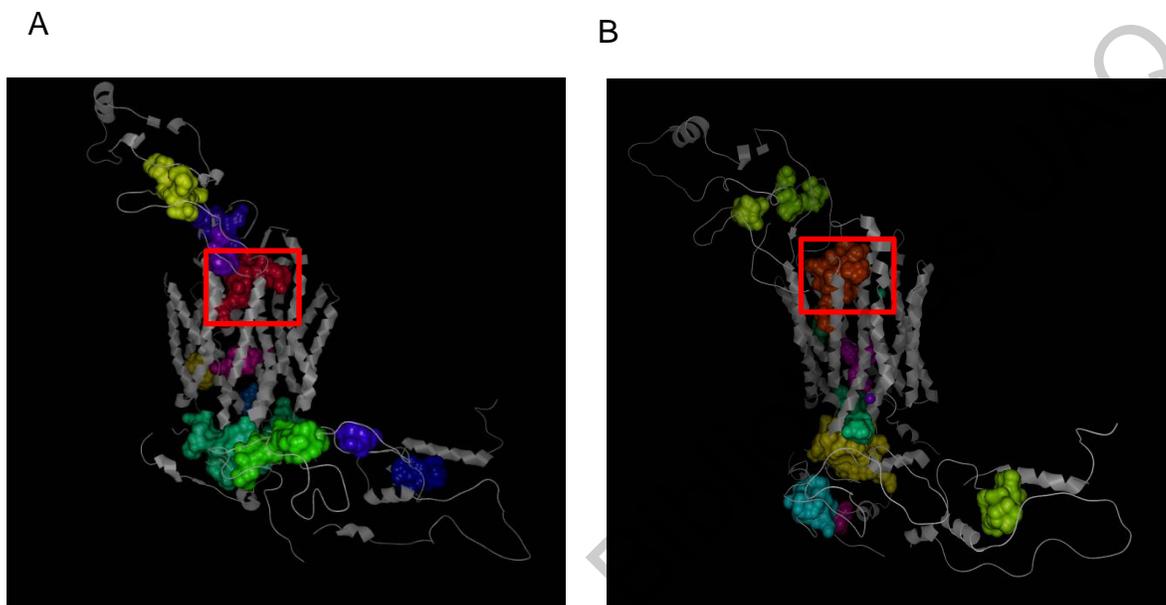


Figura 18. Cavidades más importantes encontradas en SV2A: A) Estructura representativa del cluster 1, B) Estructura representativa del cluster 2, El rectángulo rojo indica la región del sitio de unión a racetams

Tabla 9. Energías de unión de los acoplamiento moleculares de las estructuras representativas del cluster 1 y 2 de SV2A con CBD y LEV

Diana biológica	Acoplamiento moleculares ciegos (kcal/mol)		Acoplamiento moleculares dirigidos (kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
SV2A_1: CBD	-5.76	-4.78	-2.78	-2.78
SV2A_1: LEV	-4.35	-3.54	-5.48	-4.71
SV2A_2: CBD	-5.69	-5.69	-3.51	0.66
SV2A_2: LEV	-4.03	-4.03	-4.33	-4.33

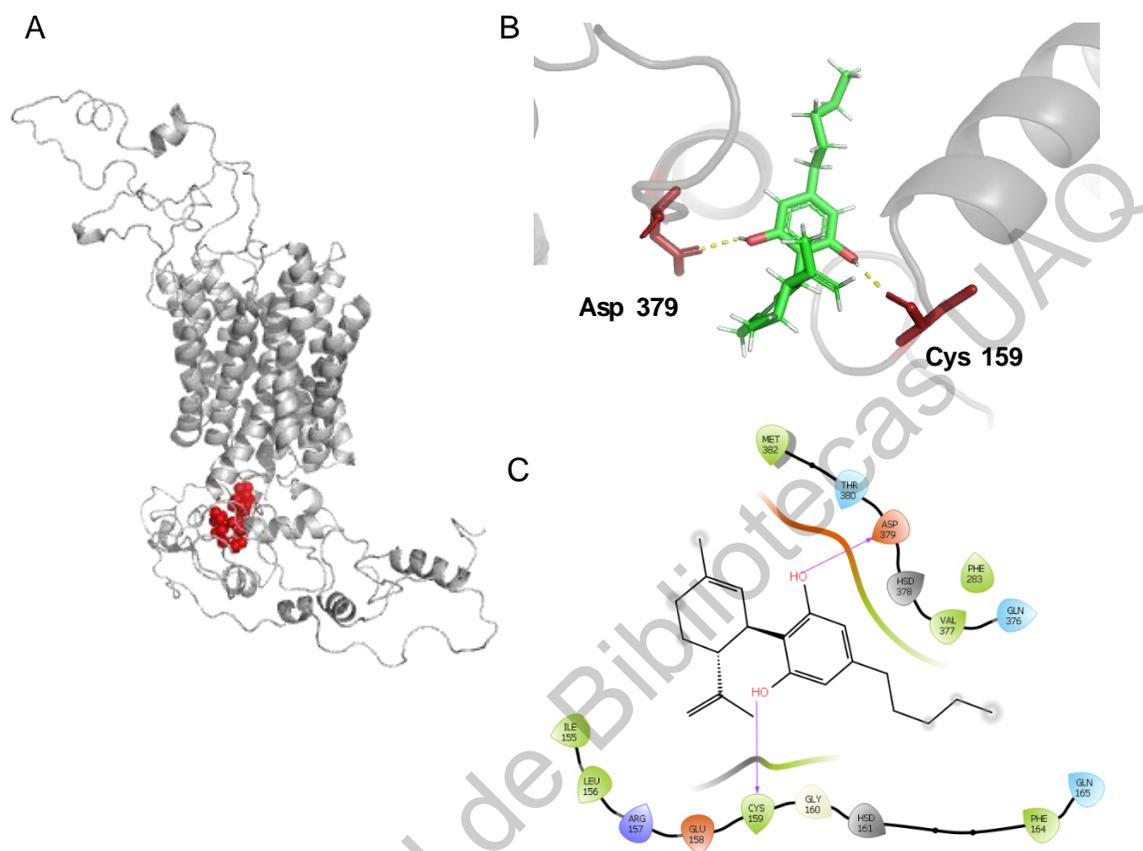


Figura 19. Sitio de unión de cannabidiol en la proteína SV2A: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la proteína SV2A, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión

Los aminoácidos que interactuaron por medio de puentes de hidrógeno con cannabidiol en el sitio de unión más afín fueron la Cys159 y la Asp379 como se observa en la Figura 19 B; ya que la naturaleza de varios de los aminoácidos que forman a este sitio como la Val377, Gly160, Met382, Ile155, Leu156 son de carácter hidrofóbico como se observa en la Figura 19 C, este ambiente ayuda a una mejor afinidad y al posicionamiento tridimensional del cannabidiol, debido a que es una molécula hidrofóbica. En contraste, el sitio de unión de los racetams no se presentó como un sitio de unión favorable para cannabidiol debido a que varios aminoácidos

como la Ser665, Asn690, Thr673 y Thr456 favorecen a un entorno polar que no ayuda a la afinidad del cannabidiol con ese sitio.

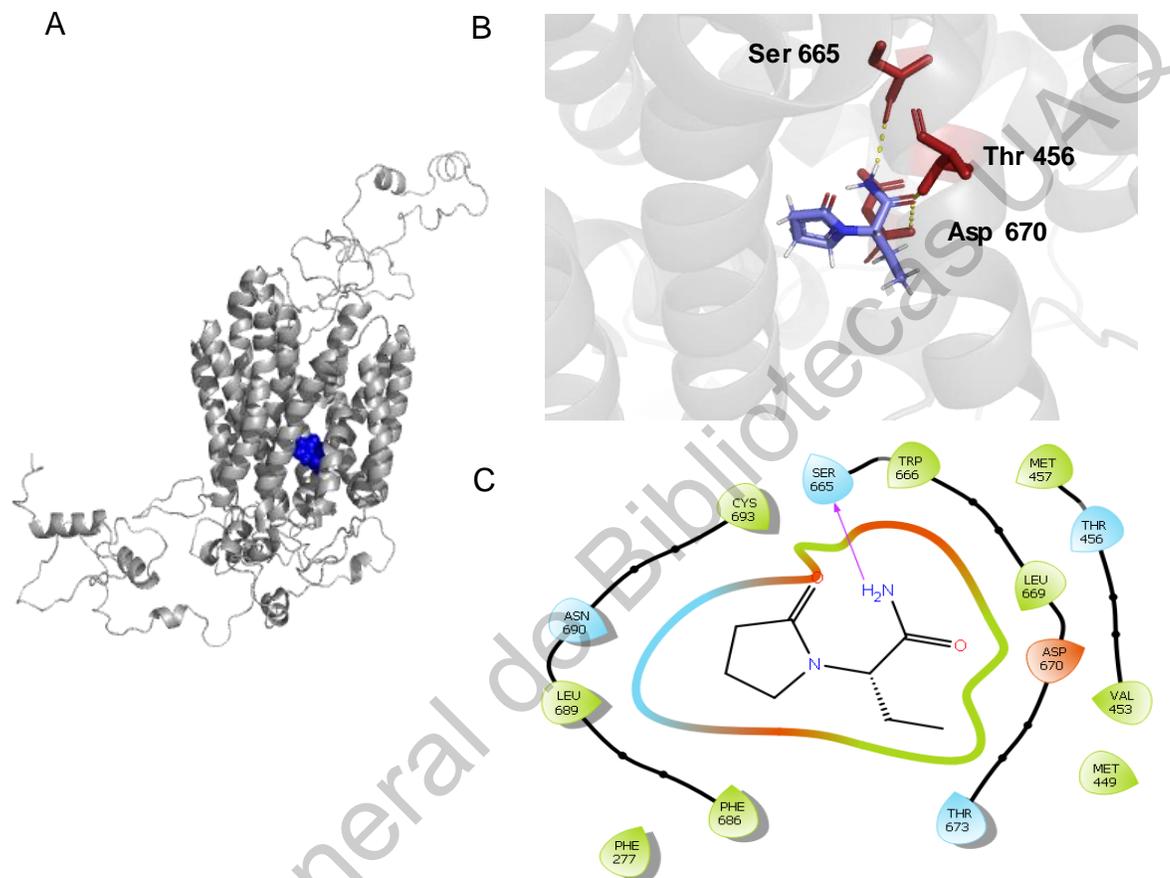


Figura 20. Sitio de unión de levetiracetam en la proteína SV2A: A) Posición del sitio de unión de levetiracetam en la proteína SV2A, B) Acomodo tridimensional e interacciones del levetiracetam en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del levetiracetam en el sitio de unión

Por otra parte, el sitio de unión de mayor afinidad para levetiracetam corresponde al sitio de unión propuesto para los racetams observado en la Figura 20 A, en donde interactuó por medio de puentes de hidrógeno con los aminoácidos Asp670, Thr456 y Ser665 como se observa en la Figura 20 B. Este sitio está conformado por varios aminoácidos polares como Asn690, Thr456, Ser665 y Thr673 que contribuyen a la afinidad y la producción de puentes de hidrógeno con levetiracetam observados en

la Figura 20 C, ya que esta molécula presenta varios donadores y aceptores de puentes de hidrógeno como los grupos amino y carbonilo.

De los resultados obtenidos de cannabidiol se observó que no coinciden con lo reportado experimentalmente, en donde cannabidiol se une con una alta afinidad al sitio de unión a racetams (Danish, 2017). Por otra parte, los resultados de levetiracem si concuerdan con lo reportado en donde este ligando interactuó con los mismos aminoácidos y con una afinidad similar con la proteína vesicular SV2A (Correa-Basurto y col., 2015).

7.4.2. FAAH

Para la enzima FAAH se eligió a la anandamida (AND) que es su ligando endógeno y a su sitio de unión en esta enzima para llevar a cabo los acoplamientos dirigidos, debido a que el análisis de cavidades situó a esta localización como una importante cavidad para un posible sitio de unión de cannabidiol como se puede observar en la Figura 21 A y B. Esta región está constituida en parte por tres aminoácidos fundamentales, los cuales son la Lys142 la Ser217 y la Ser241 que son responsables de llevar a cabo el mecanismo catabólico de las *N*-aciletanolamidas que consiste fundamentalmente en 4 pasos: 1) el ataque nucleofílico por parte de la Ser241 para generar un intermediario tetraédrico 2) la subsecuente eliminación del grupo saliente del sustrato para formar un intermediario acil-enzima 3) el ataque de una molécula de agua activada para crear un segundo intermediario tetraédrico y 4) liberación de ácido araquidónico y etanolamina con la regeneración de la enzima (Mileni y col., 2010). Este mecanismo se puede observar detalladamente en la Figura 21 C.

Los resultados demostraron que el sitio de unión de mayor afinidad para cannabidiol y anandamida fue el realizado en los acoplamientos moleculares dirigidos en el sitio de unión de la anandamida como se observa en la Figura 22 A y Figura 23 A, en donde las conformaciones de menor energía correspondientes a la estructura

representativa del clúster 1 presentadas en la Tabla 10 fueron las elegidas para su análisis.

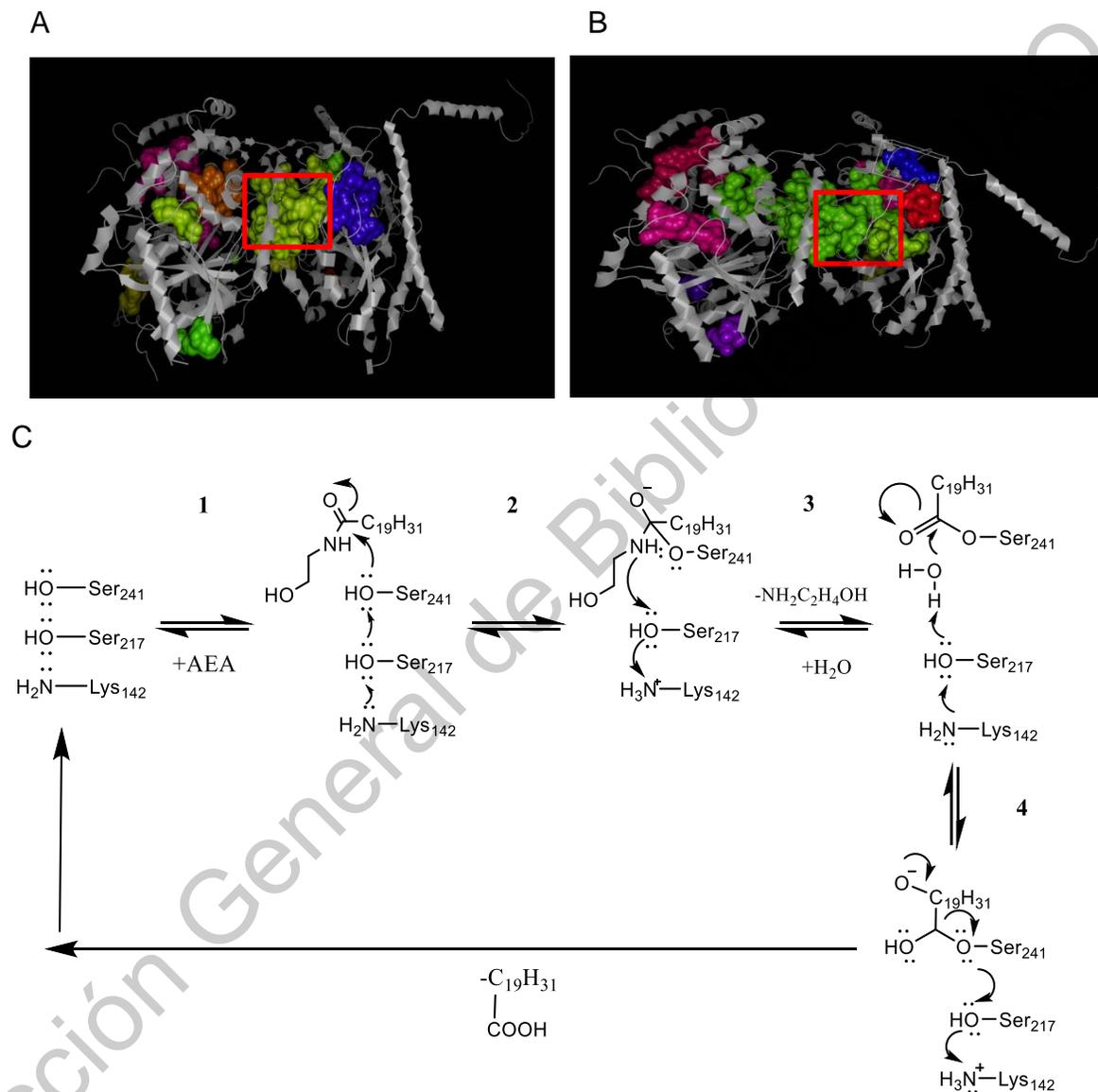


Figura 21. Cavidades más importantes encontradas en FAAH: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2, C) Mecanismo enzimático de la FAAH

Tabla 10. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de FAAH con CBD y AND

Diana biológica (Clúster 1 y 2)	Acoplamientos moleculares ciegos (kcal/mol)		Acoplamientos moleculares dirigidos (kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
	FAAH_1: CBD	-5.67	-5.67	-8.16
FAAH_1: AND	-2.21	-2.21	-7.23	-7.23
FAAH_2: CBD	-4.33	-4.33	20.66	22.86
FAAH_2: AND	-3.04	-3.04	16.13	16.13

Los aminoácidos que interactuaron con cannabidiol fueron la Gly272, Val276 y Leu278 de la cadena A por medio de puentes de hidrógeno; además, se observó que cannabidiol no pudo penetrar completamente al sitio catalítico, debido a que no se localizó cerca de la Ser241, responsable del ataque nucleofílico hacia la anandamida como se observa en la Figura 22 B. Este sitio de unión presenta un ambiente de poca polaridad, debido a la presencia de varios aminoácidos no polares o que presentan poca polaridad como la Val270, Cys269, Val276, Leu266 y Leu278 como se puede observar en la Figura 22 C, por lo que esta característica ayuda a la afinidad y al acomodo tridimensional del cannadibiol debido a que es una molécula hidrofóbica.

Por otra parte, la anandamida interactuó con la Gly265 y Leu266 de la cadena A en forma de puentes de hidrógeno; a diferencia de cannabidiol se observó que la anandamida pudo penetrar más hacia el sitio catalítico debido a que se localizó a una mayor cercanía con la Ser 241 como se puede observar en la Figura 23 B, además este ligando presenta una naturaleza de baja polaridad, por lo que su sitio de unión ayuda a la afinidad y acomodo tridimensional debido a que el ambiente de esta región es de poca polaridad debido a los aminoácidos que lo conforman y que se presentan en la Figura 23 C.

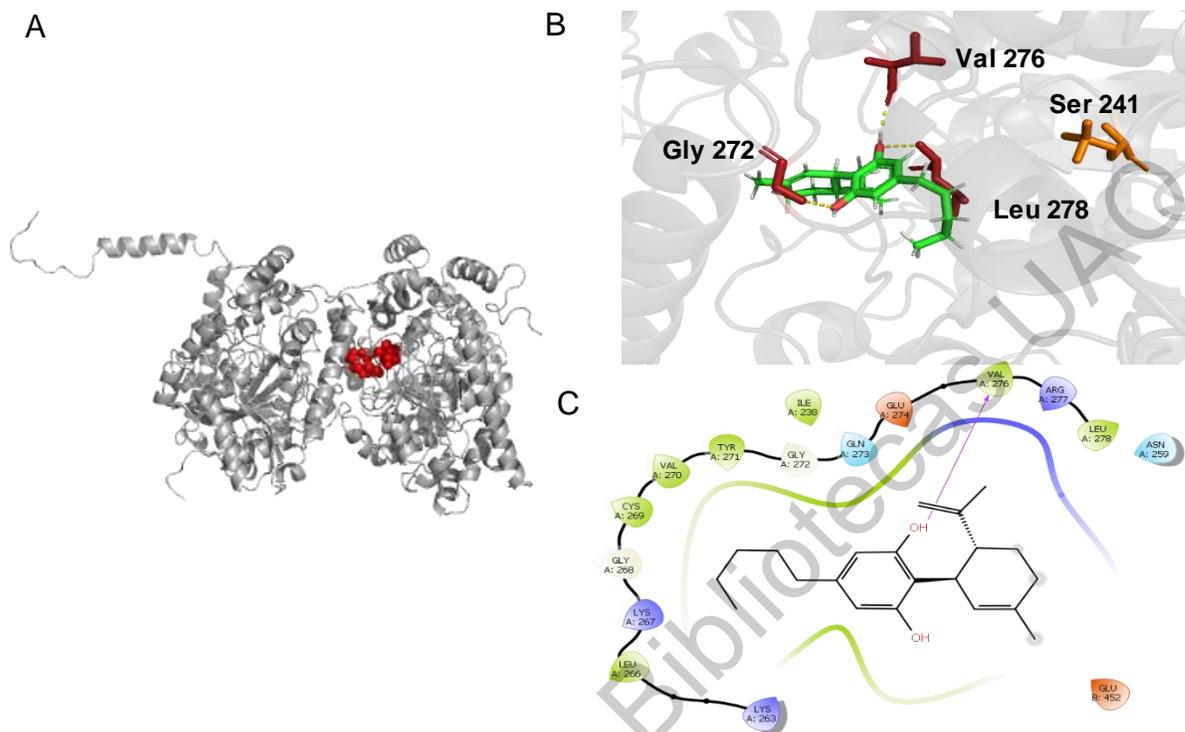


Figura 22. Sitio de unión de cannabidiol en la enzima FAAH: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la proteína FAAH, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión

Estos resultados coinciden con otros trabajos *in silico*, donde el cannabidiol no puede penetrar lo suficiente hacia el sitio catalítico de FAAH humano a diferencia de FAAH de rata, con una mayor penetración por parte de cannabidiol hacia este sitio. La diferencia radica en que FAAH humano posee dos aminoácidos, la Phe192 y Met495 en la entrada al canal del sitio catalítico que en FAAH de rata no están presentes, los cuales impiden la entrada de cannabidiol hacia este sitio. Esta situación no se presenta en la anandamida, ya que es el sustrato natural de esta enzima y en FAAH humano como en FAAH de rata puede penetrar al sitio catalítico y acercarse lo suficiente hacia la Ser241 para que se lleve a cabo el mecanismo catabólico (Elmes y col., 2015).

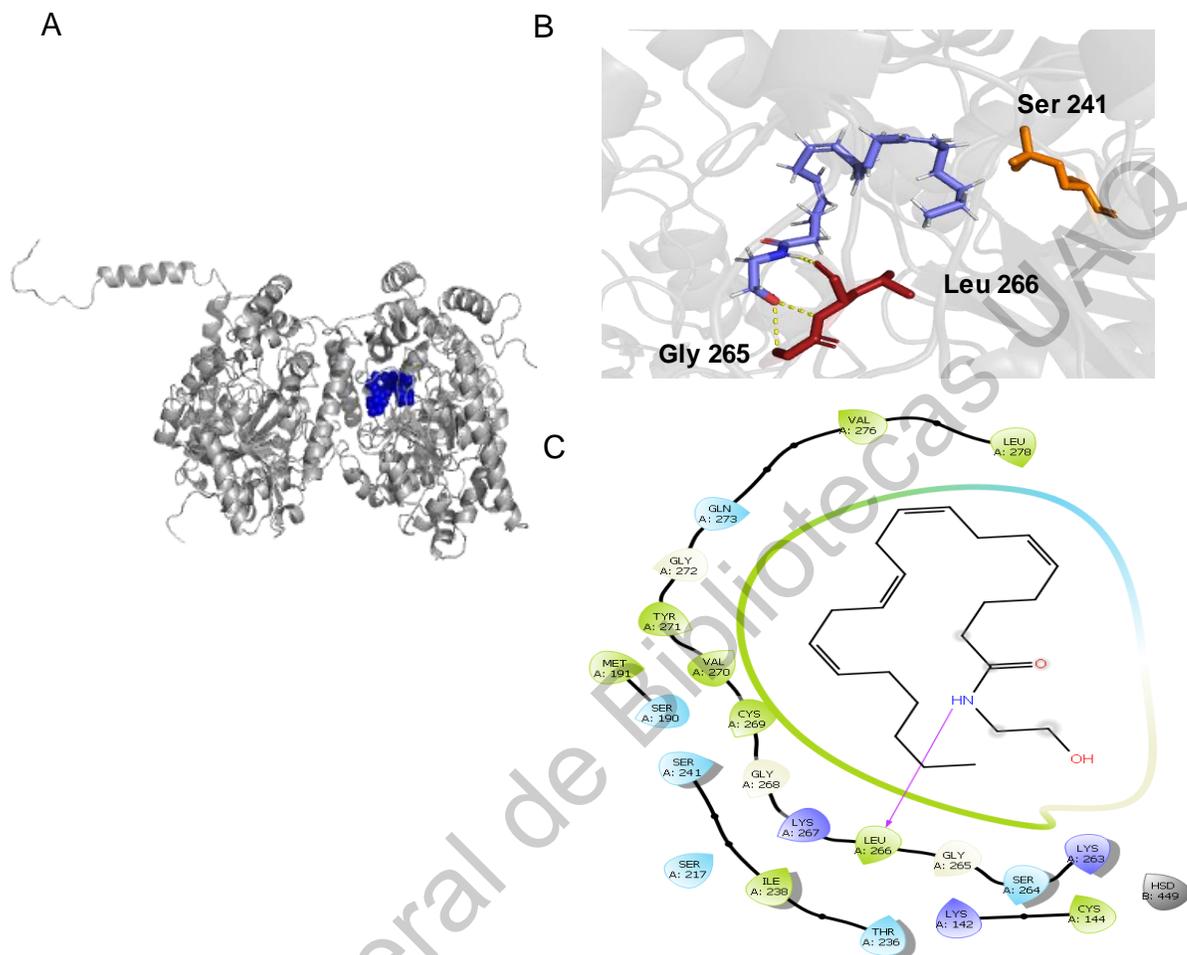


Figura 23. Sitio de unión de la anandamida en la enzima FAAH: A) Posición del sitio de unión de la anandamida en la proteína FAAH, B) Acomodo tridimensional e interacciones de la anandamida en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de la anandamida en el sitio de unión

7.4.3. GPR55

Se realizaron los acoplamientos moleculares ciegos y dirigidos con cannabidiol y rimonabant, el cual es un antagonista de este receptor. El análisis de cavidades mostró que el sitio de unión de los antagonistas competitivos reportado para este receptor, el cual está conformado por los aminoácidos Lys80, Tyr101, Phe182, His170, Gln249, Ser273, Phe276 presentado en las Figuras 24 A y B (Kotsikorou y

col., 2013); éste es un buen sitio para evaluar debido al tamaño de esta cavidad, por lo que se eligió para llevar a cabo los acoplamientos dirigidos.

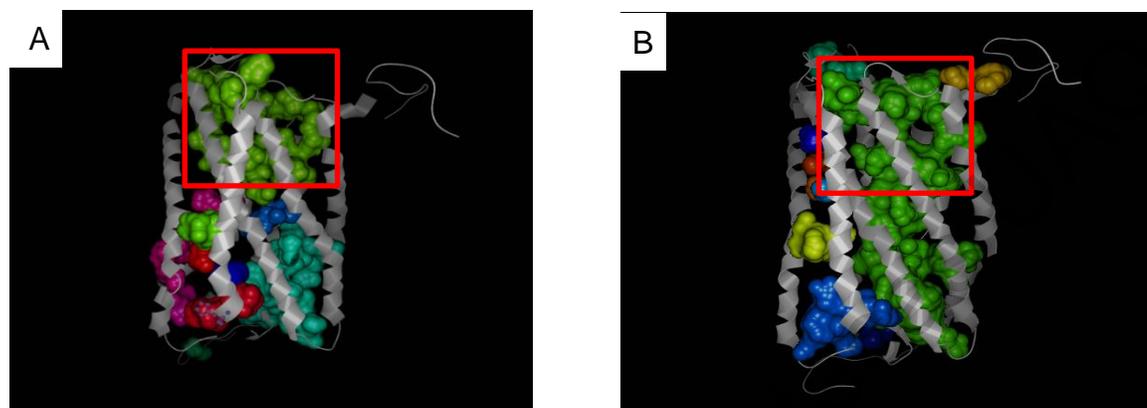


Figura 24. Cavidades más importantes encontradas en GPR55: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2

Las energías de unión de los acoplamientos moleculares realizados demostraron que el sitio más favorable para el cannabidiol y rimonabant fue el reportado para el sitio de unión de antagonistas para este receptor, en donde las conformaciones de mínima energía de la estructura representativa de GPR55 del clúster 1 para cannabidiol y rimonabant fueron las más favorables, como se observa en la Tabla 11, las cuales se situaron en la parte transmembranal de este receptor como se observa en las Figuras 25 A y 26 A.

Tabla 11. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de GPR55 con CBD y RBT

Diana biológica (Clúster 1 y 2)	Acoplamientos moleculares ciegos (kcal/mol)		Acoplamientos moleculares dirigidos (kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
GPR55_1: CBD	-5.23	-5.23	-6.95	-6.43
GPR55_1: RBT	-6.24	-5.84	-10.30	-9.83
GPR55_2: CBD	-5.23	-5.23	-5.92	-7.92
GPR55_2: RBT	-7.13	-5.48	-9.6	-8.18

Los aminoácidos que interactuaron con el cannabidiol en forma de puente de hidrógeno fueron la Glu186 y la Ser178 como se observa en la Figura 25 B. Por otra parte, este sitio de unión está conformado por varios aminoácidos no polares o de poca polaridad como se puede observar en la Figura 25 C por lo que este ambiente hidrofóbico ayuda a la unión del cannabidiol y a su acomodo tridimensional.

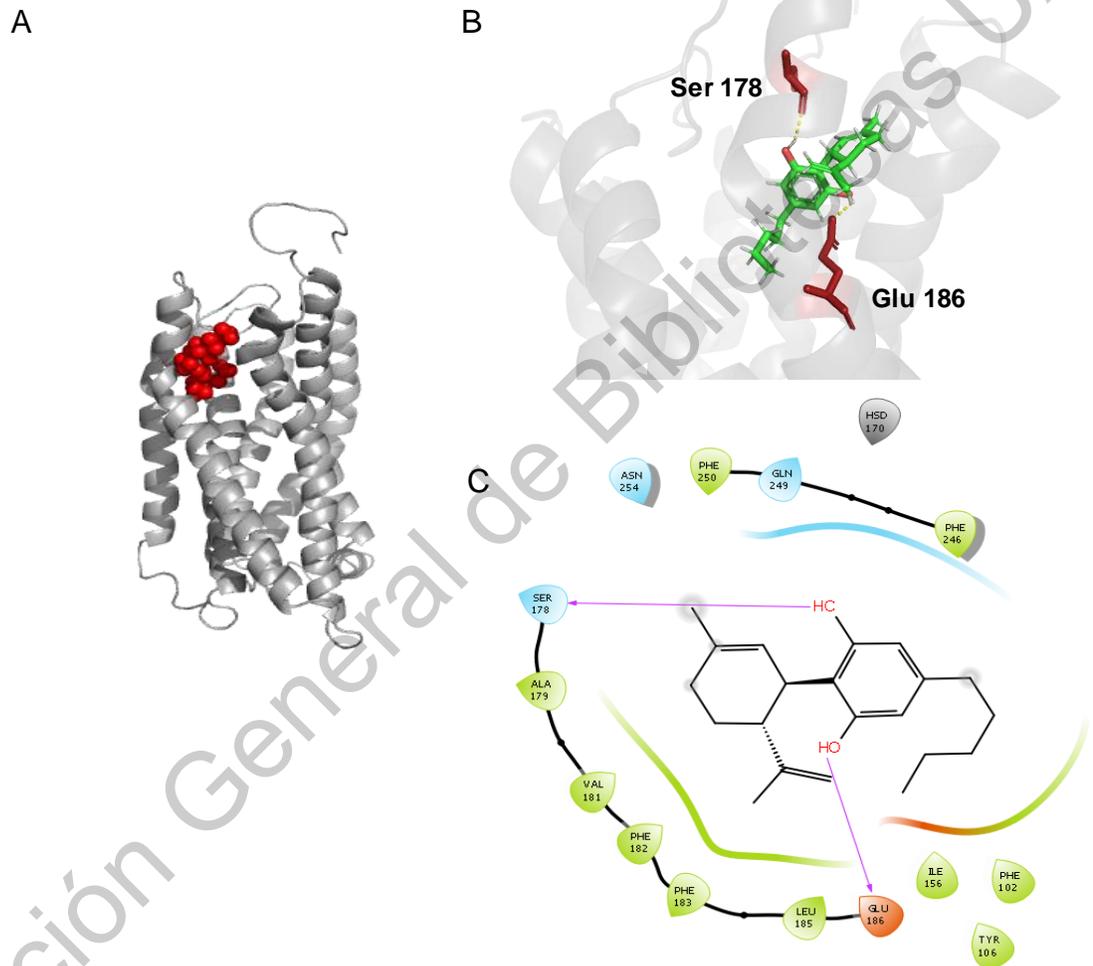


Figura 25. Sitio de unión del cannabidiol en el receptor GPR55: A) Posición del sitio de unión del cannabidiol en receptor GPR55, B) Acomodo tridimensional e interacciones del cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción del cannabidiol en el sitio de unión

El antagonista rimonabant presentó una interacción aromática de tipo π - π con la Phe246 y con la His170 en forma de puente de hidrógeno como se observa en la Figuras 26 B y C, al igual que cannabidiol, esta molécula es hidrofóbica por lo que este sitio de unión es favorable debido a que presenta un ambiente poco polar por los aminoácidos que lo conforman, como se observa en la Figura 26 C.

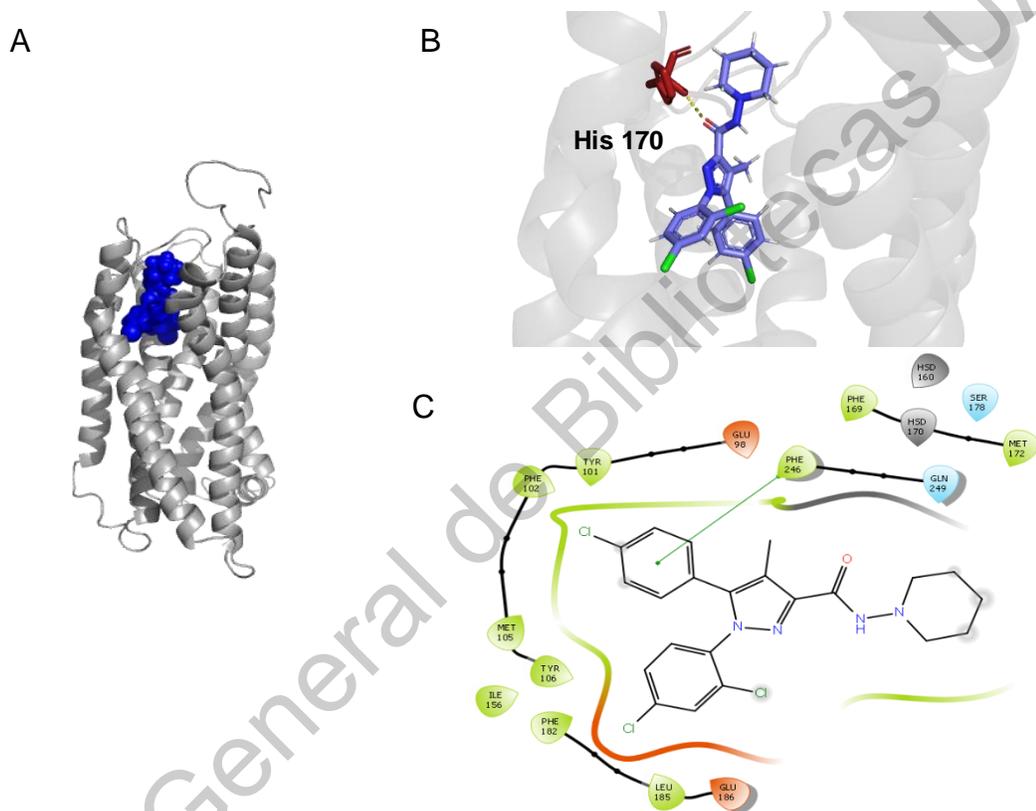


Figura 26. Sitio de unión de rimonabant en el receptor GPR55: A) Posición del sitio de unión de rimonabant en el receptor GPR55, B) Acomodo tridimensional e interacciones de rimonabant en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de rimonabant en el sitio de unión

De acuerdo con lo reportado, el cannabidiol funciona como un antagonista de este receptor (Ryberg y col., 2007). Los resultados del acoplamiento molecular coinciden con la localización del sitio de unión de antagonistas debido a que presentó los valores más favorables; por otra parte, hay dos diferencias significativas en los

resultados de cannabidiol y rimonabant: por una parte, el acomodo tridimensional, en donde cannabidiol se situó de manera horizontal penetrando más hacia el interior del canal de la proteína, mientras que el rimonabant se localizó de manera vertical penetrando menos hacia el interior de la proteína, la segunda diferencia radica en la interacción que se presentó con la Phe246 en el caso de rimonabant y que está ausente en las interacciones de cannabidiol con GPR55. Tanto el acomodo tridimensional como la interacción con la Phe246 son características propias de los antagonistas específicos como el rimonabant. Por otra parte, la ausencia de estas características en cannabidiol sugieren que esta molécula actúa como un antagonista no específico (Shore y col., 2015).

7.4.4. TRPV1

En los acoplamientos moleculares realizados para TRPV1 se evaluó a la capsaicina el cual es un activador de este receptor. Del análisis de cavidades se obtuvo el sitio de unión de capsaicina determinado por los aminoácidos Tyr511, Met547, Thr550, Glu570, Leu669 (Darre y col., 2015), como una región interesante para evaluar al cannabidiol como se puede observar en la Figura 27 A y B.

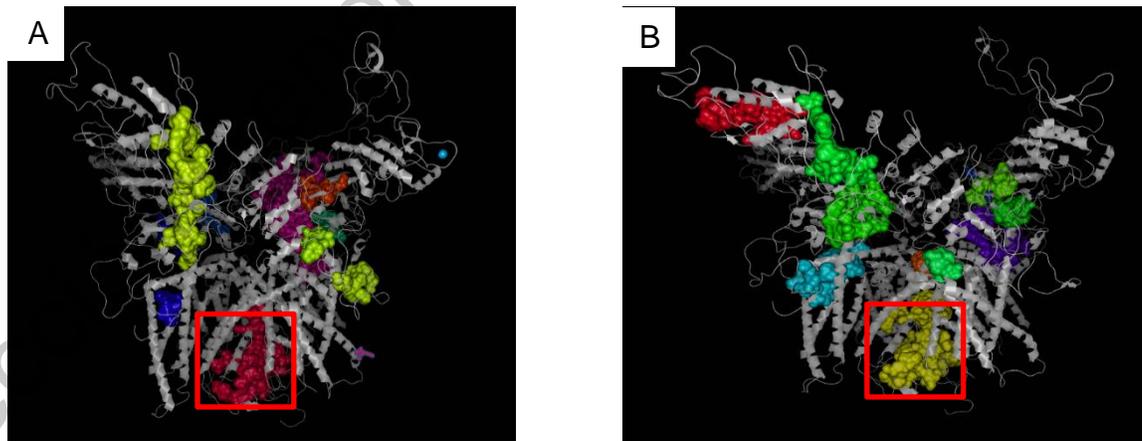


Figura 27. Cavidades más importantes encontradas en TRPV1: A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2

Los resultados de energía de unión demostraron que las conformaciones de mínima energía de cannabidiol y capsaicina de los acoplamientos moleculares dirigidos correspondientes a la estructura representativa del clúster 1 de TRPV1 fueron las más favorables como se observa en la Tabla 12. Además, estas conformaciones se localizaron en el sitio de unión a capsaicina localizado en cualquier interfaz de las cadenas de TRPV1, como se puede observar en las Figuras 28 A y 29 A. Por otro lado, las conformaciones de mínima energía de los acoplamientos moleculares ciegos y dirigidos de cannabidiol coincidieron en el mismo sitio, lo que aumenta más la probabilidad de la unión de cannabidiol a ese sitio.

Tabla 12. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del cluster 1 y 2 de TRPV1 con CBD y CAP

Diana biológica (Clúster 1 y 2)	Acoplamientos moleculares ciegos (kcal/mol)		Acoplamientos moleculares dirigidos (kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
	TRPV1_1: CBD	-5.58	-5.58	-5.84
TRPV1_1: CAP	-5.16	-5.16	-5.93	-5.93
TRPV1_2: CBD	-5.68	-5.68	-4.64	-4.54
TRPV1_2: CAP	-4.76	-4.76	-4.25	-4.25

El cannabidiol interactuó con la Tyr511 en forma de puente de hidrógeno, como se observa en la Figura 28 B. Este sitio de unión está conformado por varios aminoácidos no polares como la Leu518, Leu515, Val508, Ile573, Leu547 además de otros como se observa en la Figura 28 C, que ayudan a la afinidad de cannabidiol por ese sitio de unión.

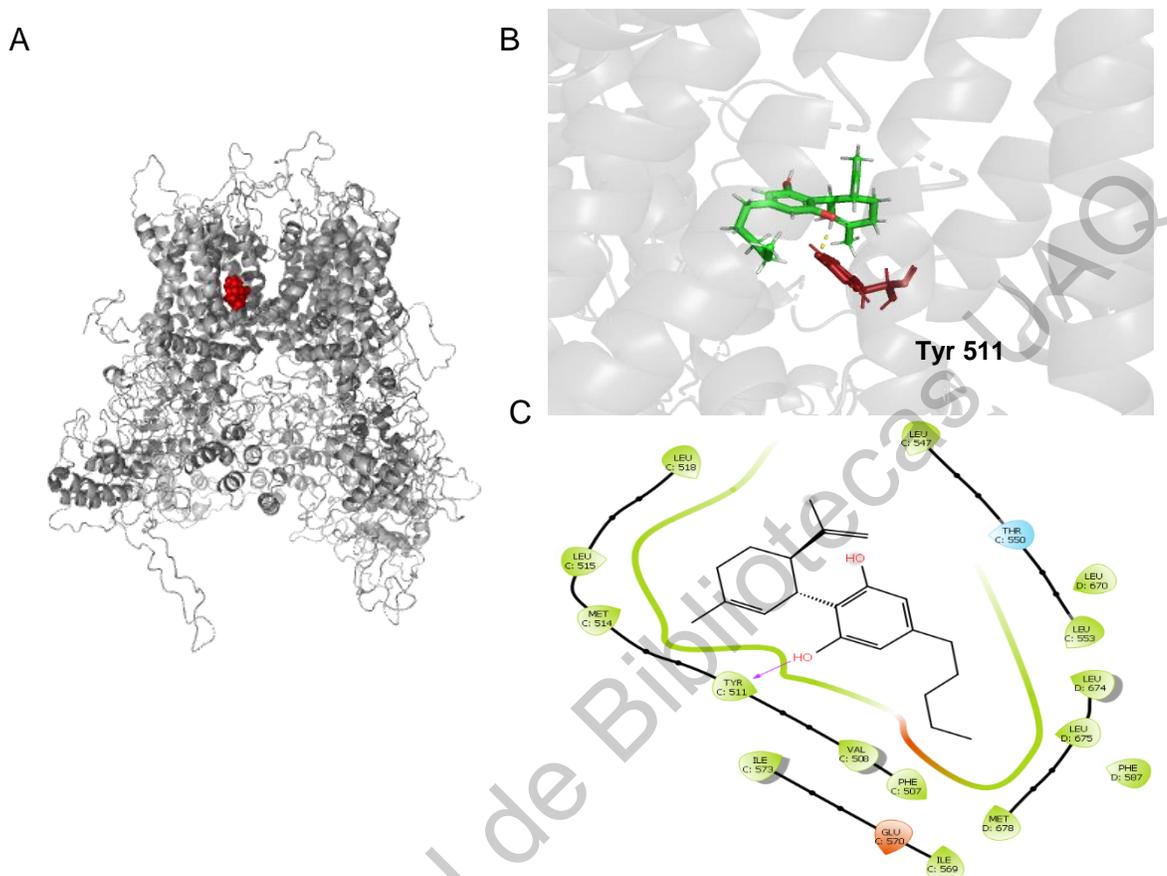


Figura 28. Sitio de unión de cannabidiol en el receptor TRPV1: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en el receptor TRPV1, B) Acomodo tridimensional e interacciones de cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de cannabidiol en el sitio de unión

La capsaicina interactuó con la Phe507 como se observa en la Figura 29 B y, al igual que en el caso del cannabidiol, los aminoácidos que conforman al sitio de unión son poco polares o no polares que ayudan a la afinidad y al acomodo tridimensional de la capsaicina como se puede observar en la Figura 29 C.

Los resultados antes presentados mostraron que, como el cannabidiol y la capsaicina son moléculas hidrofóbicas, el sitio de unión de la capsaicina fue favorable debido al ambiente poco polar que presenta este sitio; por otra parte, solo el cannabidiol mostró una interacción con la Tyr511 que es de gran importancia para

la sensibilidad y afinidad de los agonistas de TRPV1 (Hanson y col., 2015), lo cual podría ser un indicio de una posible actividad como un agonista; sin embargo esta situación no se presentó en la capsaicina que al ser un agonista identificado de este receptor se debería presentar; esta situación podría deberse a que la conformación de menor de energía de los acoplamiento molecular no fue la más favorable para producir esta interacción.

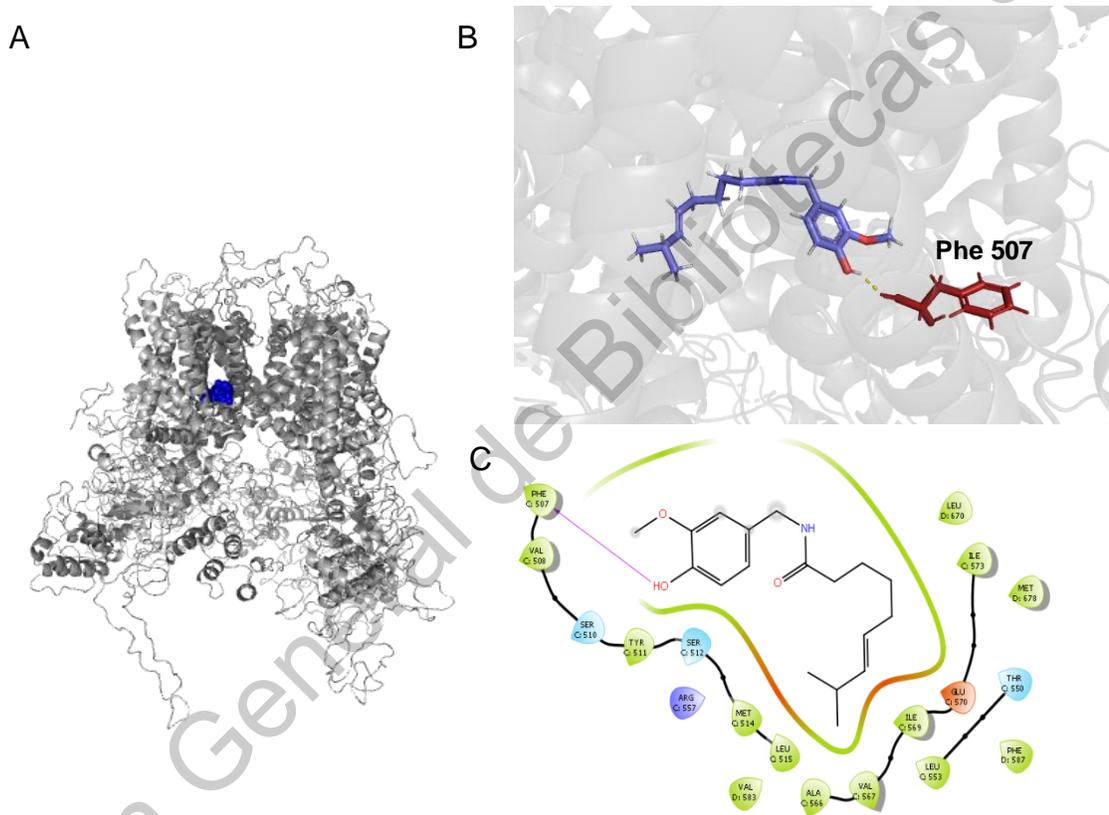


Figura 29. Sitio de unión de capsaicina en el receptor TRPV1: A) Posición del sitio de unión de capsaicina en el receptor TRPV1, B) Acomodo tridimensional e interacciones de capsaicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de capsaicina en el sitio de unión

7.4.5. Receptor de glicina $\alpha 1\beta$

Para el receptor de glicina $\alpha 1\beta$ se decidió probar a su ligando endógeno, la glicina; para los acoplamientos dirigidos se evaluó a la interfaz entre las cadenas $\alpha 1\beta$ ya que se ha reportado previamente que ese es el sitio de unión de glicina (Grudzinska y col., 2005). Por otra parte, el análisis de cavidades demostró que esta región es ideal debido a su tamaño para la unión de ligandos como se puede observar en la Figuras 30 A y B.

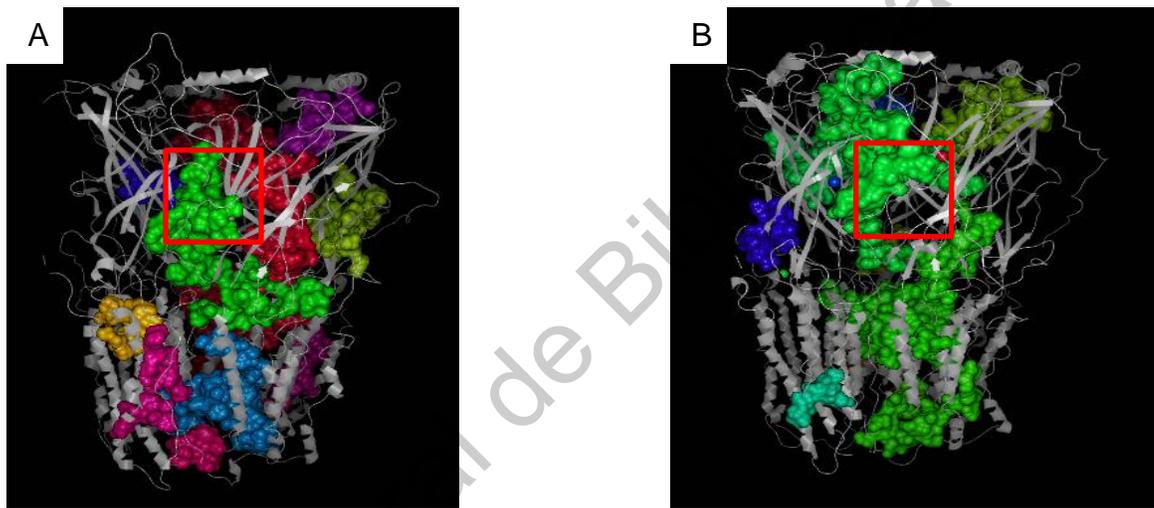


Figura 30. Cavidades más importantes encontradas en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$:
A) Estructura representativa del clúster 1, B) Estructura representativa del clúster 2

Las conformaciones más favorables, en cuanto a energía de unión, fueron la conformación de mínima energía de la estructura representativa del clúster 1 para cannabidiol y la conformación de mínima energía de la estructura representativa del clúster 2 para la glicina, como se puede observar en la Tabla 13, y que se sitúan en la interfaz de la cadena $\alpha 1$ y β , como se puede observar en las Figuras 31 A y 32 A. Cabe destacar que la mejor afinidad por parte de glicina hacia la estructura del clúster 2 y no hacia el clúster 1, esto puede deberse al acomodo de la región de aminoácidos 245-255, la cual se encuentra más cercana a glicina en la estructura representativa del clúster 2 que en la estructura representativa del clúster 1.

Tabla 13. Energías de unión de los acoplamientos moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 del receptor de glicina $\alpha 1\beta$ con CBD y GLY

Diana biológica (Clúster 1 y 2)	Acoplamientos moleculares ciegos (Kcal/mol)		Acoplamientos moleculares dirigidos (Kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
	Glicina_1: CBD	-5.96	-5.96	-5.98
Glicina_1: GLY	-3.11	-2.93	-3.39	-3.29
Glicina_2: CBD	-5.71	-5.71	-5.81	-5.81
Glicina_2: GLY	-3.76	-3.76	-3.68	-2.84

El cannabidiol interactuó con el aminoácido His229, Asp219 y Val221 de la cadena α en forma de puente de hidrógeno como se puede observar en la Figura 31 B, este sitio de unión favorece la afinidad de cannabidiol, debido a que se presentan varios aminoácidos de poca polaridad como la Leu223B, Val221B, Pro220B como se puede observar en la Figura 31 C.

La glicina interactuó en forma de enlace iónico con la Glu202 y la Lys248 e interactuó en forma de puente de hidrógeno con la Lys248 con la Cys243 y la Tyr253 como se puede observar en la Figura 32 B, al parecer este sitio de unión favorece la afinidad de glicina debido a que está conformado por los aminoácidos Lys248 y Glu202 los cuales están cargados negativamente y positivamente, lo que favorece la producción de enlaces iónicos con el ion carboxilato y el grupo amino cargado positivamente de la glicina como se puede observar en la Figura 32 C.

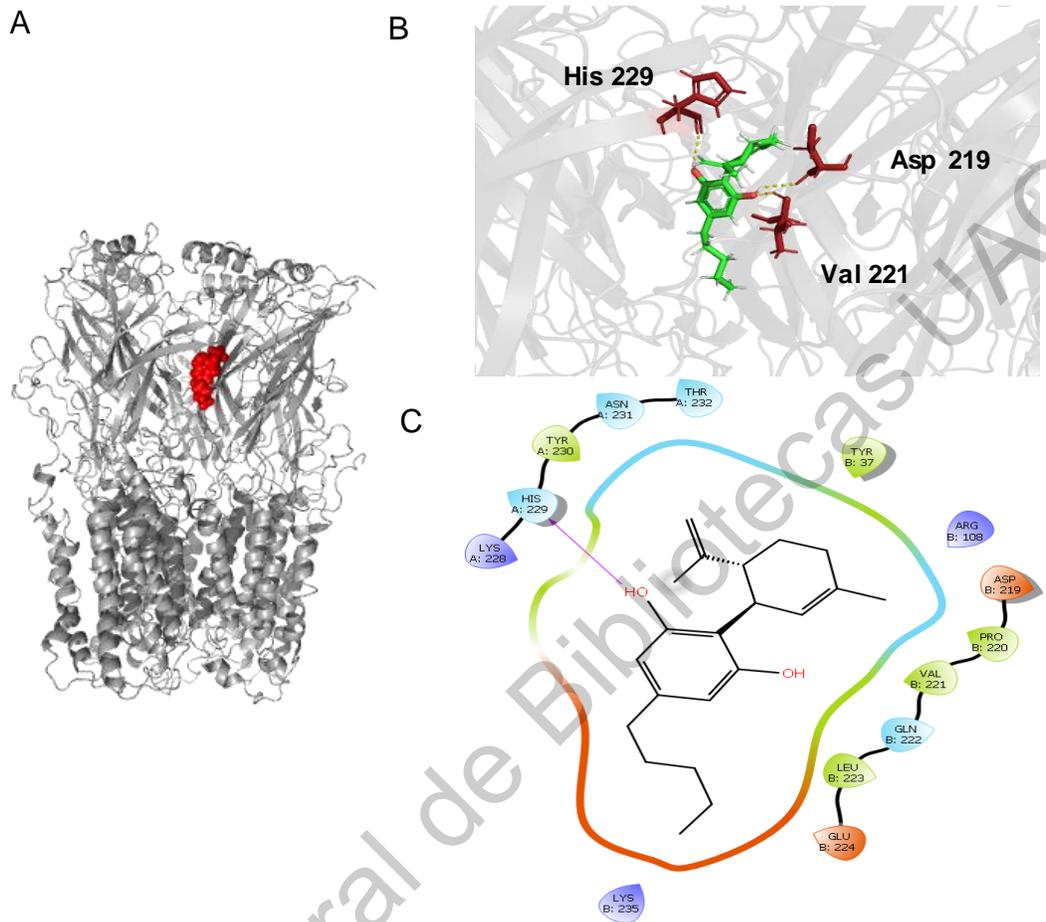


Figura 31. Sitio de unión de cannabidiol en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$, B) Acomodo tridimensional e interacciones de cannabidiol en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de cannabidiol en el sitio de unión

Estos resultados demuestran que el cannabidiol y la glicina se situaron en un sitio similar, aunque no en la posición exacta, ya que las interfaces de las cadenas $\alpha 1$ y β son de un gran tamaño por lo que la localización puede variar, esto también se puede observar en las interacciones de ambos ligandos, ya que los aminoácidos con los que interactuaron no tuvieron alguna similitud.

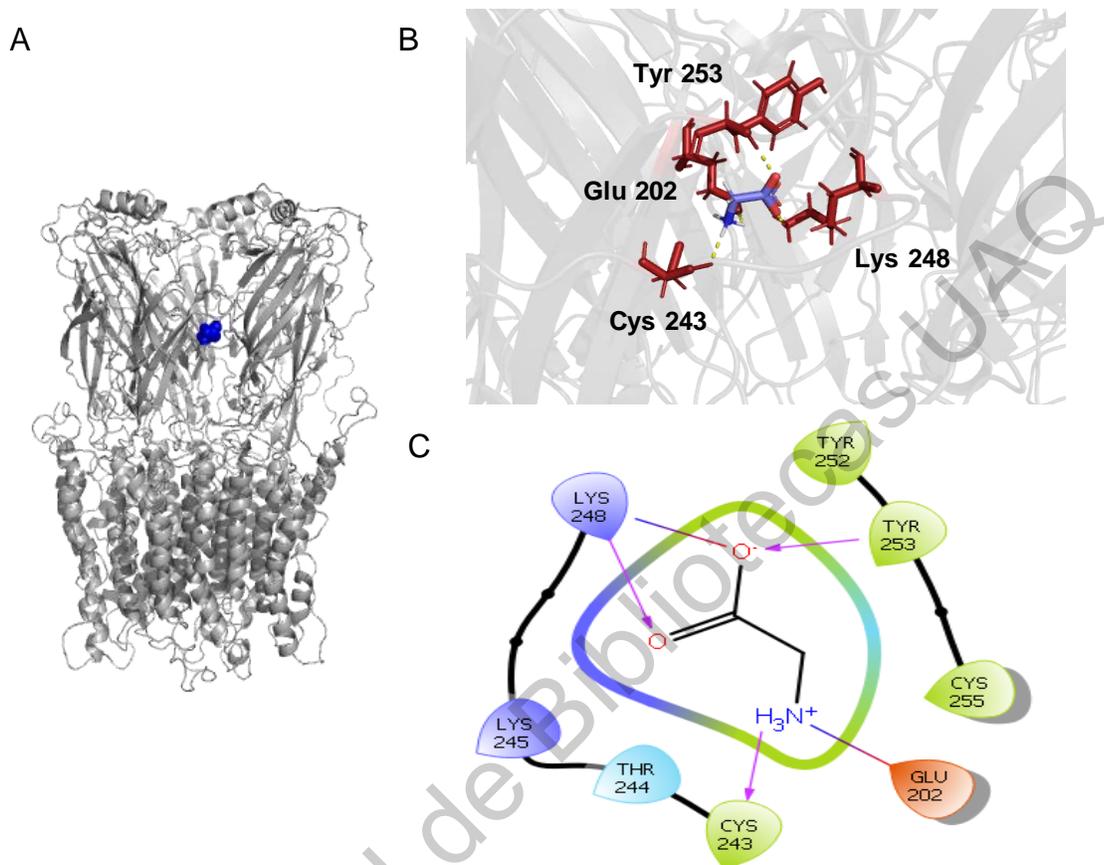


Figura 32. Sitio de unión de glicina en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$: A) Posición del sitio de unión de glicina en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión

7.4.6. Subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T

Para los acoplamiento molecular de la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, se evaluó a la etosuximida, el cual es un fármaco anticonvulsivo que su principal blanco es este canal (Todorovic y col., 2011); sin embargo, se desconoce el sitio de unión de este ligando por lo que se decidió en este caso realizar un acoplamiento molecular ciego, para localizar a aquel sitio que fuera más favorable para la afinidad de ambos ligandos, para posteriormente realizar un acoplamiento molecular dirigido hacia esa zona.

Como se puede observar en la Tabla 14, las conformaciones de mínima energía de cannabidiol y etosuximida, que se localizaron en la superficie del tercer dominio transmembranal de la estructura representativa del clúster 2, las cuales se observan en las Figuras 33 A y 34 A fueron las más afines y más favorables.

Tabla 14. Energías de unión de los acoplamiento moleculares de las estructuras representativas del clúster 1 y 2 de la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje

Diana Biológica (Clúster 1 y 2)	Acoplamiento moleculares ciegos (kcal/mol)		Acoplamiento moleculares dirigidos (kcal/mol)	
	Mínima energía	Clúster más numeroso	Mínima energía	Clúster más numeroso
	CACNA1G_1: CBD	-5.04	-5.04	-7.79
CACNA1G_1: ETO	-2.99	-2.79	-4.12	-3.80
CACNA1G_2: CBD	-6.50	-4.88	-7.89	-7.75
CACNA1G_2: ETO	-3.41	-3.41	-4.42	-4.42

El cannabidiol, localizado en la superficie del tercer dominio transmembranal, interactuó con la Arg1390, Leu1239, Leu1386 mediante puentes de hidrógeno, como se observa en la Figura 33 B. Al parecer, la afinidad de cannabidiol por este sitio de unión se debe a la presencia de aminoácidos no polares como Leu1386 Leu1389, Val1348 que favorecen al acomodo tridimensional del cannabidiol observado en la Figura 33 C.

Por otro lado, la etosuximida que también se localizó en la superficie del tercer dominio intramembranal, interactuando con la Arg1387 y Arg1390 como se observa en la Figura 34 B; la presencia de estos dos aminoácidos favorece la afinidad y el acomodo tridimensional de la etosuximida en el sitio de unión, debido a su capacidad de producir puentes de hidrógeno como se observa en la Figura 34 C.

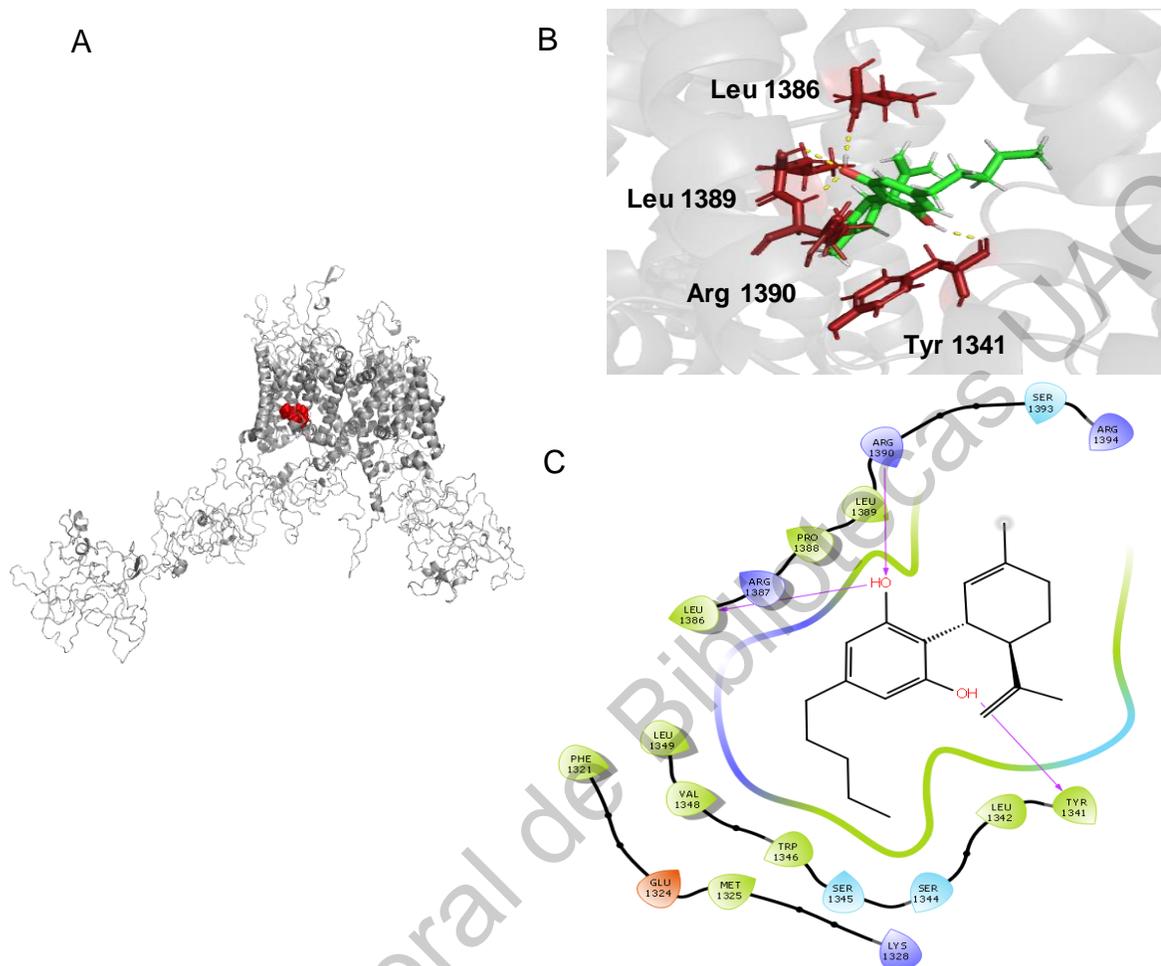


Figura 33. Sitio de unión de cannabidiol en la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T: A) Posición del sitio de unión de cannabidiol en la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión

De estos resultados obtenidos, cabe señalar que cannabidiol presentó una afinidad mayor a la etosuximida y que el sitio de unión más favorable para la unión fuera el mismo, además de que se presentara en común la interacción por medio de puente de hidrógeno con la Arg1390. Toda esta información puede estar correlacionada con la información experimental, en donde cannabidiol y la etosuximida presentan la misma actividad biológica como antagonistas de este canal. Por otra parte, la

presencia de aminoácidos no polares en este sitio de unión parece ser la clave para la afinidad de cannabidiol por este sitio.

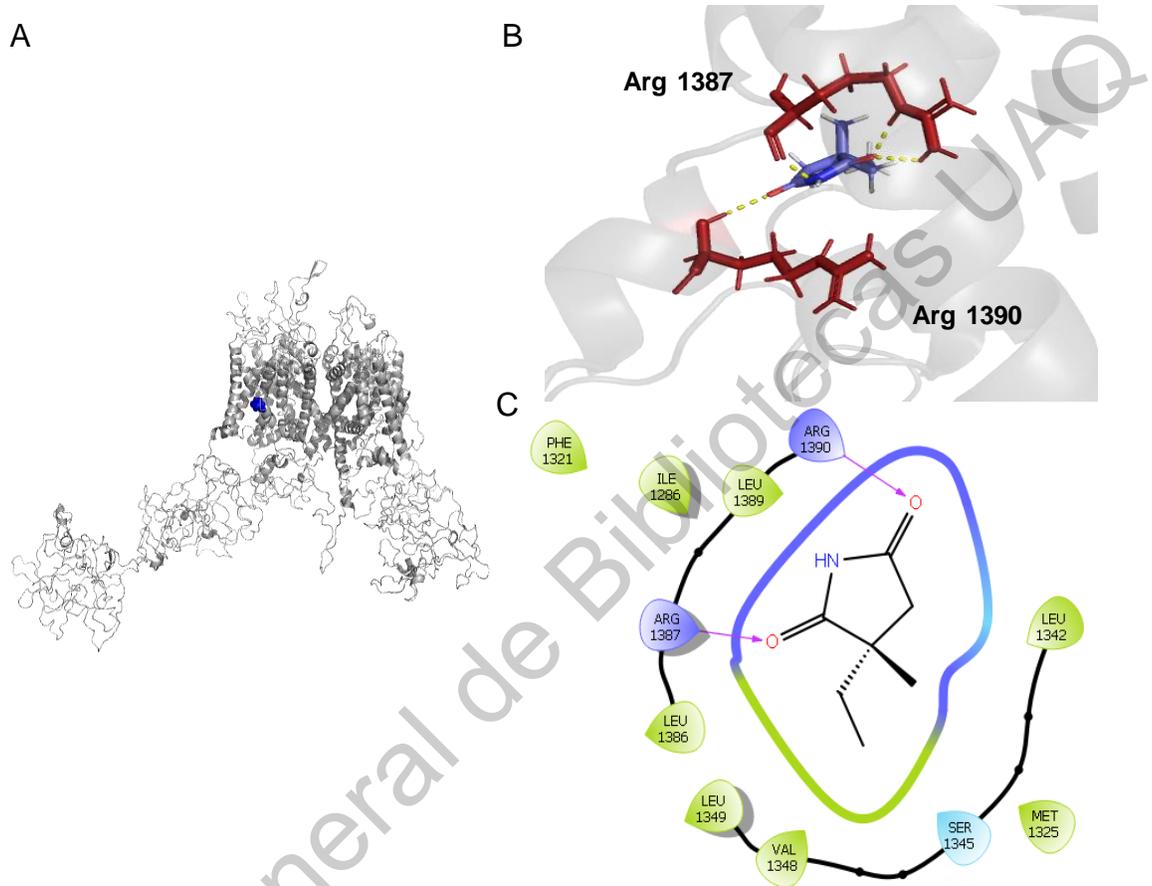


Figura 34. Sitio de unión de etosuximida en la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T: A) Posición del sitio de unión de etosuximida en la subunidad $\alpha 1G$ del receptor de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, B) Acomodo tridimensional e interacciones de glicina en el sitio de unión, C) Diagrama bidimensional de interacción de glicina en el sitio de unión

7.5. Simulaciones de dinámica molecular

7.5.1. Complejos de SV2A

Las dinámicas realizadas de los complejos SV2A-cannabidiol y SV2A-levetiracetam dieron información acerca del comportamiento molecular de esta proteína vesicular en presencia de estos dos ligandos. En el caso de los parámetros termodinámicos de temperatura, presión, densidad, volumen, energía total y RMSD, presentados en la Figura 63 del Anexo, los valores fueron estables en el tiempo de simulación ya que no presentaron gran variación. De la diferencia de RMSF (raíz de la media cuadrática de la fluctuación de movimiento para cada residuo) entre los complejos de SV2A con la proteína sin ligando que se presentan en la Figura 35, se observó que en presencia de los dos ligandos hay una alteración de los valores en las regiones que corresponden de 1 a 100 aminoácidos y de 500 a 600 aminoácidos; en la primer región se observa una disminución de los valores de diferencia de RMSF y por lo tanto una disminución de movimiento, esta región corresponde a una parte intracelular de la proteína donde está incluida la parte *N*-terminal; en la segunda región que corresponde a una parte extracelular de la proteína, se observa un aumento en presencia de cannabidiol y una disminución en presencia de levetiracetam; cabe destacar que estas regiones en ausencia de ligandos presentan un mayor grado de movimiento que otras regiones de SV2A.

De estas regiones donde se presentó una alteración del grado de movimiento, la región *N*-terminal es de gran importancia, debido a que interactúa con la sinaptotagmina-1 para llevar a cabo la unión con esta proteína, esta unión es importante, debido a que funciona como un regulador de la interacción de sinaptotagmina-1 con otras proteínas de la membrana neurona para llevar a cabo la exocitosis de los neurotransmisores (Schivell y col., 2005).

Por otra parte, en la Figura 36 se observa el cálculo de afinidad mediante la técnica de energía de interacción lineal, donde el complejo SV2A-cannabidiol presentó valores negativos y estables a lo largo del tiempo de simulación; en contraste, en el

complejo SV2A-levetiracetam los valores de energía de interacción lineal presentaron un aumento en el lapso de 0 a 1850 ps y después los valores volvieron a disminuir y a permanecer estables durante todo el tiempo de simulación.

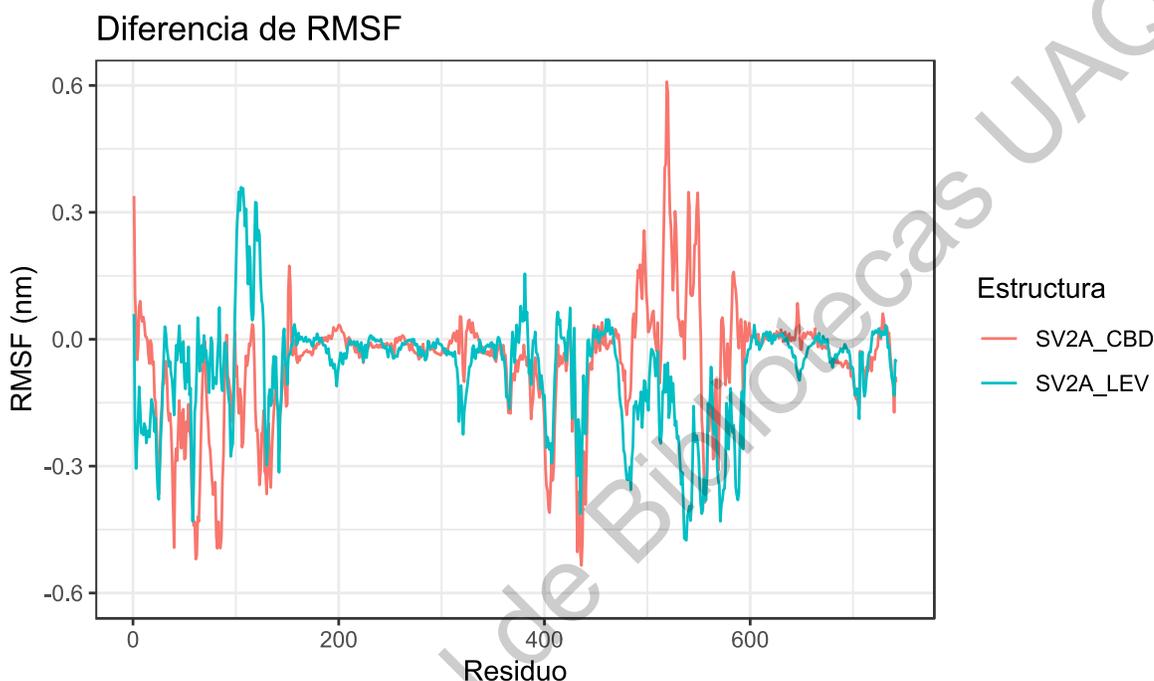


Figura 35. Valores de diferencia de RMSF de los complejos SV2A-CBD y SV2A-LEV. CBD: cannabidiol, LEV: levetiracetam

Esta caída de afinidad en el lapso de 0 a 1850 ps por parte del complejo SV2A-levetiracetam se puede explicar debido a que en ese tiempo de simulación, levetiracetam adoptó una conformación que no permite su acercamiento e interacción con la Tyr462 lo cual se puede ver en la Figura 37 A, este aminoácido esta reportado como importante para la afinidad de los racetams (Correa-Basurto y col., 2015; Shi y col., 2011). Por otra parte, después del tiempo de simulación en el que se presentó una menor afinidad, levetiracetam adoptó una conformación que lo posicionó más cerca de la Tyr462, favoreciendo la interacción con el oxígeno del grupo amida de levetiracetam como se observa en la Figura 37 B; esta diferencia parece ser la clave de la disminución de la afinidad en la conformación menos afín.

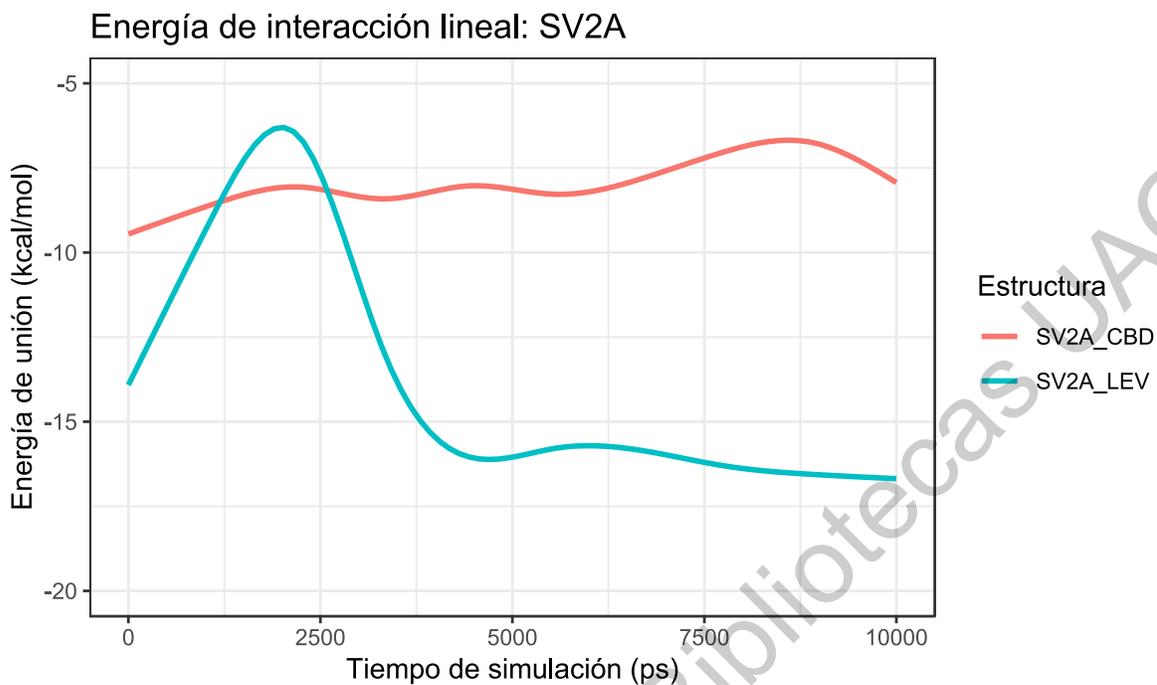


Figura 36. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos SV2A-CBD y SV2A-LEV. CBD: cannabidiol, LEV: levetiracetam

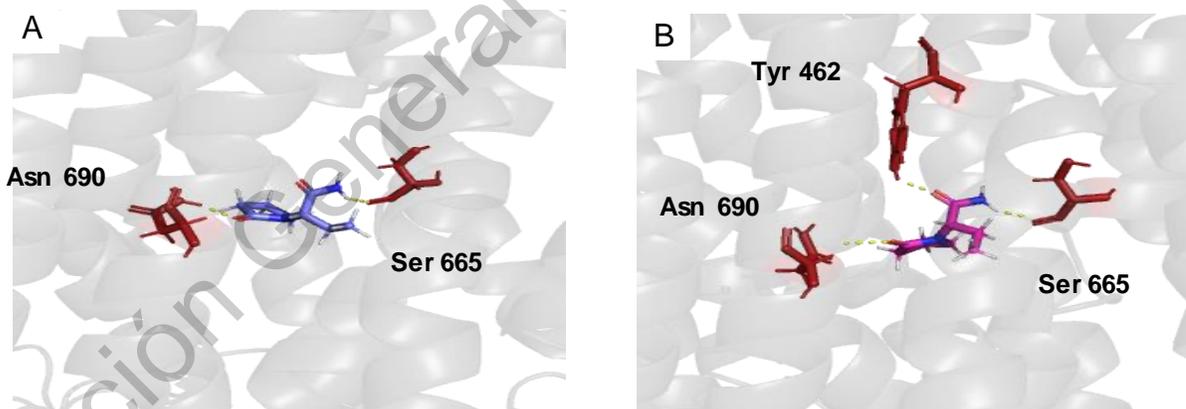


Figura 37. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo SV2A-LEV durante la dinámica molecular: A) conformación representativa del lapso de 0 a 1850 ps, B) conformación representativa del lapso de 4000 a 10000 ps

En el caso de complejo SV2A-cannabidiol se presentaron dos interacciones, una de tipo de puente de hidrógeno con la Cys159 y una interacción π -catión con la His161

como se puede ver en la Figura 38, comparando estos resultados con el acoplamiento molecular se observó que la interacción con la Cys159 se mantuvo en la dinámica molecular, por lo que esta interacción parece ser necesaria para la afinidad de cannabidiol con la proteína vesicular SV2A.

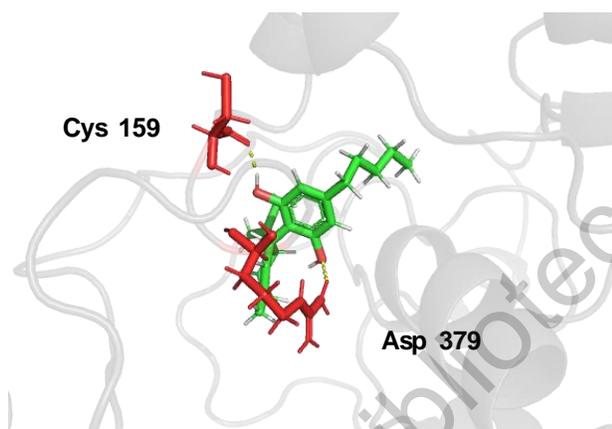


Figura 38. Conformación representativa del complejo SV2A-CBD durante la simulación de dinámica molecular

Los resultados presentados de SV2A indican que tanto cannabidiol como levetiracetam fueron afines en sus respectivos sitios de unión, siendo el levetiracetam la molécula más afín, después de un tiempo de simulación de 5000 ps. Por otra parte, la disminución del grado de movimiento en la región *N*-terminal de SV2A que es el sitio de unión de la sinaptotagmina-1 en presencia de los ligandos, podría estar indicando una alteración en la capacidad de formación de interacciones entre SV2A y sinaptotagmina-1, esta alteración podría estar correlacionada con un mayor efecto regulador de SV2A hacia sinaptotagmina-1, que pudiera disminuir la exocitosis promovida por Ca^{2+} y por la interacción de sinaptotagmina-1 con proteínas de la membrana neuronal, lo que tendría como resultado una menor liberación de neurotransmisores y por lo tanto un efecto anticonvulsivo.

Por último, llevar a cabo la construcción del complejo SV2A-sinaptotagmina-1 con la aplicación de las técnicas de acoplamiento molecular y dinámica molecular,

podría ser de gran utilidad para la determinación de las interacciones, mecanismo molecular y cambios conformacionales ocurridos en presencia de cannabidiol y levetiracetam para así poder comprobar la propuesta mencionada con anterioridad.

7.5.2. Complejos de FAAH

Las dinámicas realizadas de los complejos FAAH-cannabidiol y FAAH-anandamida fueron estables en los parámetros termodinámicos presentados en la Figura 64 del Anexo. De los valores de diferencia de RMSF presentados en la Figura 39 de los complejos de FAAH, se observan dos regiones de aminoácidos con cambios importantes en presencia de los dos ligandos, las cuales corresponden a regiones cercanas a los 600 aminoácidos, que es la región *N*-terminal de la cadena B de la enzima, antes de los 600 aminoácidos se observa una disminución, y después de los 600 aminoácidos se observa un incremento, por otra parte la región en donde se sitúan los aminoácidos Ser241, Ser217 y Lys142 responsables del catabolismo de la anandamida, no sufren ningún cambio importante en los valores de diferencia de RMSF y por lo tanto del grado de movimiento.

Estos resultados podrían indicar un cambio conformacional de la región *N*-terminal de la cadena B de la enzima FAAH en presencia de los dos ligandos. Sin embargo, no ha sido reportado, la injerencia de las regiones *N*-terminal en procesos de activación e inhibición. En contraste, las regiones que han sido reportadas como importantes en procesos de activación e inhibición, como la triada catalítica de Ser241, Ser217, y Lys142 y la región de 404 a 433 aminoácidos, la cual forma la cara hidrofóbica que se inserta en la membrana y que es importante para la unión y desunión de FAAH con la membrana para adoptar su forma activa o inactiva (Bracey y col., 2002) no presentaron cambios importantes.

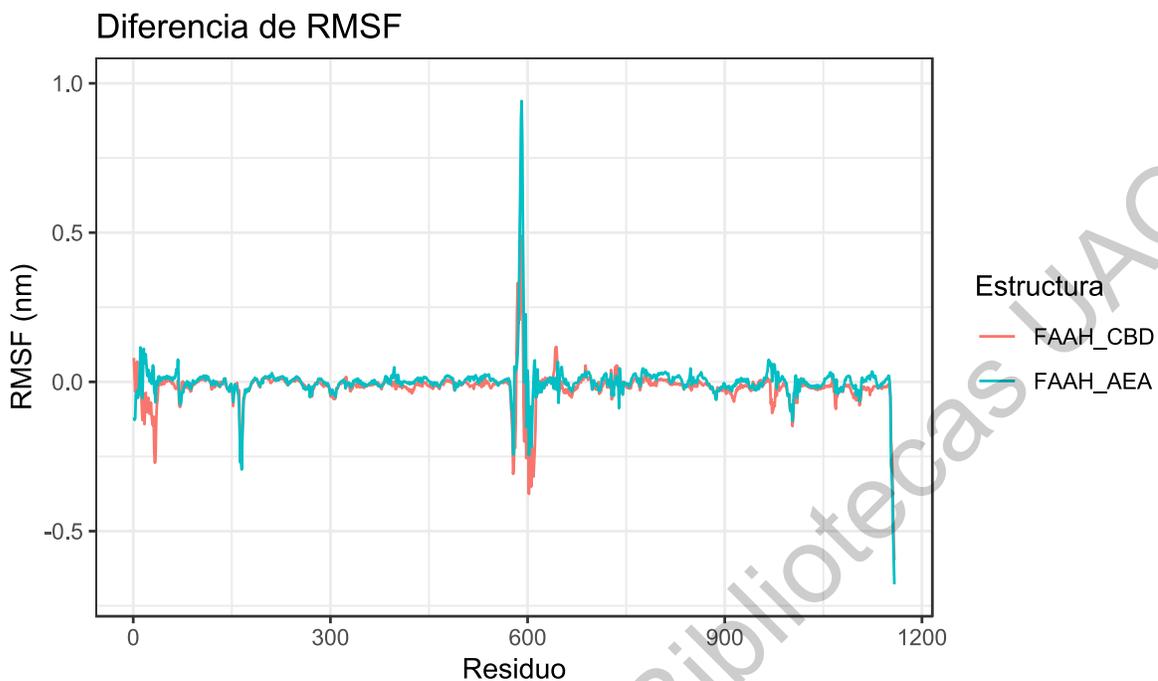


Figura 39. Valores de diferencia de RMSF de los complejos FAAH-CBD y FAAH-AEA.
 CBD: cannabidiol, AEA: anandamida

En el caso de los valores de energía de interacción lineal, presentados en la Figura 40, indicaron que el complejo FAAH-cannabidiol presentó un aumento de los valores alrededor de 2500-3750 ps y por lo tanto una disminución en la afinidad, después de ese tiempo, los valores volvieron disminuir por lo que la afinidad aumento; los valores del complejo FAAH-anandamida, disminuyeron en la región de 5000-7500 ps, aumentando la afinidad. Por otra parte, después de este tiempo los valores aumentaron alrededor de los 8750 ps y vuelven a disminuir hasta el final del tiempo de simulación.

La disminución de afinidad del complejo FAAH-cannabidiol en el lapso de 2500-3750 ps parece estar provocado por la conformación que adoptó el cannabidiol en ese tiempo, como se observa en la Figura 41 A, en donde cannabidiol no pudo interactuar con la Gln273. En contraste, la conformación del lapso de mayor afinidad que corresponde de 5000 a 10000 ps, cannabidiol pudo interactuar con Gln273 como se presenta en la Figura 41 B; adicionalmente, se observó que ambas

conformaciones, no están lo suficientemente cerca de la Ser241 lo que explicaría la ausencia de algún tipo de interacción que provocaría un cambio conformacional que podría ser observable en los valores de diferencia de RMSF.

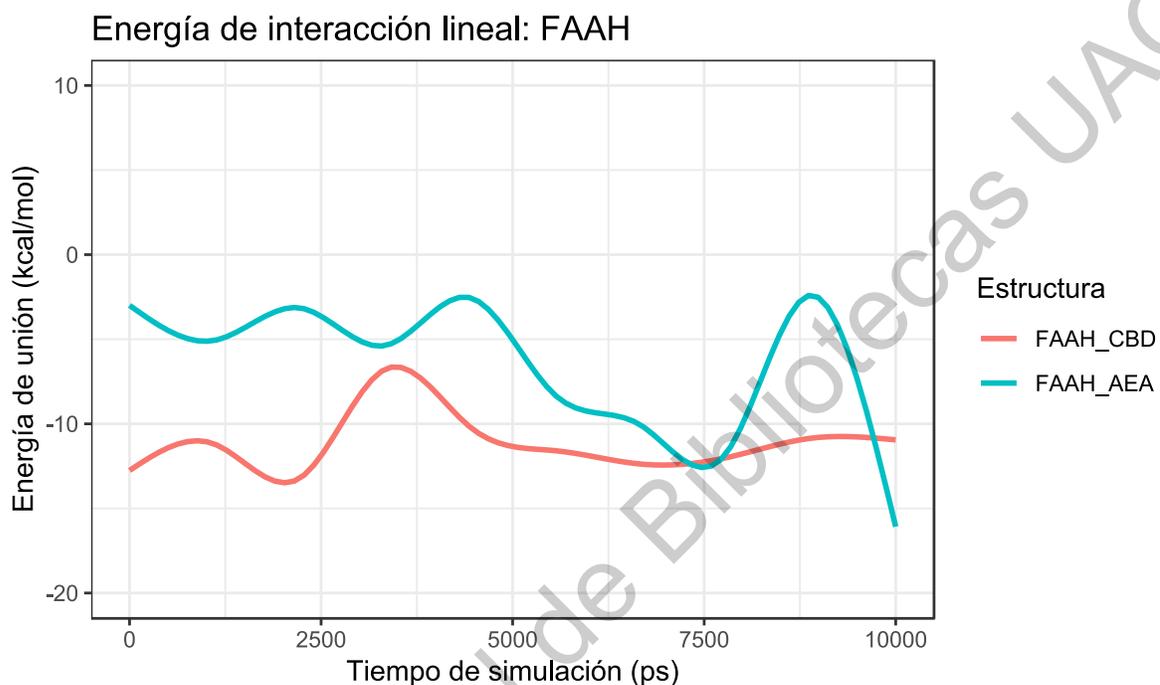


Figura 40. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos FAAH-CBD y FAAH-AEA. CBD: cannabidiol, AEA: anandamida

En el caso del complejo FAAH-anandamida el aumento de afinidad en el lapso de 5000-7500 ps puede estar correlacionado con la conformación adoptada en ese tiempo, en donde se observó que la cadena alifática de la anandamida está más cercana a aminoácidos no polares como se presentó en la Figura 42 C, en comparación de la conformación menos afín mostrada en la Figura 42 D. Por otra parte, se observa en las conformaciones de menor y mayor afinidad representadas en las Figuras 42 A y B que se sitúan más cercanas a la Ser241, lo que coincide con los acoplamientos realizados anteriormente; sin embargo, el posicionamiento de la anandamida no fue lo esperado, ya que el carbono carbonilo de la amida debería orientarse hacia la Ser241, para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico. (Elmes y col., 2015).

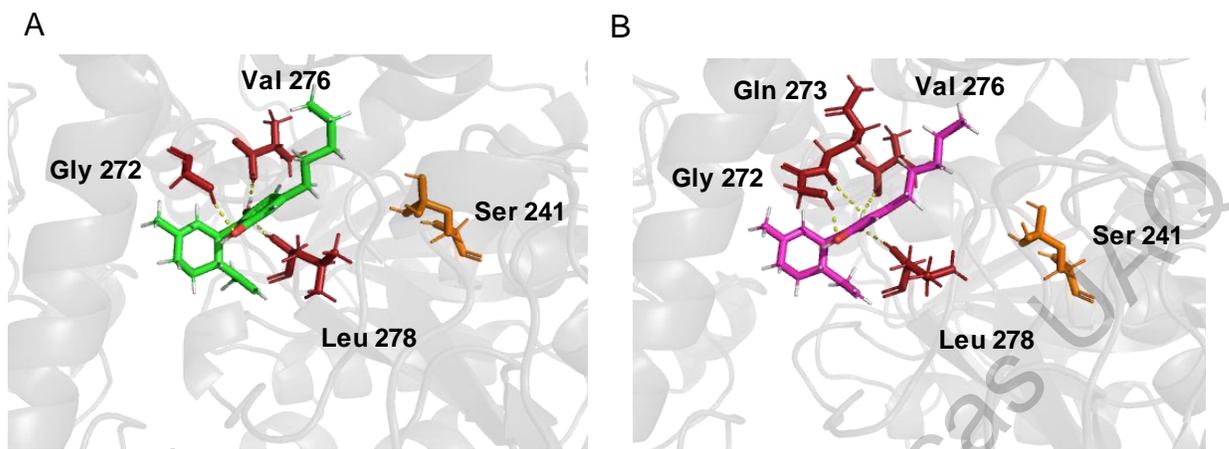


Figura 41. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo FAAH-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 2500 a 3750 ps, B) Conformación representativa del lapso de 0 a 10000 ps

De los resultados presentados, la diferencia en la cercanía con respecto a la Ser241 entre cannabidiol y anandamida encontrada tanto en los acoplamientos moleculares como en las dinámicas moleculares, parece ser la clave por el cual cannabidiol no puede actuar como un inhibidor competitivo, lo cual ha sido probado en trabajos experimentales en donde cannabidiol no puede inhibir la degradación de la anandamida por parte de la enzima FAAH humana; esto se debe a la presencia de los aminoácidos Phe 192 y Met 495 que provocan un impedimento estérico que no permiten el paso de cannabidiol hacia el sitio catalítico (Ahn y col., 2009).

Ante esta situación, se han propuesto otras vías por los cuales cannabidiol si puede impedir la degradación de la anandamida, una de ellas propuesta de trabajos experimentales, en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de cannabidiol con las proteínas transportadoras de ácidos grasos FABP 3, 5 y 7, las cuales son las responsables de transportar a la anandamida hacia el interior de la célula para ser degradada por la FAAH; los resultados de este trabajo demostraron que cannabidiol fue afín a estas proteínas y además inhibió la capacidad transportadora de estas proteínas, estos resultados sugieren la posibilidad de que cannabidiol inhiba la

degradación de la anandamida, vía por esta proteínas transportadoras y no por la FAAH (Elmes y col., 2015).

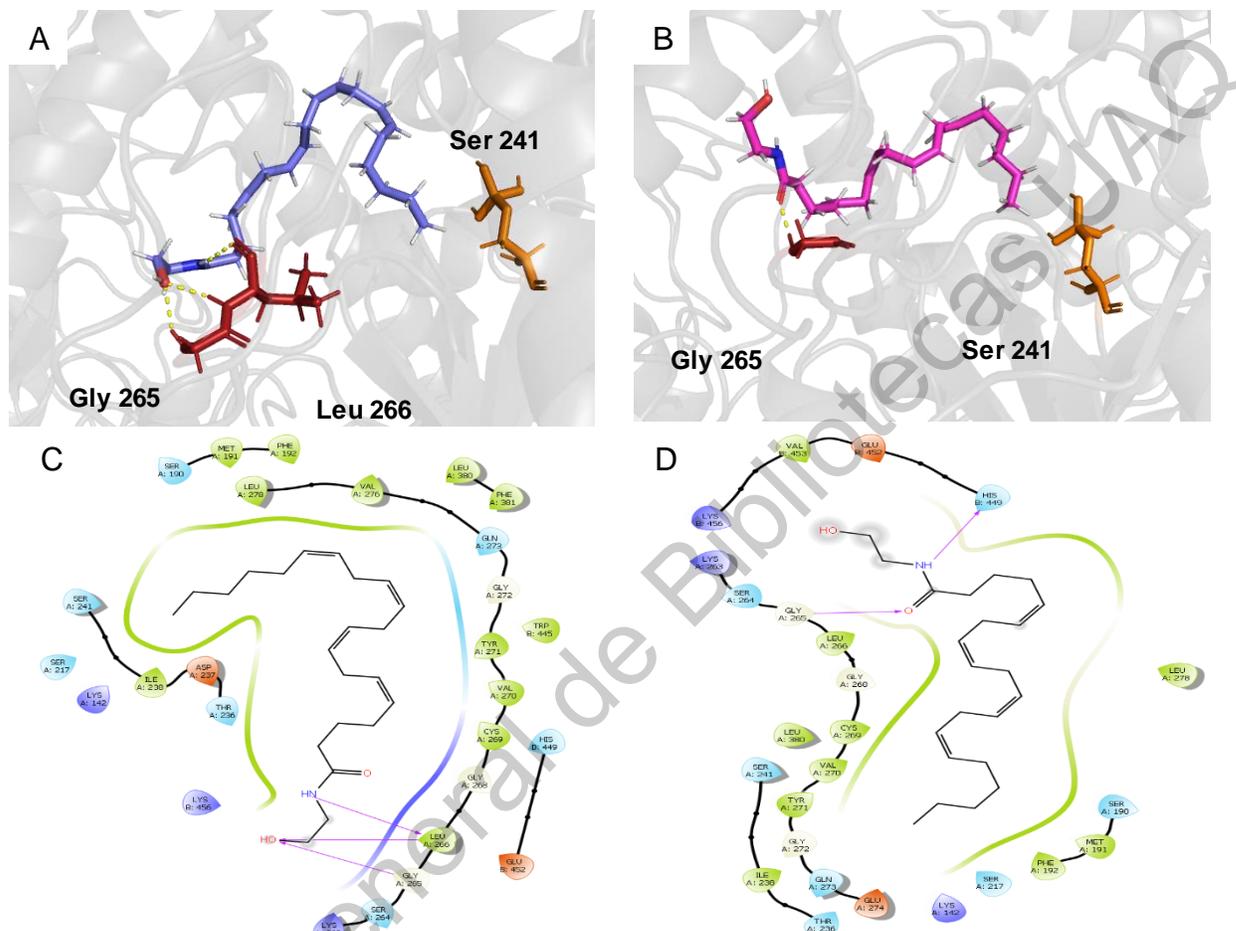


Figura 42. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo FAAH-AEA durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 0 a 5000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 5000 a 7500 ps, C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Por último, cabe aclarar que tanto los acoplamientos moleculares como las dinámicas moleculares realizadas se llevaron a cabo con la Ser 241 fosforilada, ya que es una modificación post-trasduccional reportada en esta enzima (Bian y col., 2013), por lo que el llevar a cabo estos experimentos sin la presencia de la fosforilación puede ser de gran ayuda para observar variaciones en el

posicionamiento del cannabidiol y de la anandamida que pudieran generar otro tipo de respuesta en el cambio conformacional de la enzima FAAH.

7.5.3. Complejos de GPR55

Las dinámicas moleculares de los complejos GPR55-cannabidiol y GPR55-rimonabant, mostraron ser estables para los parámetros termodinámicos de temperatura, presión, densidad, volumen, RMSD y energía total como se presenta en la Figura 65 del Anexo; además se observó un comportamiento similar y pocas diferencias de los valores de diferencia de RMSF entre los complejos, presentados en la Figura 43; una de estas diferencias se observó en la región de 240-280 aminoácidos de la proteína GPR55, en donde ambos ligandos disminuyeron el valor de diferencia de RMSF y por lo tanto del grado de movimiento de manera similar.

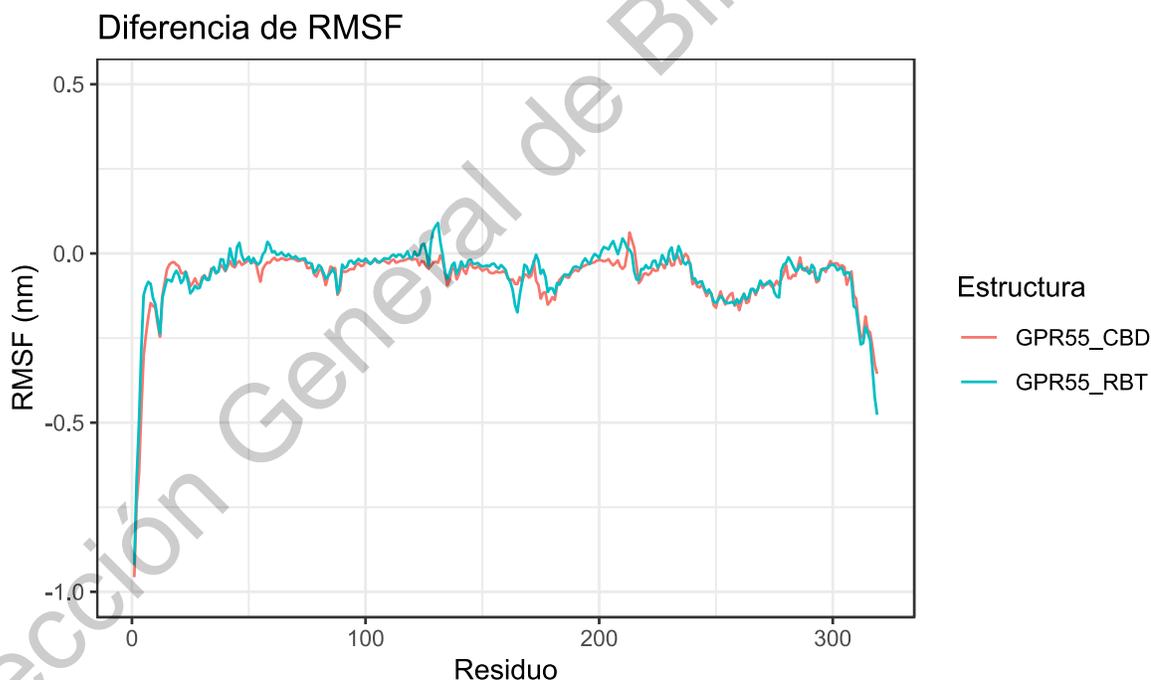


Figura 43. Valores de diferencia de RMSF de los complejos GPR55-CBD y GPR55-AEA. CBD: cannabidiol, RBT: rimonabant

Esta región de 240-280 aminoácidos de GPR55 incluye a los segmentos transmembranales 6 y 7; en el segmento transmembranal 6 se ubican dos

aminoácidos de gran importancia para la activación de GPR55: la Phe239 y la Ser104; al presentarse una interacción de GPR55 con un agonista, ambos aminoácidos actúan como una especie de “switch”, debido a que sufren un cambio conformacional primero llevado a cabo por la Phe239 y después por la Ser104, estos cambios conformacionales producen un efecto “domino” en la parte intracelular del segmento transmembranal 6, debido a que esta parte de la proteína GPR55 se encuentra inclinada.

El cambio conformacional produce un enderezamiento de esta parte; este fenómeno se ha detectado como importante para la activación de GPR55, ya que el enderezamiento rompe con un puente de hidrógeno, formado por los aminoácidos Gln221 del segmento transmembranal 6 y la Arg119 del segmento transmembranal 3, el cual forma un candado que al romperse provoca la exposición de la parte intracelular del segmento 6 con la proteína G, para llevarse a cabo la cascada de señalización (Shore y Reggio, 2015).

Por otra parte, en los valores de la energía de interacción lineal presentados en la Figura 44 se observó que en el complejo GPR55-cannabidiol se mantuvieron estables después de los 5700 ps, en el caso del complejo GPR55-rimonabant, los valores presentaron una disminución en el lapso de 3750 a 5200 ps y por lo tanto un aumento de la afinidad, seguido después de este tiempo, se observó un aumento de los valores de 5200 ps, hasta el final del tiempo de simulación lo que significó una pérdida de la afinidad.

En las interacciones del complejo GPR55-cannabidiol se observó en la Figura 45 que se formó un puente de hidrógeno con la Ser178, esta interacción parece ser importante para la afinidad de cannabidiol hacia esta proteína, ya que se presentó en los resultados de los acoplamientos moleculares como en las dinámicas moleculares.

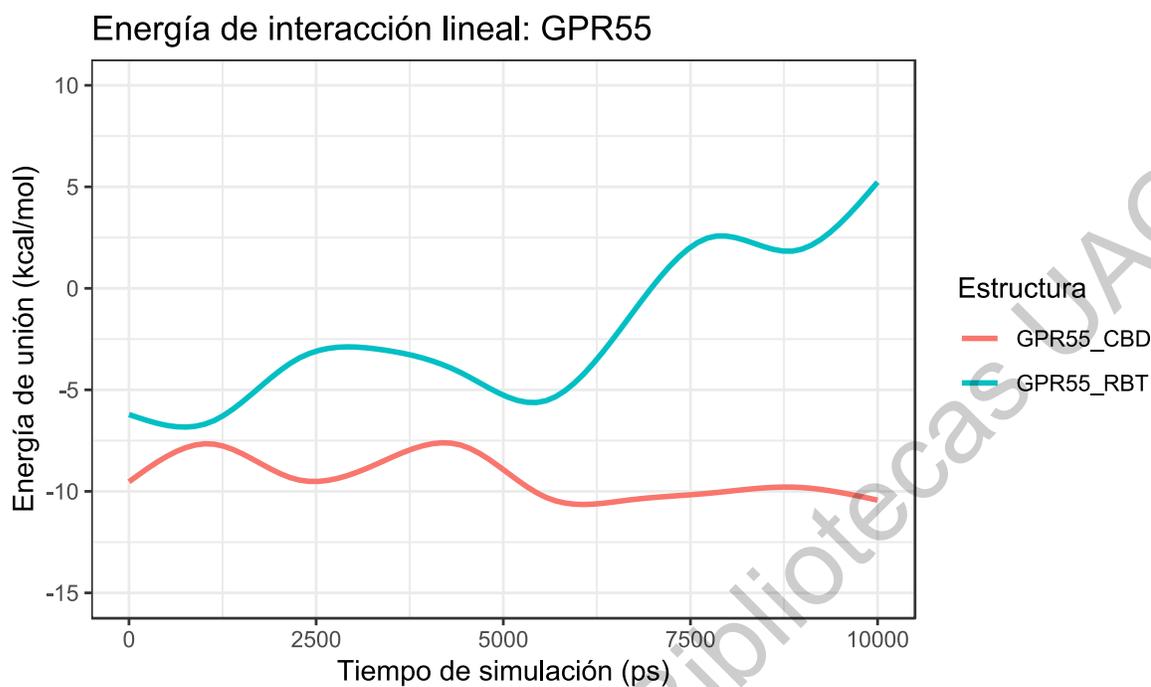


Figura 44. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos GPR55-CBD y GPR55-RBT. CBD: cannabidiol, RBT: rimonabant

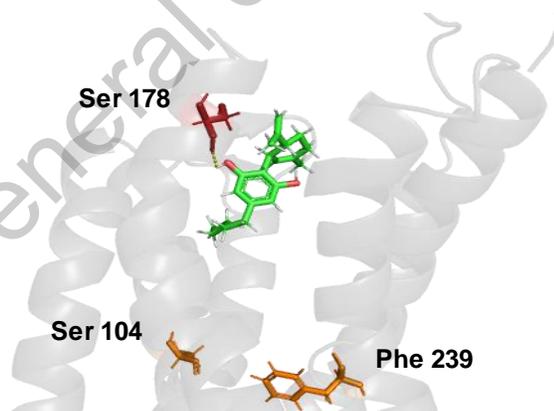


Figura 45. Conformación representativa del complejo GPR55-CBD durante la simulación de dinámica molecular

En el caso del complejo GPR55-rimonabant las conformaciones de menor afinidad como de mayor afinidad no presentaron ningún tipo de interacción de tipo de puente de hidrógeno, como se observó en las Figuras 46 A y B. Por otra parte, si se presentaron interacciones de tipo π - π con la His160 y la Phe182 observadas en las

Figuras 46 C y D, en la conformación de mayor afinidad, lo cual puede ser la causa de la diferencia de afinidad entre la conformación de menor y mayor afinidad.

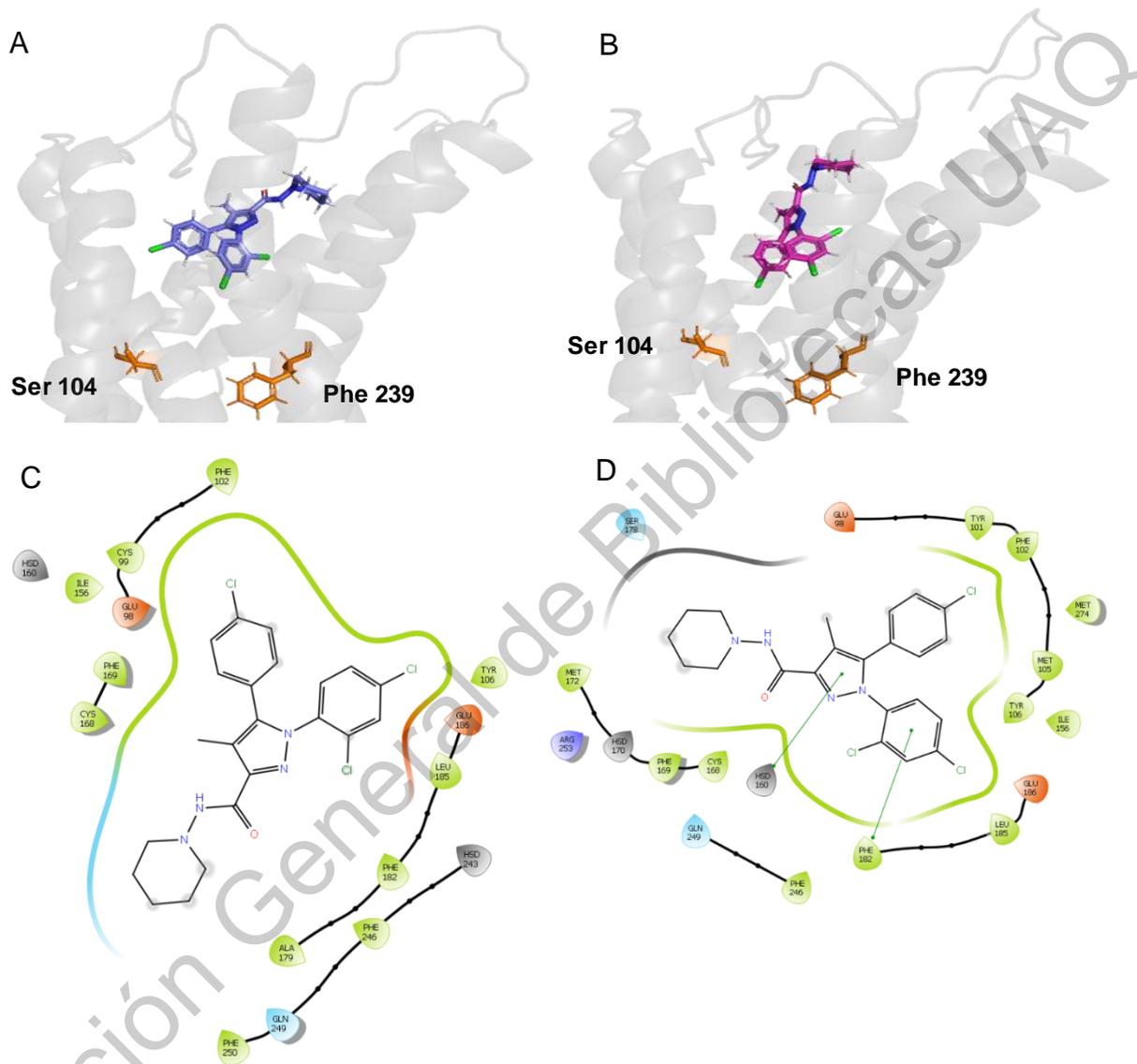


Figura 46. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo GPR55-RBT durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 5200 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 3750 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Comparando estos resultados con los acoplamientos moleculares se observó que ocurrió una alteración de las interacciones que se formaron, por una parte, la ausencia del puente de hidrógeno con la His170 y, por otra parte, la ausencia de la interacción del tipo π - π con la Phe246, esta última es una interacción importante para el efecto antagónico de moléculas que presentan esta característica (Kotsikorou, y col., 2013).

Comparando los resultados de los complejos GPR55-cannabidiol y GPR55-rimonabant se observó una diferencia importante que indicaría una acción antagónica específica para rimonabant y una acción antagónica no específica para cannabidiol que radica en la posición de ambos ligandos. Por un lado, como se observa en la Figura 45, que cannabidiol no penetró demasiado hacia el interior de la proteína GPR55; en contraste, se observó que rimonabant sí penetró más hacia el interior de la proteína, esto coincide con los acoplamientos moleculares realizados además de trabajos experimentales realizados con anterioridad. Por otra parte, en el caso de rimonabant, las conformaciones de menor y mayor energía mostraron una orientación relacionada con su efecto antagónico, ya que los anillos aromáticos están posicionados hacia el interior de la proteína y más cercanos a los aminoácidos Ser104 y Phe239; esta característica parece impedir algún cambio conformacional de la Ser104 y Phe239, provocado por un impedimento estérico de los anillos aromáticos de los antagonistas, lo que tiene como resultado una inactivación de la proteína GPR55 (Shore y Reggio, 2013).

Este mismo fenómeno se tiene registrado para cannabidiol, en donde la cadena alifática es la responsable del impedimento estérico hacia la Ser104 y Phe239 ya que se encuentra más cercana hacia estos aminoácidos (Bian y col., 2018). Sin embargo, los resultados presentados no correlacionan con lo reportado, ya que no se encontró durante el tiempo de simulación alguna conformación, en donde la cadena alifática se localizara más cercana hacia la Ser104 y Phe239; para este caso el llevar a cabo más acoplamientos moleculares de cannabidiol y GPR55 para validar

estos u otros resultados es lo que proponemos para encontrar o no lo reportado con anterioridad.

Por último, la disminución de los valores de diferencia de RMSF en la región de 240 a 280 aminoácidos correspondientes a los segmentos transmembranales 6 y 7 por parte de cannabidiol y rimonabant, podrían también indicar un efecto antagónico; debido a que esta región debe de poseer cierta plasticidad, para llevar a cabo un cambio conformacional y así poder activarse, por lo que la pérdida, de plasticidad en esta región en presencia de los ligandos, disminuiría la capacidad de GPR55 de llevar a cabo un cambio conformacional y por lo tanto la proteína permanecería inactiva.

7.5.4. Complejos de TRPV1

Las dinámicas moleculares de los complejos TRPV1-cannabidiol y TRPV1-capsaicina mostraron ser estables para los parámetros termodinámicos de temperatura, presión, volumen, densidad, energía total y RMSD, mostrados en la Figura 66 del Anexo. Los valores de diferencia de RMSF presentados en la Figura 47 muestran que el receptor TRPV1 en presencia de los ligandos cannabidiol y capsaicina sufrió de cambios similares, se observaron cuatro regiones en donde se presentaron una disminución del grado de movimiento ya que la diferencia con respecto a los valores del receptor sin presencia de ligandos fue negativa, estas regiones correspondieron a los aminoácidos 1-200 800-1000, 1600-1800, 2500-2700 de las cadenas A, B, C y D, las cuales pertenecen a las partes intracelulares del receptor.

Por otra parte, no se observaron cambios relevantes en aminoácidos involucrados en la activación del receptor TRPV1, específicamente en la región de 659-687 aminoácidos de la cadena A que corresponde al segmento transmembranal 6, el cual al llevarse a cabo la activación del receptor TRPV1, por un agonista, sufre un cambio conformacional, que provoca la inhibición de la obstrucción del canal permitiendo el paso de los iones Ca^{2+} y Na^{+} (Yang y Zheng, 2017).

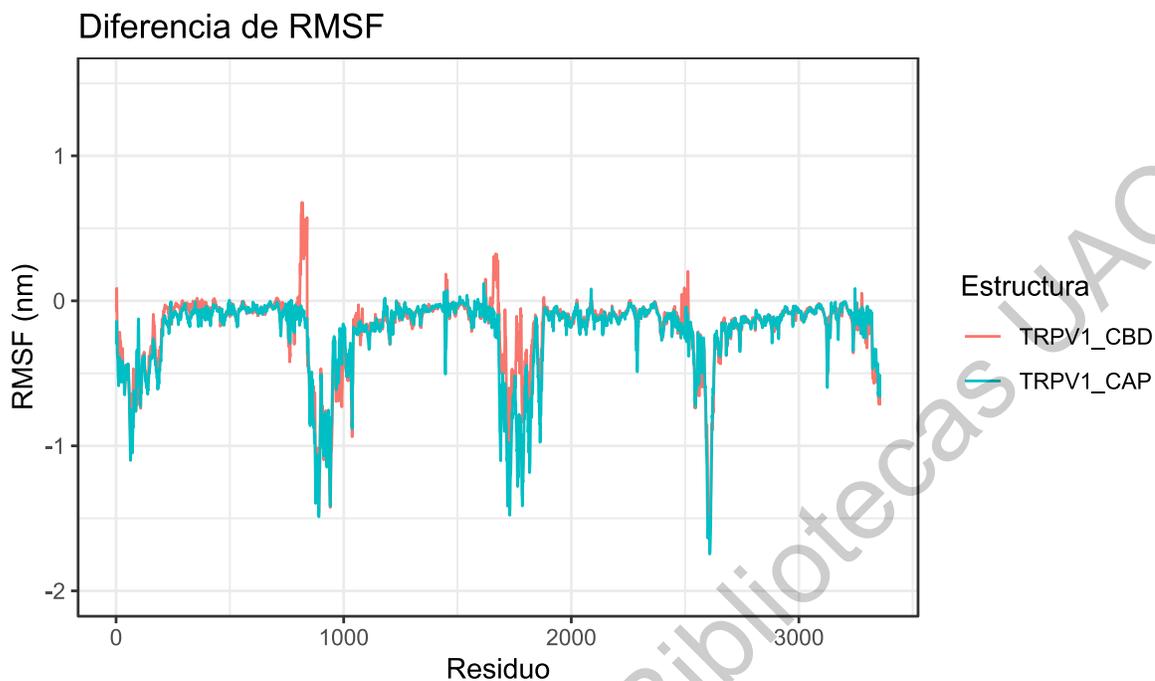


Figura 47. Valores de diferencia de RMSF de los complejos TRPV1-CBD y TRPV1-CAP. CBD: cannabidiol, CAP: capsaicina

En el caso de los valores de la energía de interacción lineal presentados en la Figura 48 el complejo TRPV1-cannabidiol, presentó una caída de los valores en el lapso de 4370-5625 ps, lo que significó un aumento de la afinidad y posteriormente los valores regresaron a la estabilidad; por parte del complejo TRPV1-capsaicina se presentó una disminución de los valores y por lo tanto un aumento en la afinidad en el lapso de 0-2750 ps, después de esta caída los valores aumentaron hasta el final del tiempo de simulación y por lo tanto se presentó una disminución de la afinidad en el complejo.

Para el complejo TRPV-cannabidiol se presentaron dos conformaciones de menor y mayor afinidad, de las imágenes tridimensionales ilustradas en las Figuras 49 A y B se observó que en ambas conformaciones se produjo una interacción de puente de hidrógeno con la Ile573, en contraste en las Figuras 49 C y D de los diagramas bidimensionales se observó que en la conformación de mayor afinidad, la cadena alifática $C_{5}H_{11}$ se posicionó de tal forma que permitió un mayor acercamiento y

contacto entre esta cadena y aminoácidos hidrofóbicos de alrededor, no se observaron interacciones con aminoácidos importantes para la activación de TRPV1 como la Thr550, Tyr 511 y Glu570 (Yang y Zheng, 2017), debido a que ambas conformaciones no se localizaron lo suficientemente cerca para producir algún tipo de interacción.

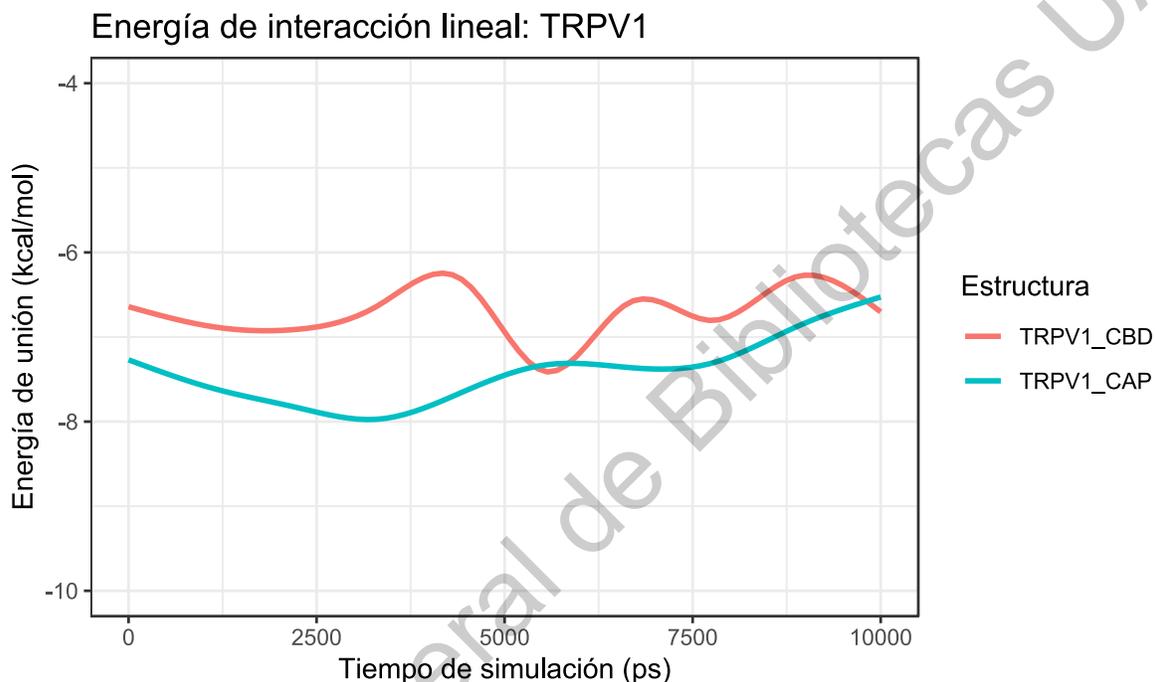


Figura 48. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos TRPV1-CBD y TRPV1-CAP. CBD: cannabidiol, CAP: capsaicina

Por otra parte, en las conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo TRPV1-capsaicina, se observó en las Figuras 50 A y B que se presentó una interacción de puente de hidrógeno con la Tyr511, la cual es una interacción importante reportada que favorece la afinidad y sensibilidad de la capsaicina en su sitio de unión (Hanson y col., 2015); en cuanto a los diagramas de interacción bidimensionales, se presentó en las Figuras 50 C y D que la conformación de mayor afinidad estableció una interacción de tipo π - π , por parte del grupo aromático de la capsaicina con la Tyr511 adicional a la interacción de puente de hidrógeno, esto

puede ser la clave, por lo cual se presentó una diferencia de afinidad entre ambas conformaciones.

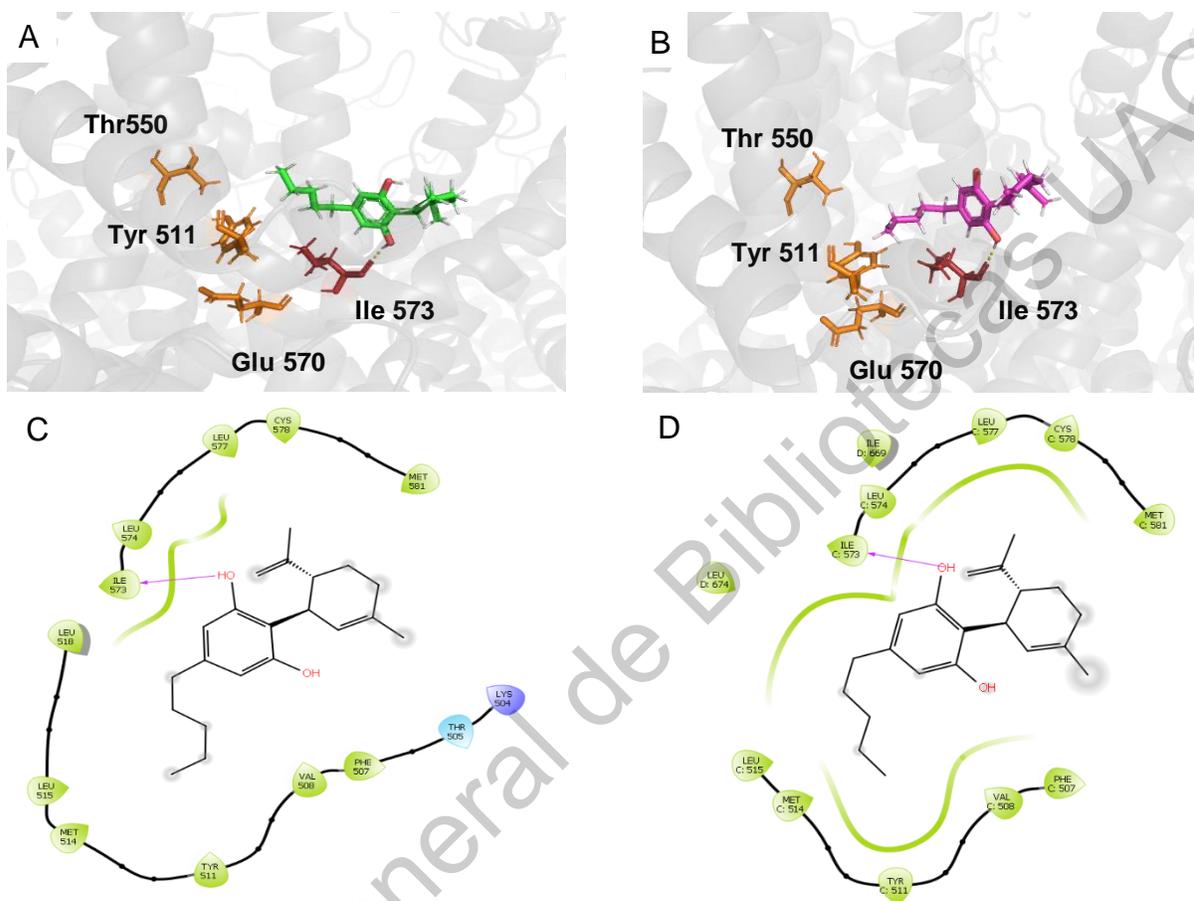


Figura 49. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo TRPV1-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 3750 a 4200 ps, B) Conformación representativa del lapso de 4200 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Estos resultados que se presentaron en cuanto a las interacciones y valores de diferencia de RMSF no satisfacen los requerimientos para llevar a cabo un cambio conformacional que este correlacionado con la activación de TRPV1 en el caso de cannabidiol, debido a que las alteraciones que produjo este ligando en el grado de movimiento, se localizaron en aminoácidos que al parecer no tienen importancia en

un mecanismo de activación y desactivación del receptor, comparando los resultados del acoplamiento molecular y la dinámica molecular se observó un cambio en la orientación de la conformación debido a que ya no se presentó la interacción con la Tyr511 con cannabidiol, este cambio de orientación, además de la nula interacción con los aminoácidos Thr550 y Glu570, pudieron estar correlacionados con la ausencia de algún cambio importante para la activación del receptor TRPV1 por parte de cannabidiol.

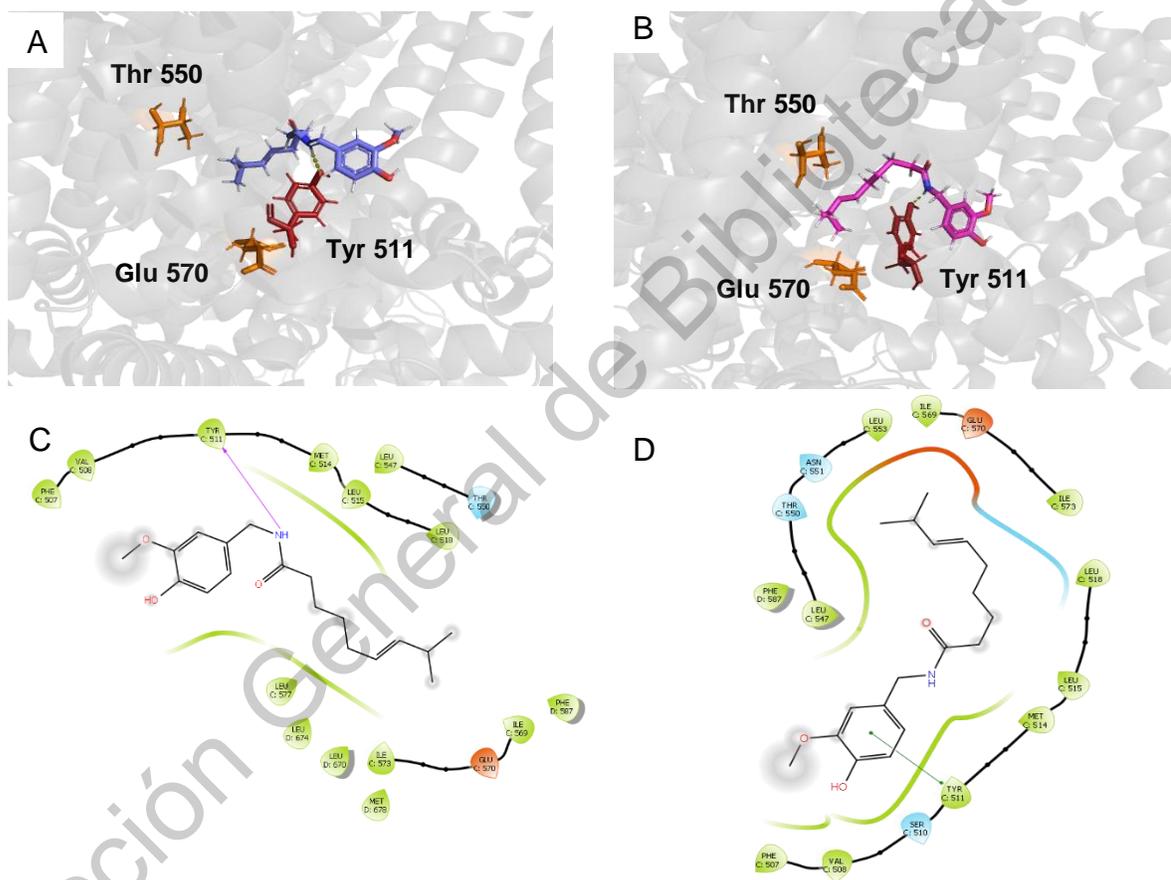


Figura 50. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo TRPV1-CAP durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 7500 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 2500 a 3000 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Este paso de activación, por parte de cannabidiol, parece estar seguido de la desensibilización del receptor, sin embargo, este paso parece estar más asociado a procesos de desfosforilación de ciertos aminoácidos del receptor (Iannotti y col., 2014), por lo que en las técnicas computacionales de acoplamiento molecular y dinámica molecular no se podría observar tal fenómeno. Este proceso de activación-desensibilización por parte de cannabidiol, tiene como resultado la inactivación del receptor TRPV1 y por lo tanto el impedimento de la entrada de los iones Ca^{2+} y Na^+ que provocan la excitabilidad de las neuronas, lo cual está asociado a un mecanismo anticonvulsivo.

En el caso del complejo de TRPV1-capsaicina los resultados mostraron la interacción característica con la Tyr511, sin embargo no se presentaron interacciones de tipo de puente de hidrógeno con la Thr550 y Glu570, las cuales están involucradas con la activación del receptor; este proceso inicia cuando la capsaicina adopta una conformación de tipo “cabeza” (grupo aromático) abajo y “cola” (isobutilo) arriba, produciendo la interacción primero con la Thr550 que se encuentra en el *loop* de unión entre los segmentos transmembranales 4 y 5 para estabilizar el complejo, posteriormente se forma la interacción con la Glu570, la cual se encuentra en el segmento transmembranal 6, la formación de esta interacción produce un fenómeno parecido a un movimiento de “palanca” que retira al segmento transmembranal 6 del poro del receptor, lo que permite el paso de los iones Ca^{2+} y Na^+ (Salazar y col., 2009).

Al parecer esta conformación no se presentó en los acoplamientos moleculares y dinámica molecular y por lo tanto no se observaron las interacciones con la Thr550 y Glu570, esto podría ser la causa por lo que la capsaicina no produjo cambios conformacionales relevantes que estuvieran asociados a la activación del receptor.

Ante esta situación en donde no se observaron cambios conformacionales importantes en presencia del cannabidiol y capsaicina, proponemos simulaciones más largas al menos de 100 ns para observar si se presentan conformaciones

favorables para la producción de las interacciones con la Thr550 y la Glu570 además de cambios conformacionales relacionados con la activación del receptor.

7.5.5. Complejos del receptor de glicina $\alpha 1\beta$

Las dinámicas moleculares de los complejos de glicina mostraron ser estables para los parámetros de temperatura, presión, densidad, volumen, RMSD, y energía total, estos valores se pueden observar en la Figura 67 del Anexo.

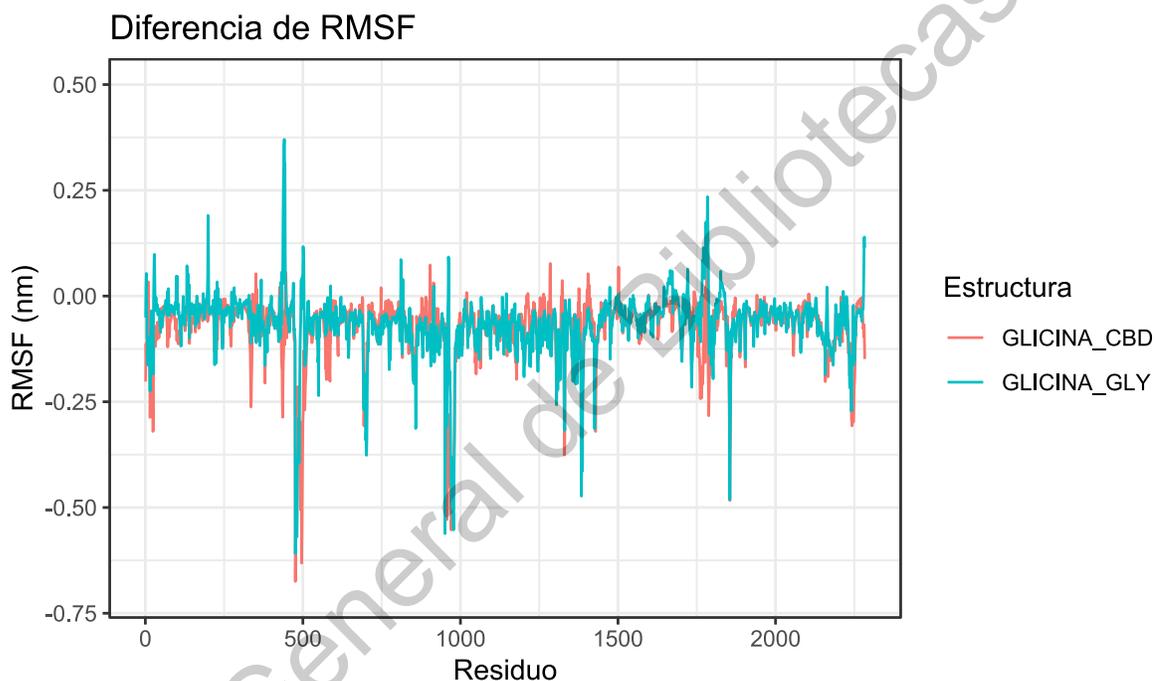


Figura 51. Valores de diferencia de RMSF de los complejos GLICINA-CBD y GLICINA-GLY. CBD: cannabidiol, GLY: glicina

En cuanto a los valores de diferencia de RMSF presentados en la Figura 51 se observaron tres regiones en donde se presentó una mayor variación de los valores en presencia de los glicina y cannabidiol, estas correspondieron a las regiones de 400-500, 900-1000, 1300-1400, 1700-1800 aminoácidos que se sitúan en la parte intracelular del receptor, en las cuales el grado de movimiento disminuyó, por otra parte también se observó que hubo un incremento significativo de los valores de diferencia de RMSF de otras regiones solo en presencia de glicina, estas fueron

aminoácidos cercanos a los 300 y a los 1600, lo que significó un aumento del grado de movimiento.

En cuanto a la energía de interacción lineal para el complejo receptor de glicina-cannabidiol, presentado en la Figura 52 los valores se mantuvieron estables en todo el tiempo de simulación, por lo que la conformación tanto del ligando como del receptor, no presentaron variaciones relevantes para modificar estos valores, en cuanto al complejo de receptor de glicina-glicina, los valores variaron considerablemente a lo largo del tiempo de simulación, presentándose una región de mayor afinidad correspondiente al lapso de tiempo 3750-5200 ps, por otra se presentó una región de menor afinidad al final de la simulación en el lapso de tiempo de 8750-10000 ps.

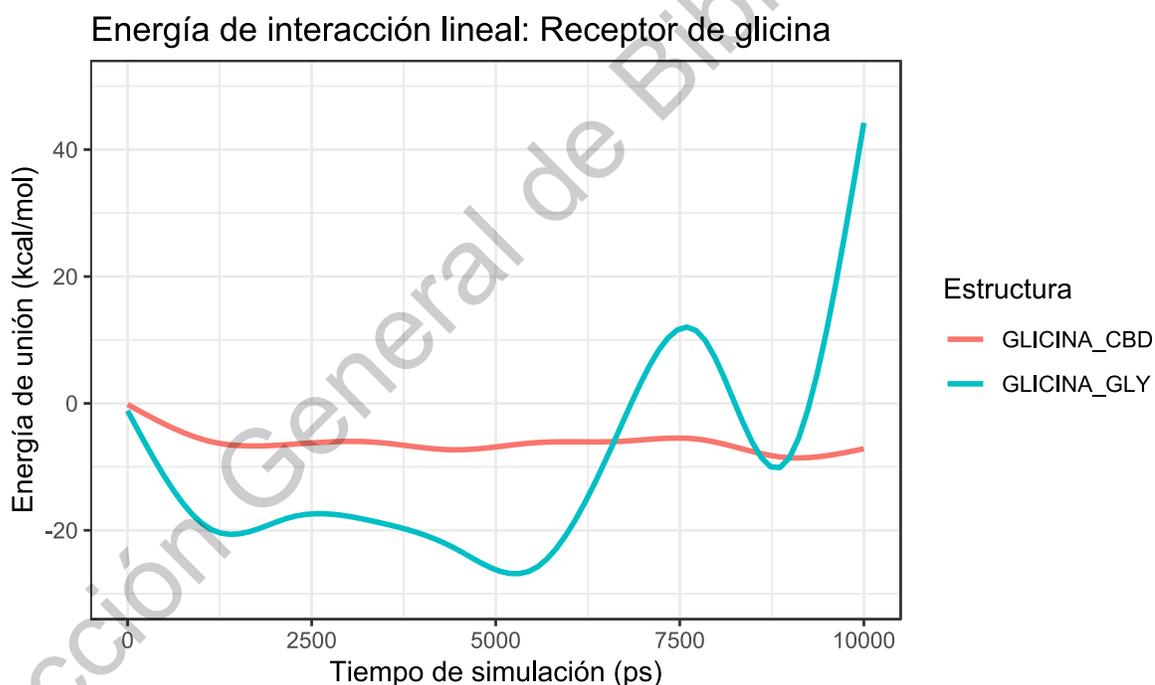


Figura 52. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos GLICINA - CBD y GLICINA-GLY. CBD: cannabidiol, GLY: Glicina

La conformación adoptada por cannabidiol en el tiempo de simulación presentada en la Figura 53 A produjo 3 interacciones de puente de hidrógeno con la Val199 y la His201 por parte de los grupos hidroxilo de la molécula, comparando estos

resultados con los acoplamientos moleculares, se observa un cambio importante en el acomodo tridimensional, por lo que ninguna interacción se mantuvo en la dinámica molecular. Por otra parte, se observó en la Figura 53 B que la mayoría de los aminoácidos del sitio de unión de cannabidiol fueron no polares lo que ayuda al cannabidiol a presentar una energía de interacción lineal negativa.

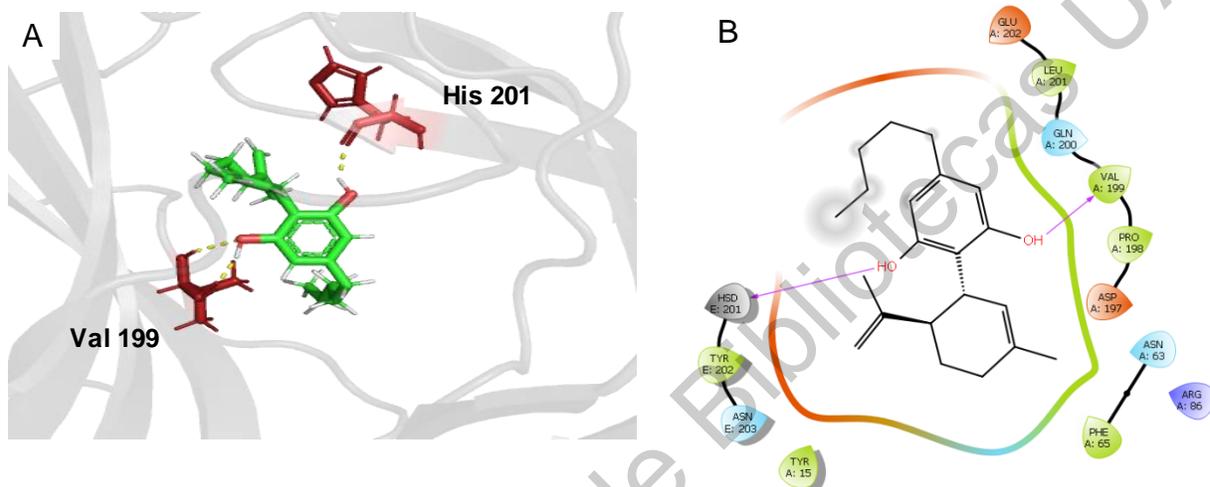


Figura 53. Conformación representativa del complejo GLICINA-CBD durante la simulación de dinámica molecular A) Conformación tridimensional B) Diagrama de interacción bidimensional

Por otra parte, las conformaciones de menor y mayor afinidad que se presentan en las Figuras 54 A y B se observó que hay una diferencia relevante en las interacciones que se produjeron en ambas conformaciones, en el caso de la conformación de mayor afinidad se observaron interacciones de puente de hidrógeno con la Tyr231 y la Glu180 , además de dos interacciones iónicas con la Lys226 y la Glu180 que se observan en la Figura 54 D, y en la conformación de menor afinidad se presentaron solamente una interacción de puente de hidrógeno y un enlace iónico con la Lys226 que se observa en la Figura 54 C. Esta diferencia de interacciones parece ser la razón por lo cual se presentaron conformaciones con una mayor afinidad y una menor afinidad durante el tiempo de simulación.

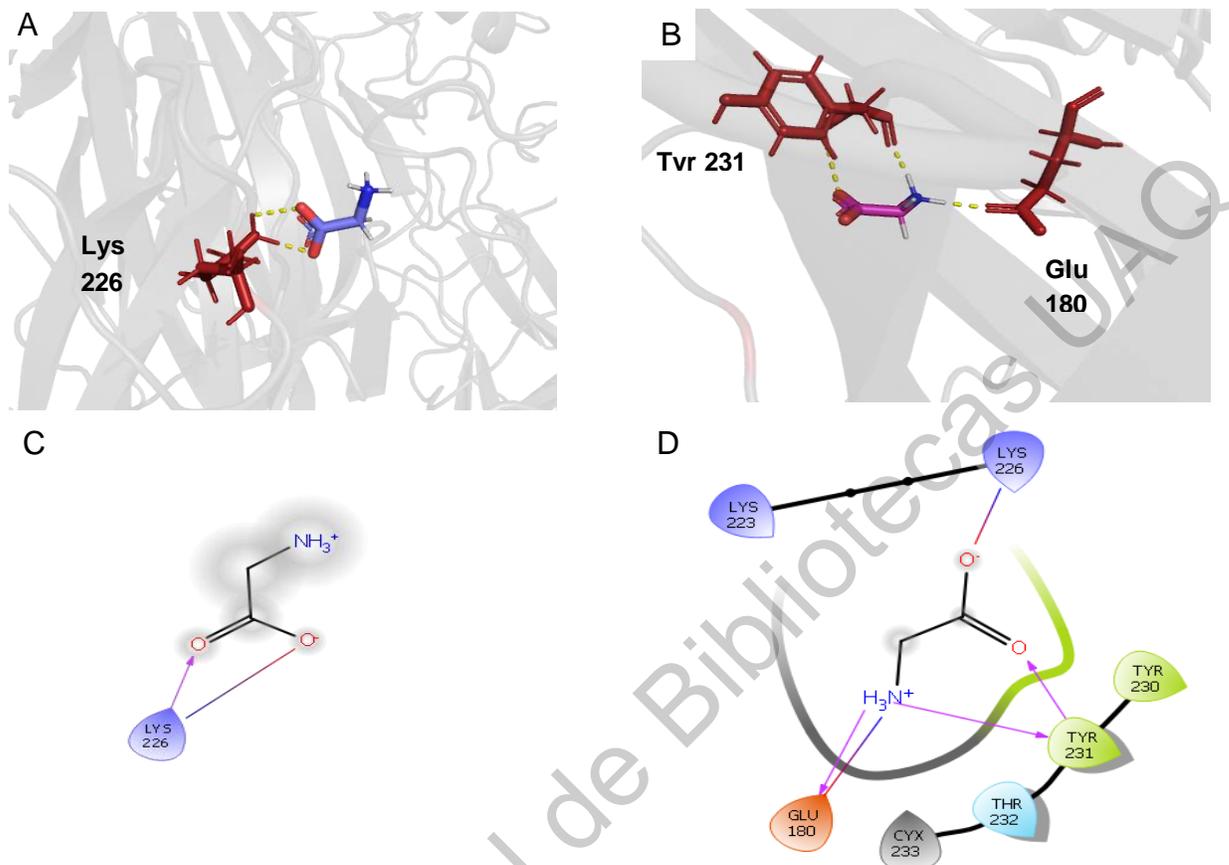


Figura 54. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo GLICINA-GLY durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 8750 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 3750 a 5200 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

De acuerdo a los resultados de dinámica molecular, tanto el cannabidiol como la glicina no fueron capaces de producir un cambio conformacional en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$ relevante que estuviera correlacionado con la activación de este receptor; por otra parte, se tiene reportado que el cambio conformacional relacionado con la activación del receptor, está dado por el movimiento del segmento transmembranal 2 del receptor, lo que provoca el desplazamiento del aminoácido Pro266, lo que tiene como resultado una orientación más simétrica de los segmentos transmembranales 2 del poro del receptor permitiendo la apertura

del poro y por lo tanto la permeabilidad de los iones Cl^- hacia el interior de las neuronas. Sin embargo, este fenómeno se presentó en un tiempo de simulación de 200 000 ps en una corrida final de 300 000 ps (Cerdan, 2018), por lo que al parecer nuestros tiempos de simulación de 10000 ps fueron insuficientes para observar algún cambio relacionado con el fenómeno de activación del receptor.

Cabe aclarar que la dinámica reportada correspondió a un receptor de glicina de tipo α por lo que área de estudio del receptor de glicina de tipo $\alpha 1\beta$ es prometedor para llevar acabo más estudios computacionales y experimentales, para elucidar un mecanismo molecular asociado con la activación de este receptor por parte de cannabidiol y glicina.

Por último, consideramos que la extensión del tiempo de simulación hasta los 300 000 ps con el cannabidiol y la glicina sería importante para observar cambios relevantes en el receptor de glicina $\alpha 1\beta$.

7.5.6. Complejos de la subunidad $\alpha 1\text{G}$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T

Las dinámicas de los complejos del receptor de calcio dependiente de voltaje de tipo T demostraron ser estables en los parámetros termodinámicos de energía total, temperatura presión, volumen, densidad, RMSD como se muestra en la Figura 68 del Anexo, por lo tanto, se consideraron confiables. En los valores de diferencia de RMSF que se presentan en la Figura 55, se observaron ciertas regiones de la proteína que sufrieron cambios importantes con respecto a la proteína sola, estas regiones comprendieron de 400-750,1000-1250 y de 1900-2377 aminoácidos.

Las regiones antes mencionadas que corresponden a las regiones intracelulares de la proteína tuvieron comportamientos similares en presencia de los ligandos cannabidiol y etosuximida, ya que se presentó una disminución en los valores de diferencia de RMSF y por lo tanto una disminución en el grado de movimiento de la proteína.

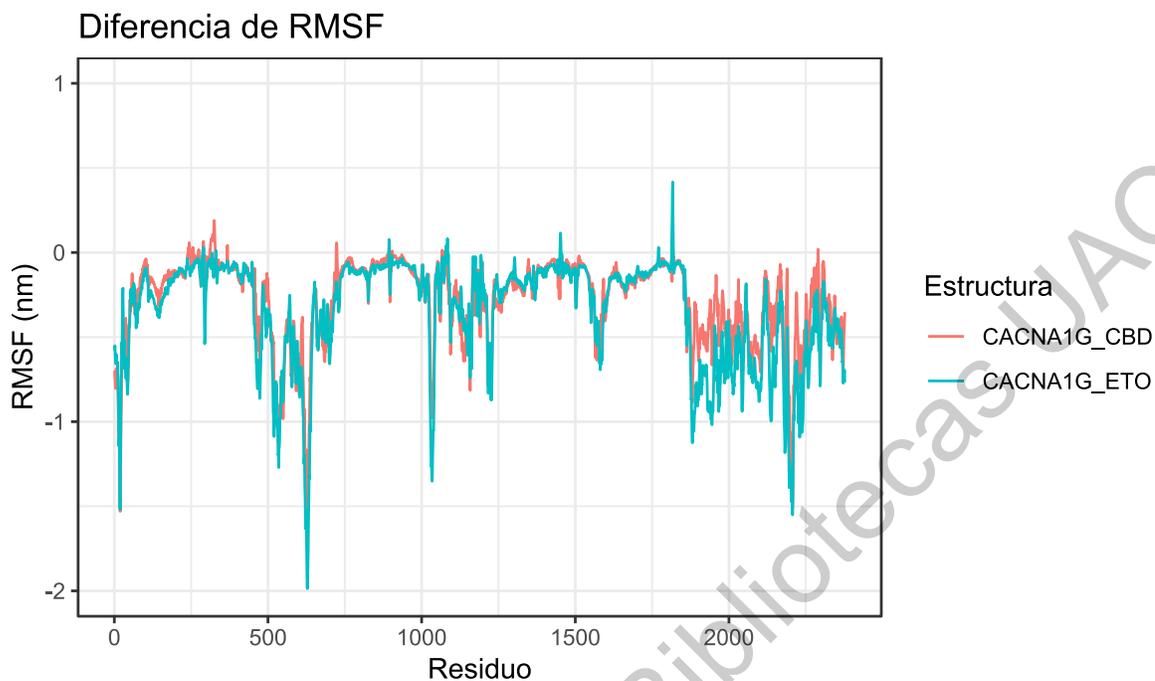


Figura 55. Valores de diferencia de RMSF de los complejos CACNA1G-CBD y CACNA1G-ETO. CBD: cannabidiol, ETO: etosuximida

Por otra parte, la energía de interacción lineal presentada en la Figura 56 demostró que el complejo CACNA1G-cannabidiol sufrió de variaciones importantes para este valor en donde en el lapso de 0-2500 ps presentó los valores más negativos y por lo tanto de mayor afinidad, en contraste en el lapso de 7500-10000 ps los valores de energía de interacción lineal fueron los más positivos y por lo tanto la afinidad disminuyó. En el caso del complejo CACNA1G-etosuximida se observa una tendencia positiva de los valores y por lo tanto una pérdida de afinidad del ligando en el lapso de 0-2500 ps y en el lapso de 5000 a 6250 ps se presentaron los valores más negativos y por lo tanto de mayor afinidad.

Para el complejo CACNA1G-cannabidiol la conformación de menor afinidad no presentó ninguna interacción, como se observa en las Figuras 57 A y C. En cambio, la conformación de mayor afinidad si presentó interacciones de tipo de puente de hidrógeno por parte de un grupo hidroxilo con los aminoácidos Leu1386 y Arg1390,

estas interacciones explicarían la diferencia de afinidad entre ambas conformaciones.

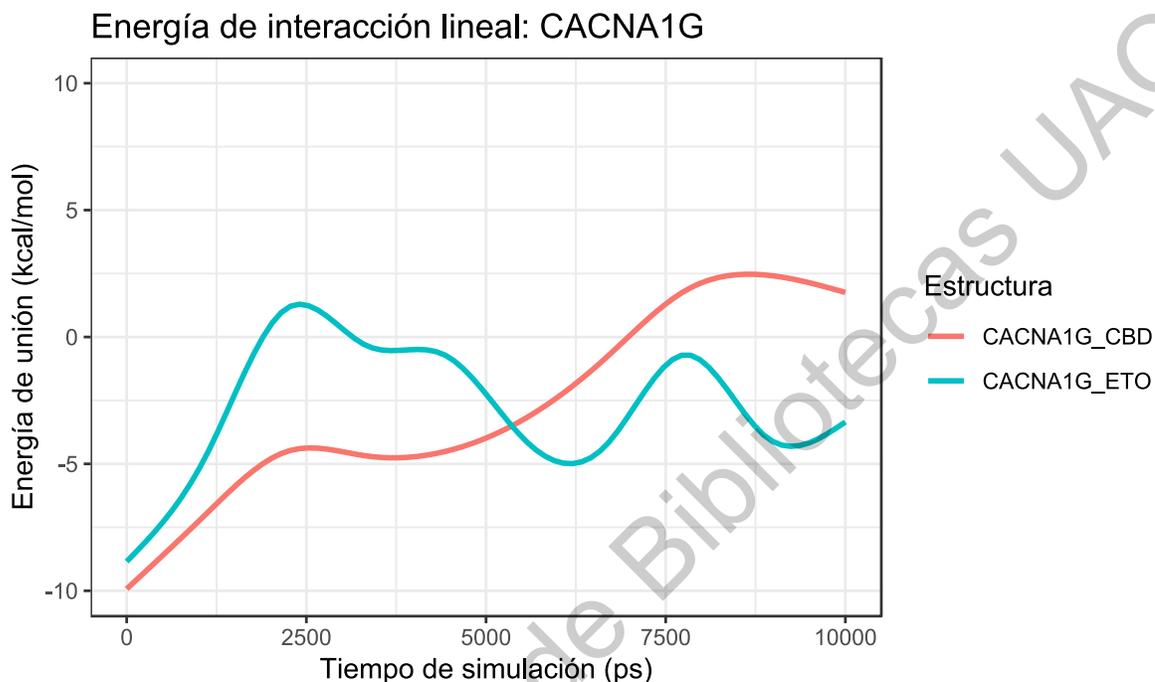


Figura 56. Valores de energía de interacción lineal (LIE) de los complejos CACNA1G-CBD y CACNA1G-ETO. CBD: cannabidiol, ETO: Etosuximida

Por otra parte, como se puede observar en las Figuras 57 B y D, el entorno del sitio de unión de cannabidiol contiene varios aminoácidos hidrofóbicos lo que ayuda a la unión de este ligando con el canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T. Comparando estos resultados con los acoplamientos moleculares, se puede observar que las interacciones con la Leu1386 y Arg1390 se conservaron en la conformación de mayor afinidad de la dinámica molecular, por lo que ambas interacciones podrían contribuir a una mayor afinidad del cannabidiol con la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T.

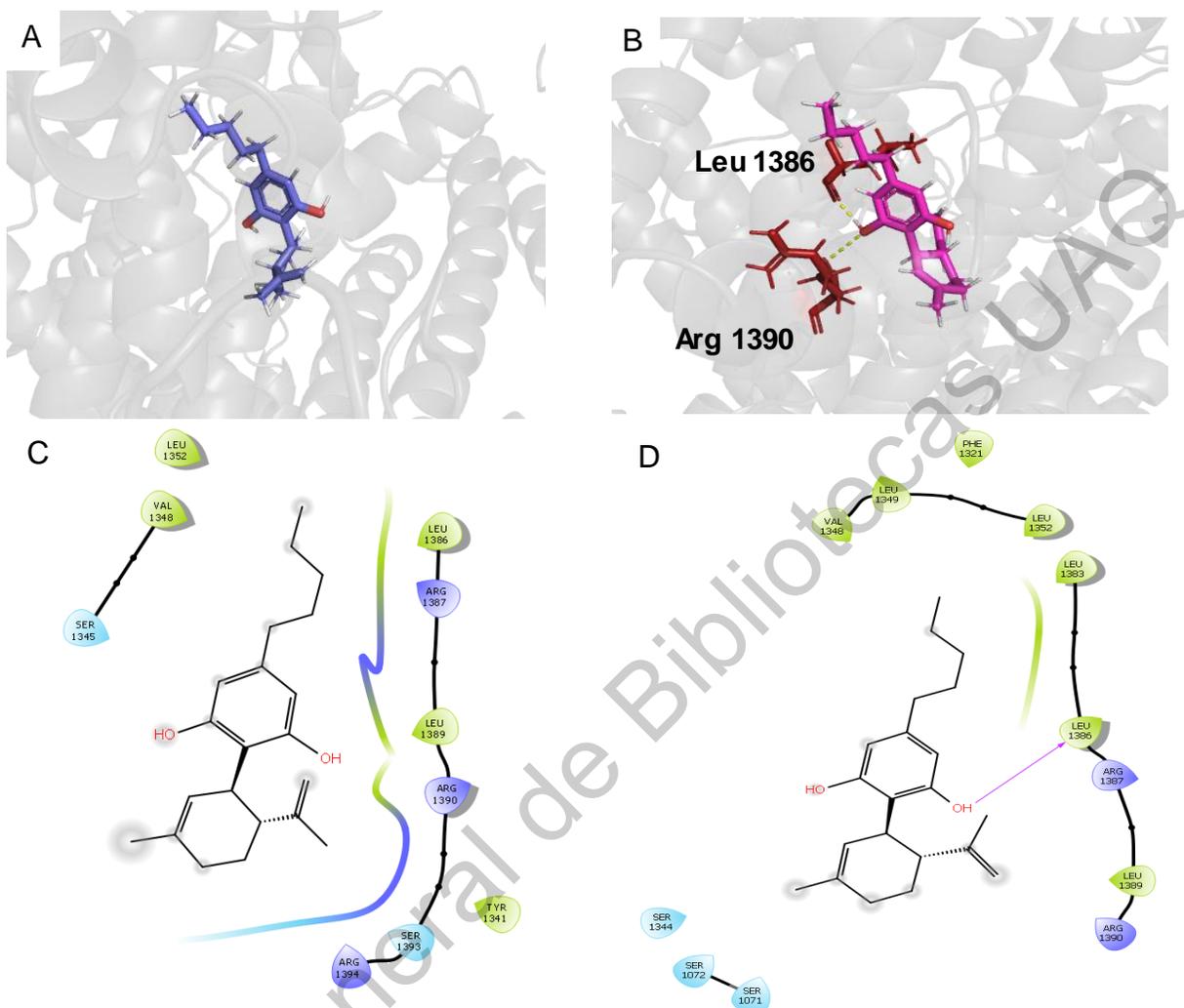


Figura 57. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo CACNA1G-CBD durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 7500 a 10000 ps, B) Conformación representativa del lapso de 0 a 2500 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Por otra parte, las conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T-etosuximida, presentadas en la Figuras 58 A y B, mostraron que en la de mayor afinidad si se presentaron interacciones de tipo de puente de hidrógeno con la Arg1387, en cambio en la de menor afinidad, no se presentó ninguna interacción, esta diferencia

parece ser la clave de la diferencia de afinidad entre las conformaciones de menor y mayor de afinidad. En las Figuras C y D correspondientes a los diagramas de interacción bidimensionales también se puede observar que la conformación de menor afinidad no se encontró cerca de la Arg1387 y por lo tanto no pudo interactuar con este aminoácido; en contraste, la conformación de mayor afinidad si se posicionó lo suficiente con este aminoácido para producir una interacción; esta diferencia también parece influir en la afinidad de las conformaciones.

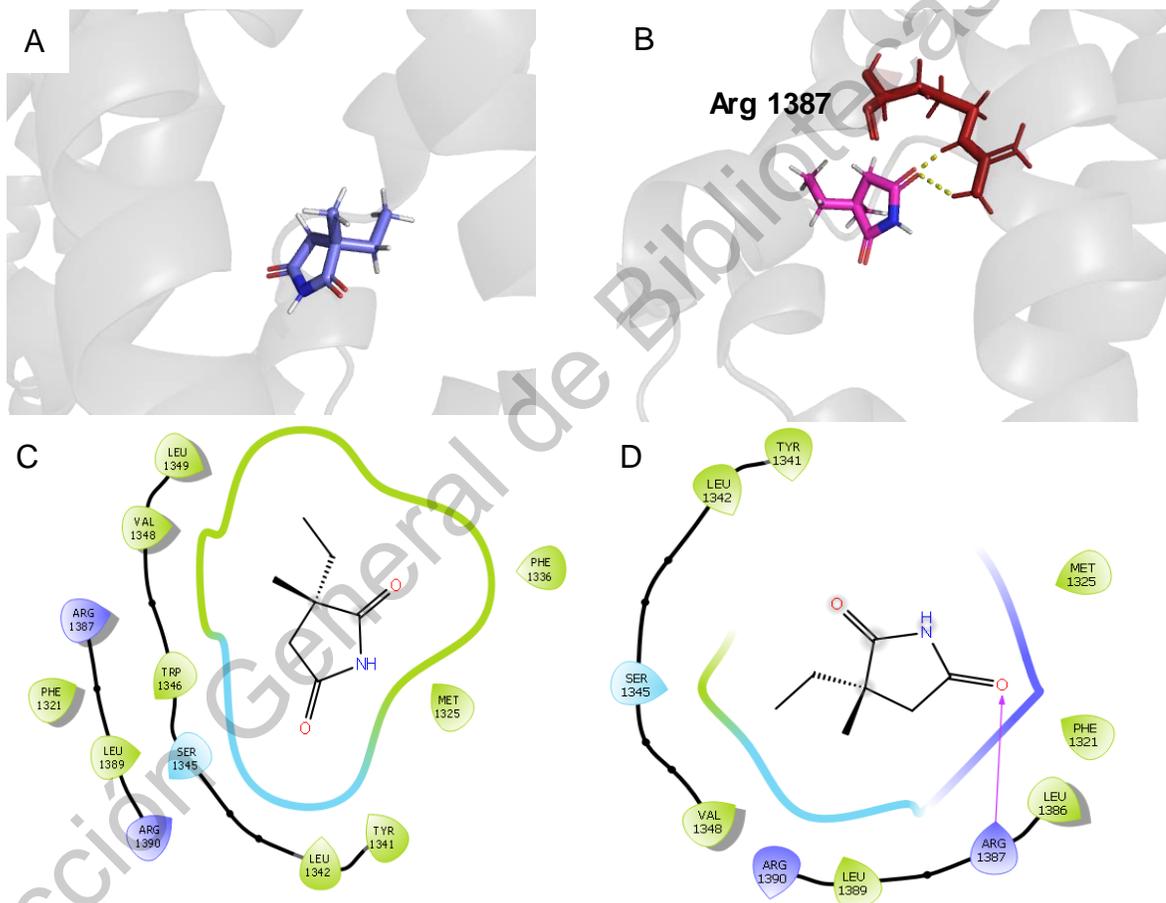


Figura 58. Conformaciones de menor y mayor afinidad del complejo CACNA1G-ETO durante la dinámica molecular: A) Conformación representativa del lapso de 0 a 2500 ps, B) Conformación representativa del lapso de 5000 a 6250 ps C) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de menor afinidad D) Diagrama de interacción bidimensional del complejo de mayor afinidad

Los resultados sugieren que cannabidiol y la etosuximida podrían compartir un mismo sitio de unión, ya que este sitio está conformado por aminoácidos hidrofóbicos, además de los aminoácidos Arg1387 y Arg1390 y Leu1386 que interactúan por medio de puentes de hidrógeno, con los grupos hidroxilo del cannabidiol y carbonilo de la etosuximida. Ambos ligandos se tienen reportados como inactivadores de este canal evitando la entrada de Ca^{2+} a las neuronas y por lo tanto la hiperexcitabilidad de estas, por lo que su eficacia contra las crisis de ausencia está demostrada (Ross y col., 2008).

El mecanismo por el cual se inactiva este canal no parece estar del todo claro, sin embargo, estudios han demostrado que el dominio de unión de los segmentos transmembranales uno y dos parece actuar como una “tapa” que bloquea el poro del canal. Adicionalmente, las interacciones intramoleculares con el *loop* del dominio tres y cuatro, o la asociación del dominio de unión de los segmentos uno y dos con la subunidad β pueden, restringir la movilidad del canal y por lo tanto favorecer la inactivación (Zamponi y An, 2013).

El proceso de inactivación antes descrito no pudo ser observado en el tiempo de simulación de las dinámicas de los complejos, por lo que la extensión del tiempo de simulación parece ser la clave para observar un cambio conformacional relacionado con la inactivación del receptor, además, el llevar a cabo la construcción del complejo con la subunidad β la cual parece tener relevancia en el proceso de inactivación sería importante para corroborar el mecanismo de inactivación propuesto.

7.6. Modelo de interacción del cannabidiol

Por último, se propone un modelo de interacción general de cannabidiol con las dianas biológicas que seleccionamos, relacionado con su actividad anticonvulsiva representado en la Figura 59; con base en la bibliografía consultada y a los resultados obtenidos de este trabajo, dicho modelo es descrito en los siguientes pasos:

1. El cannabidiol interactúa con los aminoácidos Cys159 y Asp 379 de la parte intracelular de la proteína vesicular SV2A, la interacción provoca una disminución del grado de movimiento de la parte *N*-terminal, que podría modificar las interacciones con la sinaptotagmina-1, lo cual podría resultar en una regulación de la formación de las interacciones de sinaptotagmina-1, con las proteínas de la membrana y por lo tanto de la excitosis mediada por la entrada Ca^{2+} .
2. En el caso de la FAAH, el cannabidiol no puede penetrar hacia el sitio catalítico y llevar a cabo una acción inhibitoria competitiva con la anandamida, esto es debido a la presencia de los aminoácidos Phe192 y Met495 los cuales impiden la entrada de cannabidiol. Se propone por trabajos experimentales que cannabidiol actúa como un inhibidor de las proteínas transportadoras FABP 3, 5 y 7, lo cual no permite el paso de la anandamida hacia el interior de la célula para poder ser degradada por la FAAH, esto resulta en una disponibilidad mayor de este endocannabinoide el cual puede llevar a cabo un efecto regulador de la sinapsis mediado por la activación del receptor CB1.
3. El cannabidiol actúa como un antagonista competitivo no específico de GPR55 al situarse en el sitio de unión de agonistas/antagonistas e interactuar con la Ser178, esto provoca un impedimento estérico al cambio conformacional de los aminoácidos Ser104 y Phe239, los cuales están involucrados con la activación del receptor, esto tiene como resultado la inactivación de la cascada de señalización mediado por las proteínas Rho-

GEF/RhoA/PLC/IP3, lo cual impide la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y por lo tanto se produce una regulación de la sinapsis.

4. Para el receptor TRPV1 el cannabidiol se situó en el mismo sitio de la capsaicina y se observó una interacción con la Tyr511 en los acoplamientos moleculares y otra interacción con la Ile173, de otros trabajos experimentales se deduce que el cannabidiol actúa como un activador y desensibilizador del receptor, lo que impide la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} lo cual resulta en una regulación de la sinapsis.
5. El cannabidiol actúa como un activador del receptor de glicina $\alpha 1\beta$ e interactuó con Val199 y la His201. A falta de más estudios, se propone que el cannabidiol, puede provocar un cambio conformacional del segmento transmembranal 2 C, lo que tendría como resultado una abertura del poro y la permeabilidad de los iones Cl^{-} , provocando una hiperpolarización de la membrana neuronal.
6. El cannabidiol actúa como un inhibidor de la subunidad $\alpha 1\text{G}$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, se identificaron las interacciones Leu1386 y Arg1390 en los acoplamientos moleculares y un mismo sitio de unión con el fármaco anticonvulsivo ethosuximida, la inactivación de este canal impide la entrada de Ca^{2+} y por lo tanto se lleva a cabo una regulación liberación de neurotransmisores.

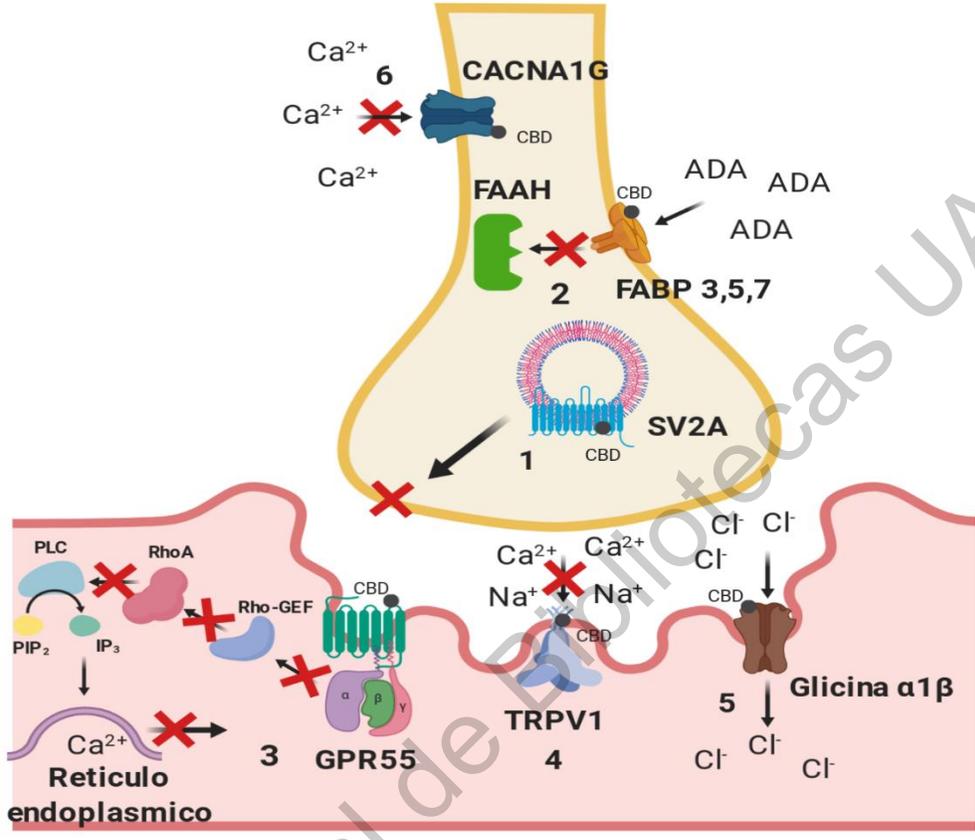


Figura 59. Propuesta de mecanismo anticonvulsivo del cannabidiol.

8. CONCLUSIONES

- Los diagramas de interacción metabólico y de porcentaje de similitud estructural permitieron identificar a las dianas biológicas relacionadas con la epilepsia más relevantes, de acuerdo a su número de interacciones con otras dianas, el acercamiento entre los nodos de las dianas biológicas y las interacciones con fármacos antiepilépticos; las dianas biológicas más relevantes seleccionadas, fueron la proteína vesicular SV2A, la enzima FAAH, y los receptores GPR55, TRPV1, glicina $\alpha 1\beta$, y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje.
- Los modelos tridimensionales construidos y obtenidos de las dianas biológicas relacionadas con la epilepsia cumplieron con los criterios de calidad, obtenidos de los servidores web y de los aminoácidos favorecidos para los diagramas de Ramachandran, por lo tanto, los modelos construidos resultaron ser confiables.
- Las dinámicas moleculares realizadas a los modelos tridimensionales fueron estables en un tiempo de simulación de 50 ns para los parámetros termodinámicos de temperatura, presión, densidad, volumen, energía total y RMSD, además la aplicación de este proceso mejoró el porcentaje de los aminoácidos favorecidos en los diagramas de Ramachandran.
- Los análisis de cavidades y acoplamientos moleculares permitieron conocer sitios de unión favorables para el cannabidiol, en donde la mayoría coincidieron con los sitios de unión de ligandos endógenos y exógenos propios de cada diana biológica (FAAH, GPR55, TRPV1, subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T), además los sitios de unión localizados para el cannabidiol estuvieron conformados en su mayoría por aminoácidos no polares, que favorecieron la unión del cannabidiol en esos sitios.
- Las dinámicas moleculares de los complejos de SV2A, FAAH, GPR55 mostraron cambios conformacionales de las dianas biológicas que se

podieron relacionar con una posible actividad anticonvulsiva. Por otra parte, en los complejos de TRPV1, receptor de glicina $\alpha 1\beta$, y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, no se observó algún cambio conformacional relacionado con alguna actividad anticonvulsiva, debido a que necesitan más tiempo de simulación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo deja una gran área de oportunidad para llevar a cabo estudios que puedan complementarlo, algunos que se pueden realizar posteriormente son los siguientes:

- Incluir parámetros toxicológicos e información de dosis del cannabidiol y de fármacos anticonvulsivos en la construcción de los diagramas de interacción para obtener diagramas más completos y con mayor confiabilidad para la selección de otras dianas biológicas relacionadas con la epilepsia.
- Llevar a cabo la construcción del complejo SV2A-sinaptotagmina para someterlo a acoplamiento molecular con cannabidiol y simulaciones de dinámica molecular, para determinar las interacciones y mecanismos que puedan estar correlacionados con alguna actividad anticonvulsiva.
- Realizar los acoplamientos moleculares de la enzima FAAH sin la fosforilación del aminoácido Ser241, para determinar si hay una diferencia en las interacciones y cambios conformacionales que se pudieran presentar con respecto a la enzima fosforilada.
- Construir el complejo GPR55-proteína G, para llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular con cannabidiol y dinámica molecular y agonistas/antagonistas de este receptor, para poder observar cambios conformacionales asociados a la separación de las subunidades α β y γ .
- Extender el tiempo de simulación hasta los 250 000 ps de las dinámicas moleculares de los complejos de TRPV1, el receptor de glicina $\alpha 1\beta$ y la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T, para observar cambios conformacionales que pudieran estar correlacionados con alguna actividad anticonvulsiva.
- Construir el complejo del canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje de tipo T con las subunidades β , γ , $\alpha 2\delta$ y someterlo a acoplamiento molecular con cannabidiol y la etosuximida, así como simulaciones de dinámica molecular para poder observar un mecanismo completo de inactivación.

10. REFERENCIAS

Aguayo-Ortiz R., Méndez-Lucio O., Medina-Franco J. L., Castillo R., Yépez-Mulia L., Hernández-Luis F., Hernandez-Campos A., (2013). Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 41:12-19.

Ahn K., Johnson D. S., Mileni M., Beidler D., Long J. Z., McKinney M. K., Weerapana E., Sadagoapon N., Liimatta M., Smith S. E., Lazerwith S., Stiff C., Kamtekar S., Bhattacharya K., Zhang Y., Swaney S., Van Becelaere K., Stevens R. C., Cravatt B. F., (2009) Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chem. Biol.* 16: 411-420.

Ahrens J., Demir R., Leuwer M., de la Roche J., Krampfl K., Foadi N., Karst M., Haeseler G., (2009) The nonpsychotropic Cannabinoid Cannabidiol Modulates and Directly Activates Alpha-1 and Alpha-1-Beta Glycine Receptor Function, *Pharmacology* 83:217-222.

An M. T., Zamponi G. W., (2013) Voltage-Dependent Inactivation of Voltage Gated Calcium Channels, *Bioscience* 13: 1-10.

Ángeles López G. E., Brindis F., Niizawa S. C., Ventura Martínez R., (2014). Cannabis sativa L., una planta singular, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 45:1-6.

Bell G., Neligan A., Sander J., (2014). An unknown quantity: The worldwide prevalence of Epilepsy, *Epilepsia*, 55:958-962.

Bergamaschi M. M., Costa Queiroz R. H., Crippa J. A., Waldo Zuardi A., (2011). Safety and Side Effects of Cannabidiol, a *Cannabis sativa* Constituent, *Current Drug Safety* 6: 1-12.

Bian Y., He X., Jing Y., Wang L., Wang J., Xie X., (2018)., Computational systems pharmacology analysis of cannabidiol: a combination of chemogenics-

knowledgebase network analysis and integrated *in silico* modeling and simulation, *Acta Pharmacologica Sinica* 0:1-13.

Bian Y., Song C., Cheng K., Dong M., Wang F., Huang J., Sun D., Wang L., Ye M., Zou H., (2013). An enzyme assisted RP-RPCL approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome, *Journal of Proteomics* 96: 253-262.

Bih I. C., Chen T., Nunn A. V. W., Bazetot M., Dallas M., Whalley B. J., (2015). Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders, *Neurotherapeutics* 12: 699-730.

Bracey M. H., Hanson M. A., Masuda K. R., Stevens R. C., Cravatt B. F., (2002). Structural Adaptations in a Membrane Enzyme That Terminates Endocannabinoid Signaling, *Science* 298: 1793-1796.

Bueno-Valenzuela S., Cruz-Alcalá L. E., (2014). Epidemiología. Cap. 2. En: *Epilepsia* Ed. PyDESA, México D.F. 236-238.

Cerdan A. H., Martin N. E., Cecchini M., (2018). An Ion- Permeable State of the Glycine Receptor Captured by Molecular Dynamics, *Cell* 26: 1-8.

Chavez-Elias A. F., (2018). "Síntesis y actividad antiepiléptica de pirrolidonas 1,4-disustituidas". Tesis para el obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico-Biológicas, Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

Correa-Basurto J., Cuevas-Hernandez R. I., Philips-Farfan B. V., Martinez-Archundia M., Romo-Mancillas A., Ramirez-Salinas G. L., Perez-Gonzalez O. A., Trujillo-Ferrara J., Mendoza-Torreblanca J. G., (2015). Identification of the antiepileptic racetam binding site in the synaptic vesicle protein 2A by molecular dynamics and docking simulations, *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 1-12.

Cullingford T., (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and the ketogenic diet, *Epilepsia* 49:70–72.

Darre L., Domene C., (2015) Binding of capsaicin to the TRPV1 Ion Channel, *Mol. Pharm.* 7: 4454-4465.

Dasgupta B., Nakamura H., Higo J., (2016). Flexible binding simulation by a novel and improved version of virtual system coupled adaptative umbrella sampling, *Chemical Physics Letters* 662:327-332.

De Petrocellis L., Ligresti A., Moriello S., Allara M., Bisogno T., Petrosino S., Stott C. G, Di Marzo V, (2010). Effects of cannabinoids-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzyme, *British Journal of Pharmacology* 163: 1479-1494.

Devinsky O., Cilio M. R., Cross H., Fernandez-Ruiz J., French J., Hill C., Katz R., (2014). Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders, *Epilepsia* 55: 791-802.

Devinsky O., Marsh E., Friedman D., Thiele E., Laux L., Sullivan J., Miller I., Flamini R., Wilfong A., Filloux F., Wong M., Tilton N., Bruno P., Bluvstein J., Hedlund J., Kamens R., Maclean J., Nangia S. , Singhal N.S., Wilson C.A., Patel A., Cilio M. R., (2016), Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial, *Lancet Neurol.*, 15: 270-278.

Diario Oficial de la Federación, (2017). Página electrónica: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5487335&fecha=19/062017, consultado el 21 de septiembre del 2017.

Degenhart F., Stehle F., Kayser O., Preedy V.R., (2016). The biosynthesis of Cannabinoids. Cap. 2. En: The handbook of cannabis, and related pathologies, biology, pharmacology diagnosis, and treatment Ed. Elsevier, Estados Unidos, California 18-19.

Elmes M. W., Kaczocha M., Berger W. T., Leung K., Ralph B. P., Wang L., Sweeney J. M., Miyauchi J. T., Tsirka S. E., Ojima I., Detuchs D. G., (2015). Fatty-Acid binding proteins (FABPs) are Intracellular Carriers for Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), *The Journal of Biological Chemistry*, 290: 8711-8721.

Elsohly M., Gul W., Pertwee R. G., (2014). Constituents of Cannabis sativa. Cap. 1. En: Handbook of Cannabis, Ed. Oxford university press, Reino Unido, Oxford. 3.

Farag S., Kayser O., Preedy V.R., (2016), The *cannabis* plant: botanical aspects. Cap. 1. En: The handbook of cannabis, and related pathologies, biology, pharmacology diagnosis, and treatment, Ed. Elsevier, Estados Unidos, California 3.

Feza F., Maccarrone M., Di Marzo V., (2014). Endocannabinoid biochemistry: what do we know after 50 years?. Cap. 3. En: Cannabinoids, Ed. Wiley Blackwell, Reino Unido, Oxford. 54-64.

Fernandez-Ruiz J., Hernandez M., Garcia-Movellan Y., Di Marzo V., (2014). Cannabinoids and the brain: New hopes for new therapies. Cap. 6. En: Canabinoids, Ed. Wiley Blackwell, Reino Unido, Oxford 178.

Fisher R., (2017). The New Classification of Seizures by the International League Against Epilepsy 2017, *Curr.Neurol. Neurosci. Rep.*, 17-48.

Florez J., (2014). Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivos. Cap. 29. En: Farmacología Humana, Ed. Elsevier-Masson, España, Santander 479, 482.

Gilbert A., (2011). Introduction to computational chemistry: theory. Página electrónica: <http://rsc.anu.edu.au/~agilbert/gilbertspace/uploads/Chem3023.pdf>, consultado el 17 de octubre del 2017.

Grudzinska J., Schemm R., Haeger S., Nicke A., Schmalzing G., Betz H., Laube B., (2005). The β subunit Determinates the ligand Binding Properties of Synaptic Glycine Receptors, *Neuron*, 45: 727-739.

Hanson S. M., Newstead S., Swartz K. J., Sansom M. S. P., (2015). Capsaicin Interaction with TRPV1 Channels in a Lipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulation, *Biophysical journal*, 108:1425-1434.

Hansen H., Kleberg K., Hassing H. A., Di Marzo V., (2014). Non endocannabinoid N-acyl ethanolamines and monoacylglycerols: old molecules new targets. Cap. 1. En:

The Endocannabinoidome, the World of Endocannabinoids and Related Mediators, Ed. Elsevier, Estados Unidos, California, 1-2.

Hubbard R. E., Cohen C., (1996). Molecular graphics and modeling: tools of the trade. Cap. 1. En: Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design, Ed. Elsevier, Suiza, Basilea 45.

Iannotti F.A., Hill C.L., Leo A., Alhusaini A., Soubrane C., Mazzarella E., (2014). Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *Chem. Neurosci.*,5:1131–41.

Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W., (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29:1859-1865. página electrónica en: <http://www.charmm-gui.org/?doc=lecture>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Jurcik A., Bednar D., Byska J., Marques S. M., Furmanova K., Daniel L., Kokkonen P., Brezovsky J., Strnad O., Stourac J., Pavelka A., Manak M., Damborsky J., Kozlikova B., (2018). CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories., *Bioinformatics*,34: 3586-3588.

Kostikorou E., Sharir H., Shore D. M., Hurst D. P., Lynch D. L., Madrigal K. E., Heynen-Genel S., Milan L. B., Chung T. D. Y., Seltzman H. H., Bai Y., Caron M. G., Barak L. S., Croatt M. P., Abood M. E., Reggio P. H., (2013). Identification of the GPR55 Antagonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands, *Biochemistry*52: 9456-9469.

Krieger E., Nabuurs S. B., Vriend G., (2005). Homology Modeling, Cap. 25. En: Structural Bioinformatics, Ed. Wiley, Estados Unidos 507, 508.

Kuzu G., Kezkin O., Gursoy A., Nussinov R., Baron R., (2012). Expanding the conformational selection paradigm in protein-ligand docking. Cap. 5. En: Computational Drug Discovery and Design, Ed. Springer, Estados Unidos, Utah 60.

Loscher W., Gillard M., Sands Z., Kaminski R. M., Klitgaard H., (2016). Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond, *CNS Drugs* 30: 1055-1077.

Madeo M., Kovacs A. D., Pearce D. A., (2014). The human Synaptic Vesicle Protein SV2A, Functions as a Galactose Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry* 289: 33066-33071.

Marichal-Cancino B. A., Fajardo-Valdez A., Ruiz-Contreras A. E., Mendez-Diaz M., Prospero-Garcia O., (2017). Advances in the physiology of GPR55 in the Central Nervous System, *Current Neuropharmacology* 15: 771-778.

Marshall G., Beusen D., Burger D., (2002). Molecular modeling in Drug Design. Cap. 3. En: Medicinal chemistry drug Discovery, Ed. Wiley Interscience, Estados Unidos, Virginia 79, 80.

McKinney M. K., Cravatt B. F., (2005). Structure and function of Fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev. Biochem.* 74: 411-432.

Mead A., (2017). The legal status of cannabis and cannabidiol under U.S. law, *Epilepsy and Behavior* 70: 288-291.

Mechoulam R., Di Marzo V., (2014). Looking ahead after 50 years of research on cannabinoids. Cap. 1. En: Cannabinoids, Ed. Wiley Blackwell, Reino Unido, Oxford 6.

Mileni M., Kamtekar S., Wood D. C., Benson T. E., Cravatt B. F., Stevens R. C., (2010). Crystal Structure of Fatty Acid Amide Hydrolase Bound to the Carbamate inhibitor URB597: Discovery of a Deacylating Water Molecule and Insight into Enzyme Inactivation, *J. Mol. Biol.* 400, 743-754.

Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. W., Goodsell D. S., Olson A. J., (2009). Autodock 4 and AutodockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry* 16:2785-2791, página electrónica en: <http://mgltools.scripps.edu/downloads>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Moshe S. L., Perucca E., Ryvlin P., Tomson T., (2014). Epilepsy: New advances, *The Lancet* 14: 1-15.

Muegge I., Enyedy I., Bultinck P., De Winter H., Langenaeker W., (2004), Docking and scoring. Cap. 16. En: Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery, Ed. Marcel Dekker, Estados Unidos, Nueva York 439-444.

Mula M., Sander J., (2016). Psychosocial aspects of epilepsy: a wider approach, *BJPsych. Open* 2:270-274.

Naziroglu M., (2015). TRPV1 channel a potential drug target for treating epilepsy *Current Neuropharmacology*, 13: 239-247.

Noebels J. L., Avoli M., Rogawski M.A., Olsen R., Delgado Escueta A., (2012). Voltaged-Gated Na⁺ Channels: Structure, Function and Pathophysiology, Glutamatergic Mechanism Related to Epilepsy, GABA_A Receptor Function in Typical Absence Seizures. Cap. 2. En: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, Ed. Oxford University Press 41, 163, 327.

Ou-Yang S., Lu J., Kong X., Liang Z., Luo C., Jiang H., (2012). Computational drug discovery, *Acta Pharmacologica Sinica* 33: 1131-1140.

Organización Mundial de la Salud, (2017). Epilepsy. Página electrónica: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>, consultado el 21 de septiembre del 2017.

Programa Prioritario de Epilepsia, (2017). Frecuencia de la epilepsia en México. Página electrónica: <http://www.epilepsiamexico.gob.mx/info-pacientes/frecuencia.htm>, consultado el 21 de septiembre del 2017.

Pronk S., Pall S., Schulz R., Larsson P., Aposlov R., Shirts M., Smith J., Kasson P. M., (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, *Bioinformatics* 29: 845-854.

Ross H. R., Napier I., Connor M., (2008). Inhibition of Recombinant Human T-type Calcium Channel by Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol, *The Journal of Biological Chemistry* 23:16124-16134.

Ryberg E., Larsson N., Sjogren S., Hjorth S., Hermansson N. O., Leonova J., Elbring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P. J., (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor, *British Journal of Pharmacology* 152: 1092-1101.

Sacan A., Ekins S., Kortagere S., Larson R.S., (2012). Applications and limitations of *in silico* models in drug discovery. Cap. 6. En: Bioinformatics and Drug Discovery, Ed. Springer, Estados Unidos, Nueva York 87.

Saffarzadeh F., Eslamizade M.J., Ghadiri T., Modarres Mousavi S.M., Hadjighassem M. Gorji A., (2015). Effects of TRPV1 on the hippocampal synaptic plasticity in the epileptic rat brain, *Synapse* 69: 375-383.

Salazar H., Jara-Oseguera A., Hernandez-García E., Llorente I., Arias-Olguín I. I., Soriano-García M., Islas L. D., Rosenbaum T., (2009). Structural determinants of gating in the TRPV1 channel, *Nature structural and molecular biology* 16: 704-710.

Scheffer E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G. W., Moshe S.L., Nordli D.R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y.H., Zuberi M. S., (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology, *Epilepsia* 58:512-521.

Schivell A., Mochida S., Kensel-Hammes P., Custer K. L., Bajjalieh S. M., (2005). SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site, *Molecular and cellular Neuroscience* 29: 56-64.

Schrodinger, (2017), Maestro 11. Página electrónica en: <https://www.schrodinger.com/maestro>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Shannon P., Markiel A., Ozier O, Baliga S., Wang J., Ramage D., Amin N., Schwilowski B., Ideker T., (2003). Cytoscape: a software environment for integrated

models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.*, 13: 2498-2504, página electrónica en: <http://www.cytoscape.org/>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Sharir H., Console-Bram L., Mundy C., Poppof S., Kapur A., Abood, Mary E., (2012). The endocannabinoid anandamide and vhirodamide modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55, *Neuroimmune Pharmacology* 7:856–865.

Shi J., Anderson D., Lynch B. A., Castaigne J. G., Foerch P., Lebon F., (2011). Combining modelling and mutagenesis studies of synaptic vesicle protein 2A to identify a series of residues involved in racetam binding, *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1341-1347.

Shore D. M., Reggio P. H., (2015). The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55, *Frontiers in Pharmacology* 6: 1-22.

Todorovic S. M., Jevtovic-Todorovic V., (2011). T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies, *British Journal of Pharmacology* 163: 484-495.

Staley K., (2015). Molecular Mechanism of epilepsy, *Nature Neuroscience* 18: 367-372.

Szklarczyk D., Morris J. H., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L. J., von Mering C., (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accesible, *Nucleic Acids Res.* 45:362-368 página electrónica en: <https://string-db.org/>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Targas-Yacubian E. M., Contreras-Caicedo G., Rios-Pohl L., (2014). Evolución de la terapéutica medicamentosa de las epilepsias. Cap. 1. En: Farmacología de las Epilepsias, Ed. ALADE, Brasil, Sao Paulo 51-52.

Téllez-Mosquera J., Campos A. C., (2013). Indicadores epidemiológicos del consumo de *Cannabis*. Cap 1. En: Marihuana Cannabis, Ministerio de Justicia y del Derecho, Colombia, Bogotá 19.

The Uniprot Consortium, (2017). Uniprot: the universal protein knowledgebase Uniprot, *Nucleic Acids Res*, 45:158-169, página electrónica en: <http://www.uniprot.org/>.

Valles-Sanchez A., Rosales Marines L., Serrato Villegas L. E., Farias-Cepeda L., (2014), Métodos y usos de la química computacional, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 6: 16-21.

Vilela L. R., Lima I. V., Kunsch E.B., Pinto H. P., de Miranda A. S., Vieira E. L., de Oliveira, A. C., Moraes M. F., Teixeira A. L., Moreira F. A., (2017). Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylentetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels, *Epilepsy and Behavior* 75: 29-35.

Von Grafenstein S., Fuchs E. J., Liedl K. R., Gorb L., Kuz'min V., Muratov E., (2014). (How to) profit from molecular dynamics-based ensemble docking. Cap. 15. En: *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine*, Ed. Springer, Holanda, Dordrecht 503.

Vyas V. K., Ukawala R. D., Chintha C., (2012). Homology modeling a fast tool for drug Discovery: current perspectives, *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 74: 1-17.

Wan Q., Zhou Z., Thakur P., Vila A., Sherry D., Janz R., Heidelberger R., (2011). SV2 acts via presynaptic calcium to regulate neurotransmitter release, *Neuron* 66: 884-895.

Wallace M. J., Blair R. E., Falenski K. W., Martin B. R., Delorenzo R. J., (2003). The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307:129-137.

Yang F., Zheng J., (2017) Understand spiceness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin, *Protein and Cell* 8: 169-177.

Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y., (2015). The I-TASSER suite: protein structure and function prediction, *Nature Methods* 12: 7-8, página electrónica en: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, consultado el 04 de noviembre del 2017.

Young D. C., (2009). Target characterization. Cap. 4. En: Computational drug design, Ed. Wiley, Estados Unidos 50.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

11.ANEXO

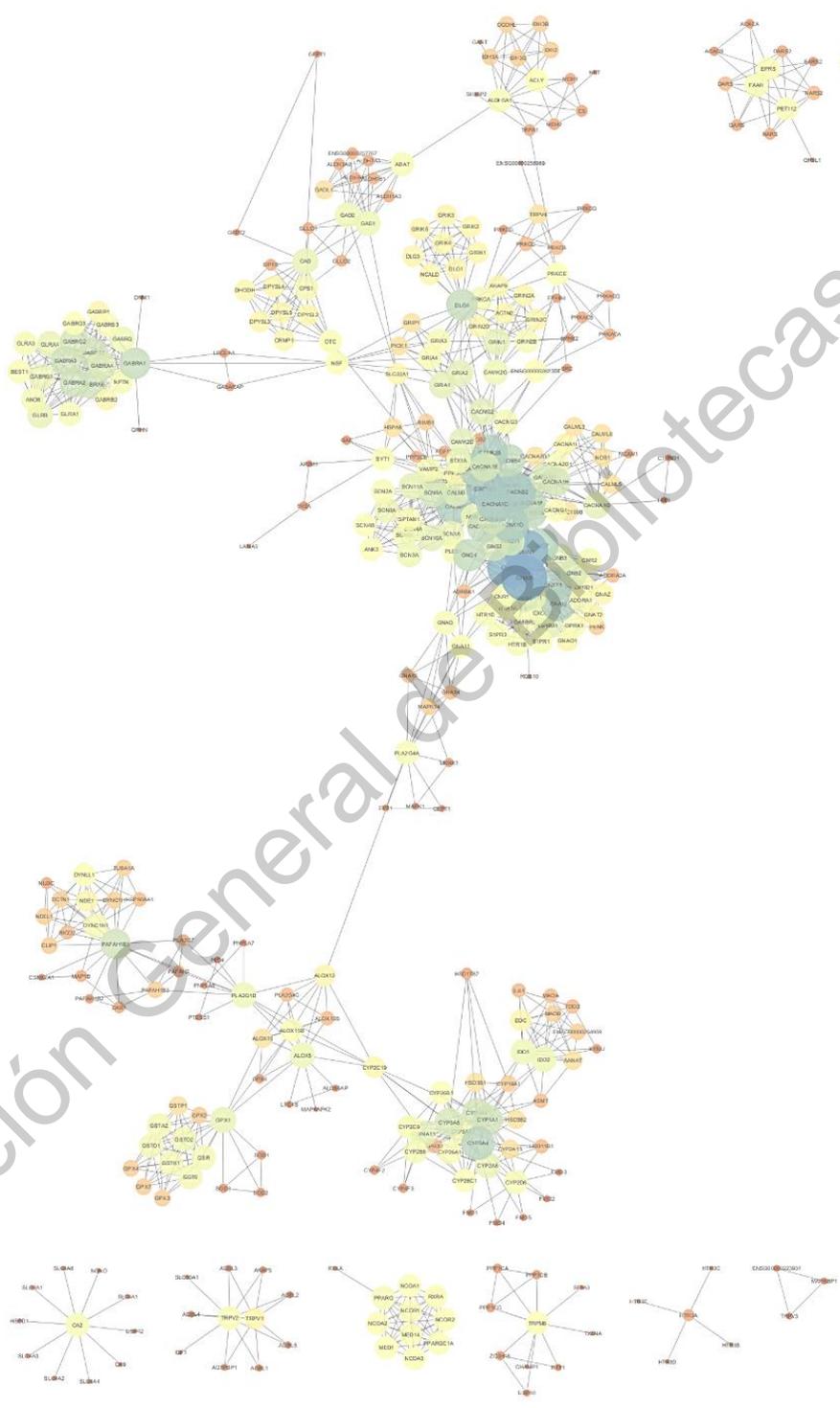


Figura 60. Diagrama de interacción metabólico

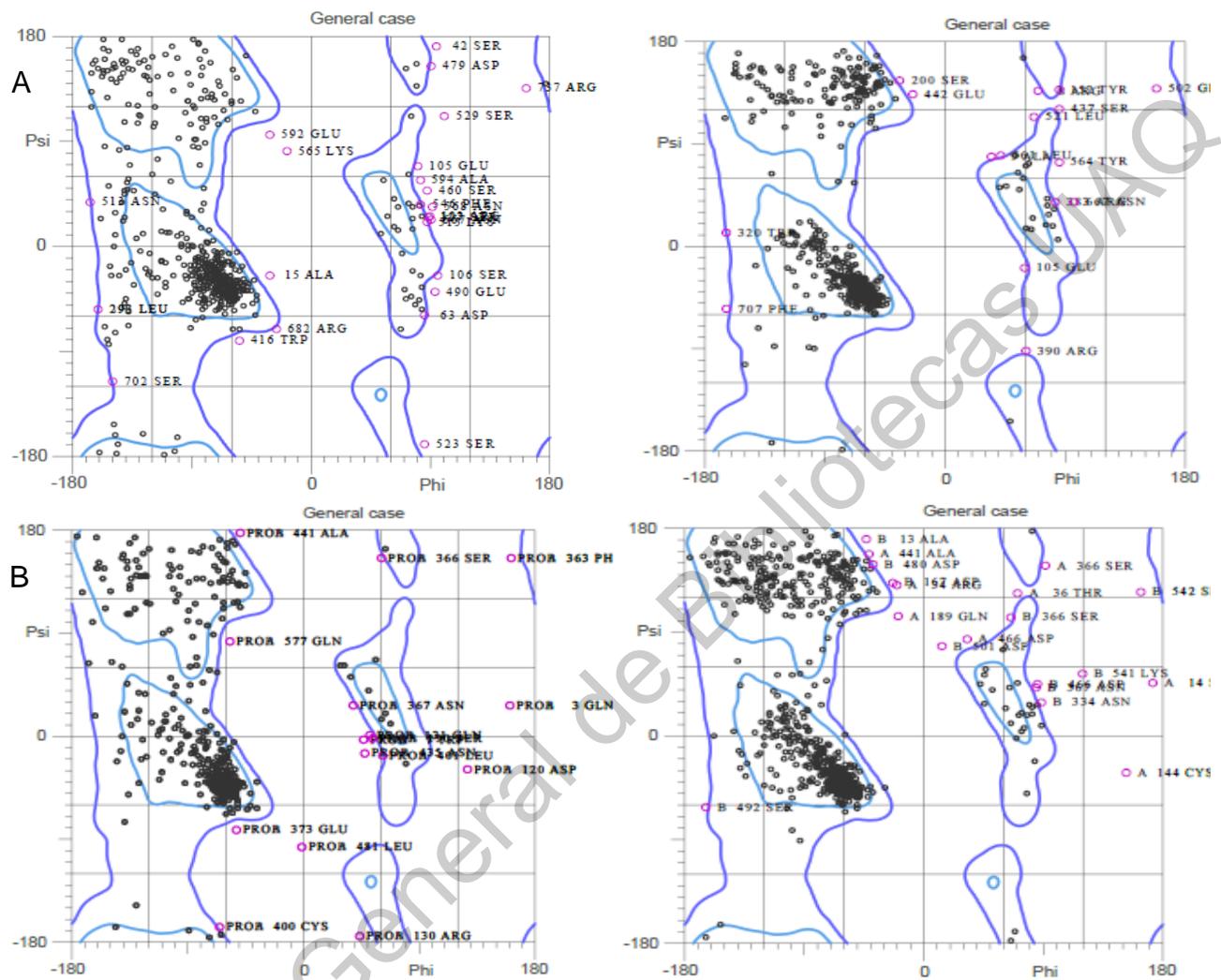


Figura 61. Diagramas de Ramachandran de las dianas biológicas antes (izquierda) y después de la simulación (derecha). A) SV2A B) FAAH.

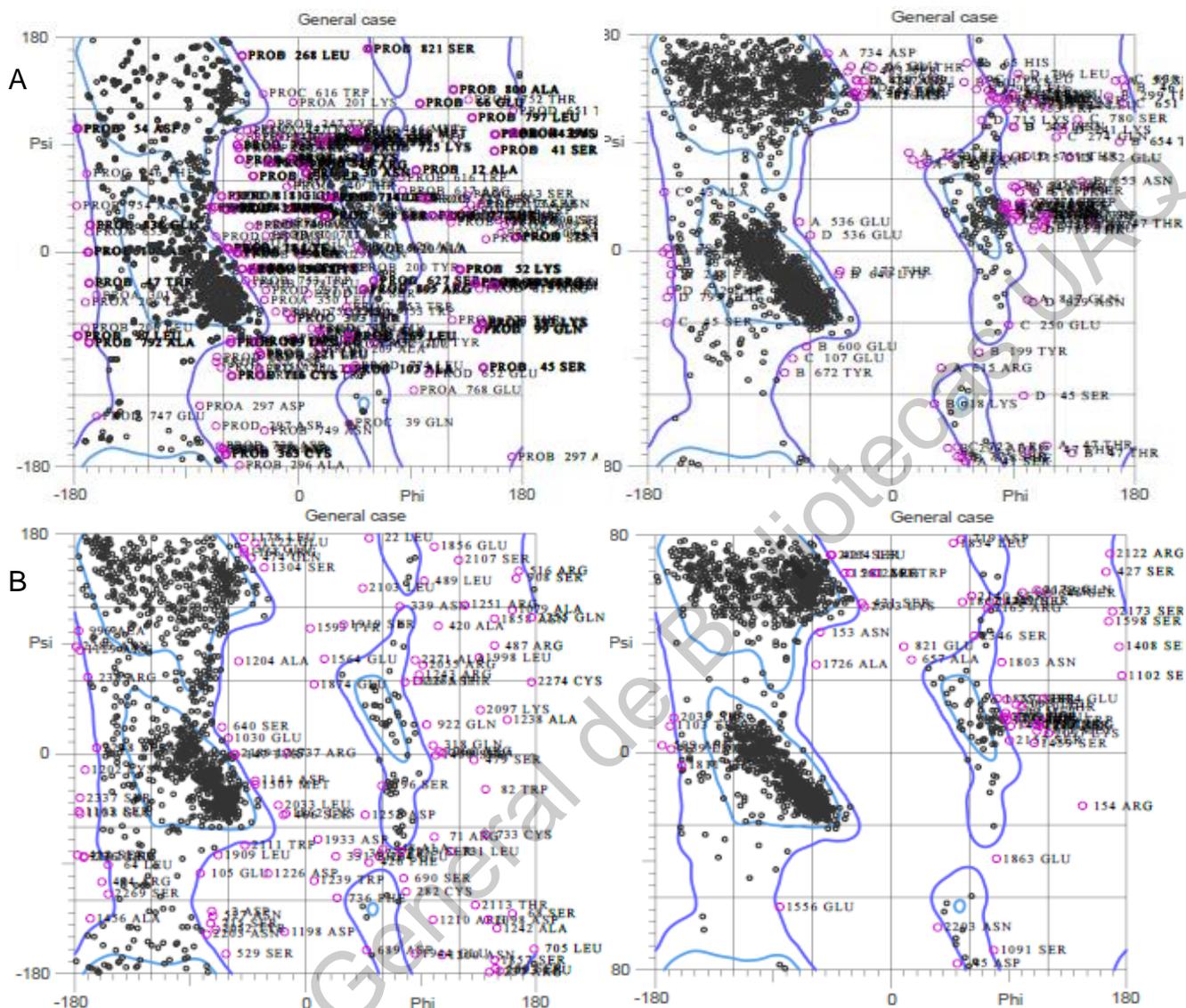


Figura 63. Diagramas de Ramachandran de las dianas biológicas antes (izquierda) y después de la simulación (derecha). A) Receptor de Glicina $\alpha\beta$ B) Receptor de calcio voltaje-dependiente de tipo T.

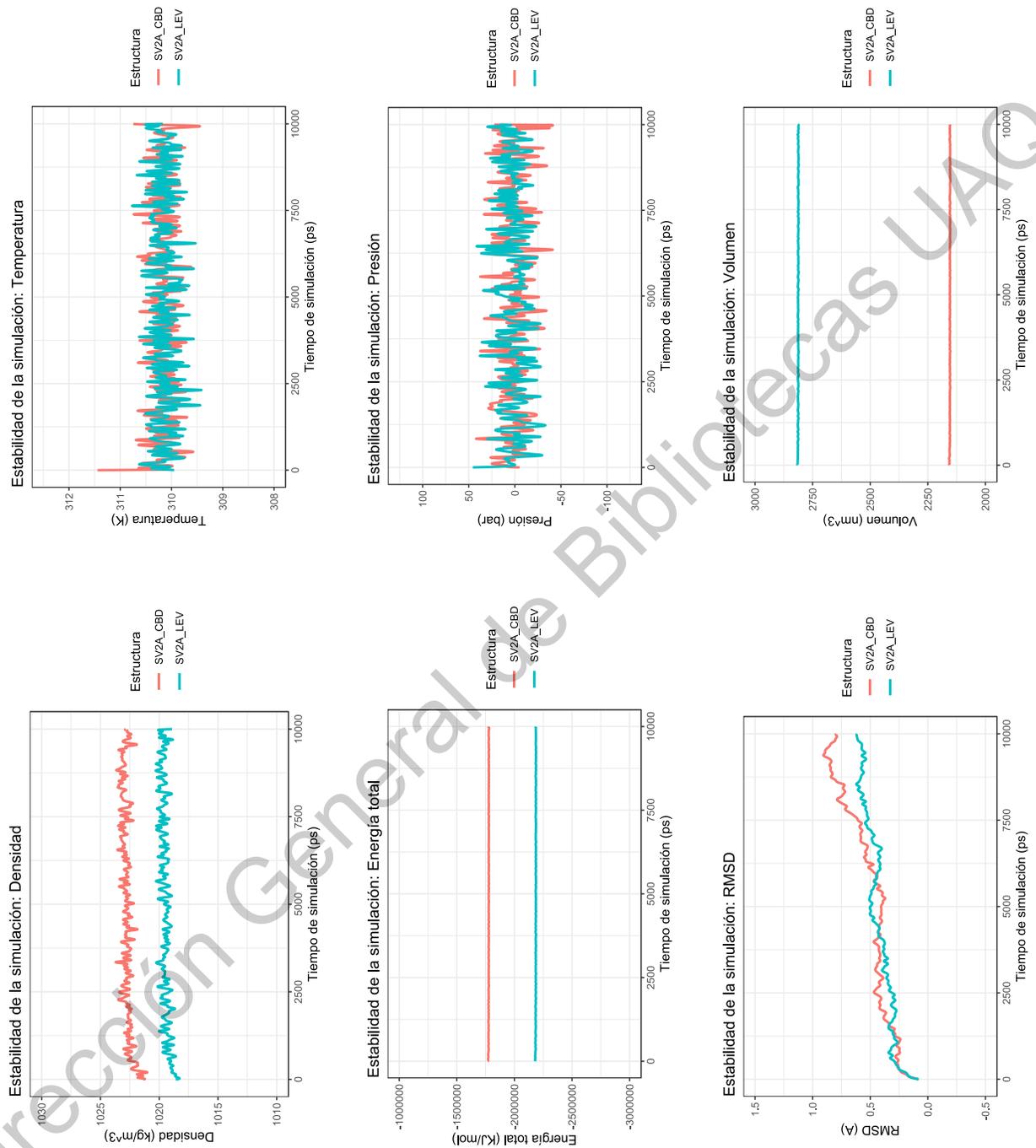


Figura 64. Estabilidad de la simulación de los complejos de SV2A

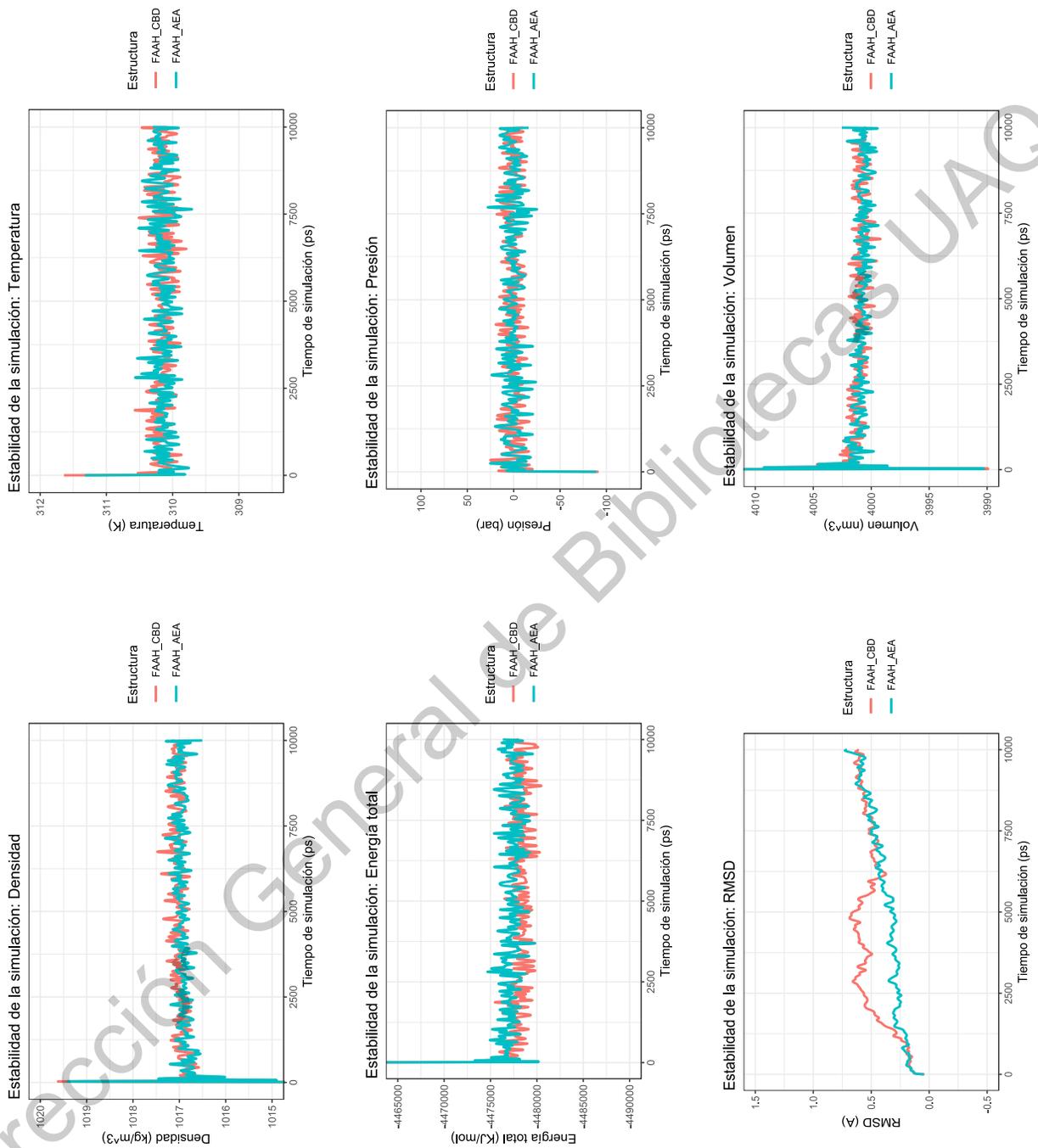


Figura 65. Estabilidad de la simulación de los complejos de FAAH

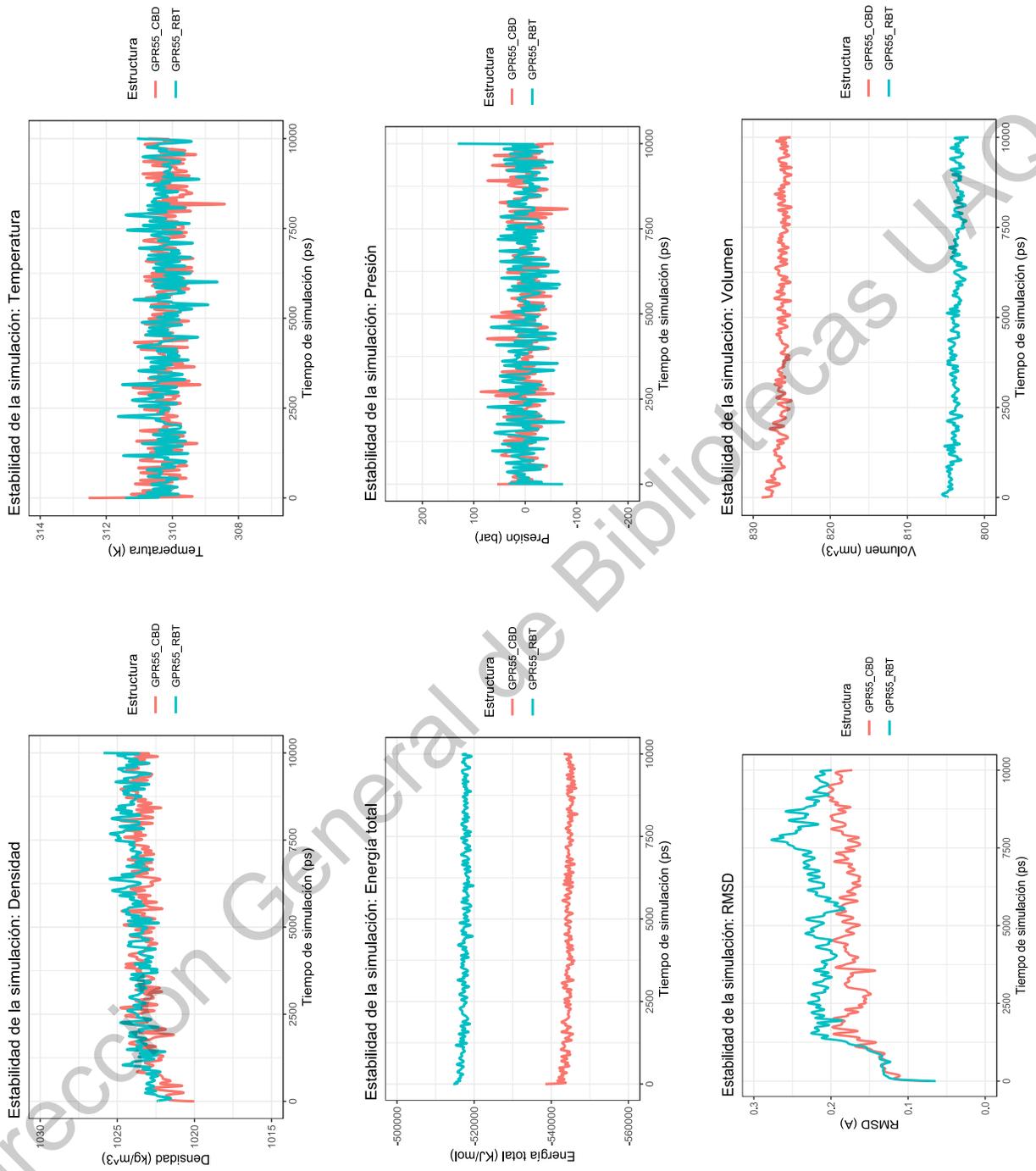


Figura 66. Estabilidad de la simulación de los complejos de GPR55

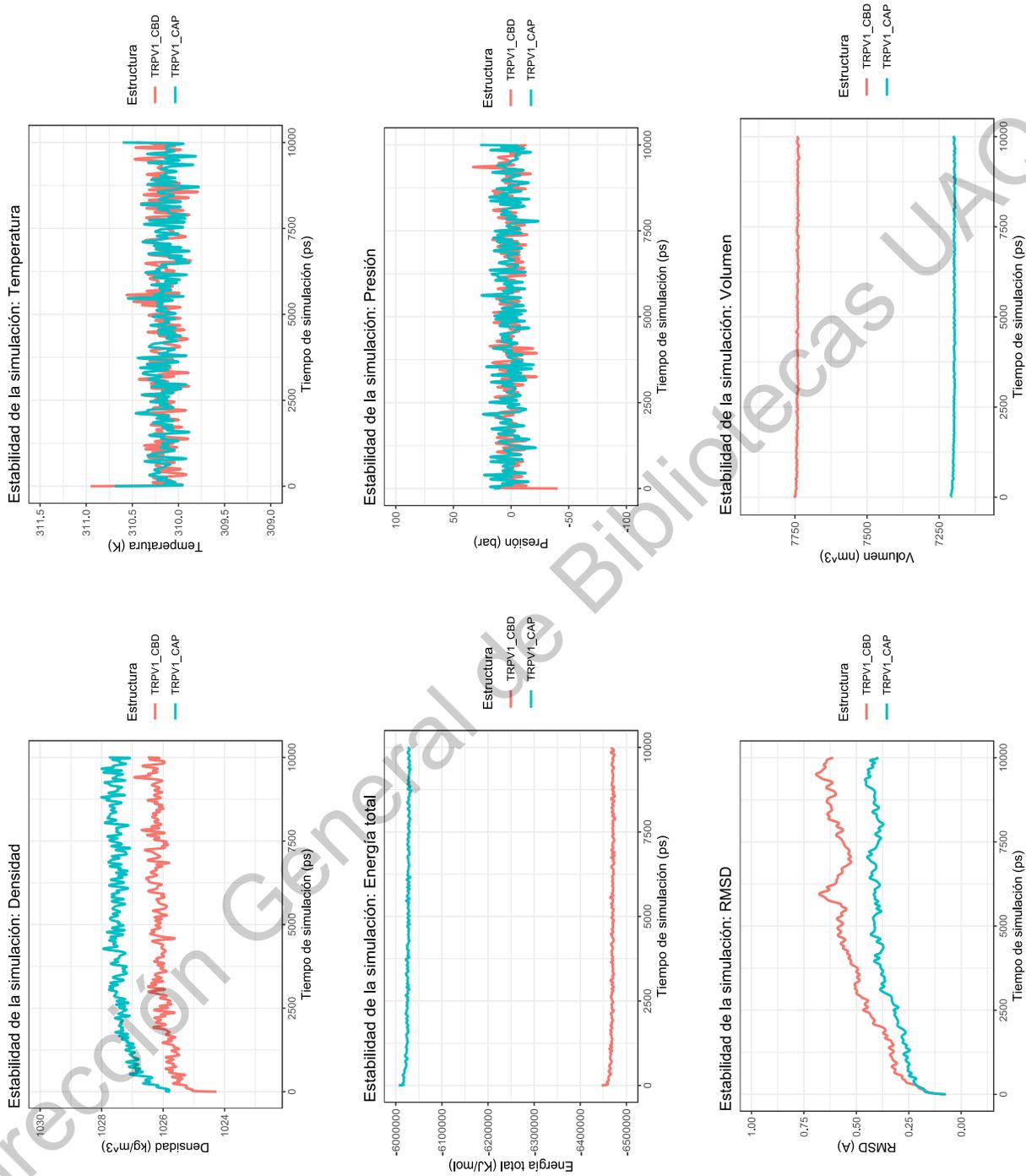


Figura 67. Estabilidad de la simulación de los complejos de TRPV1

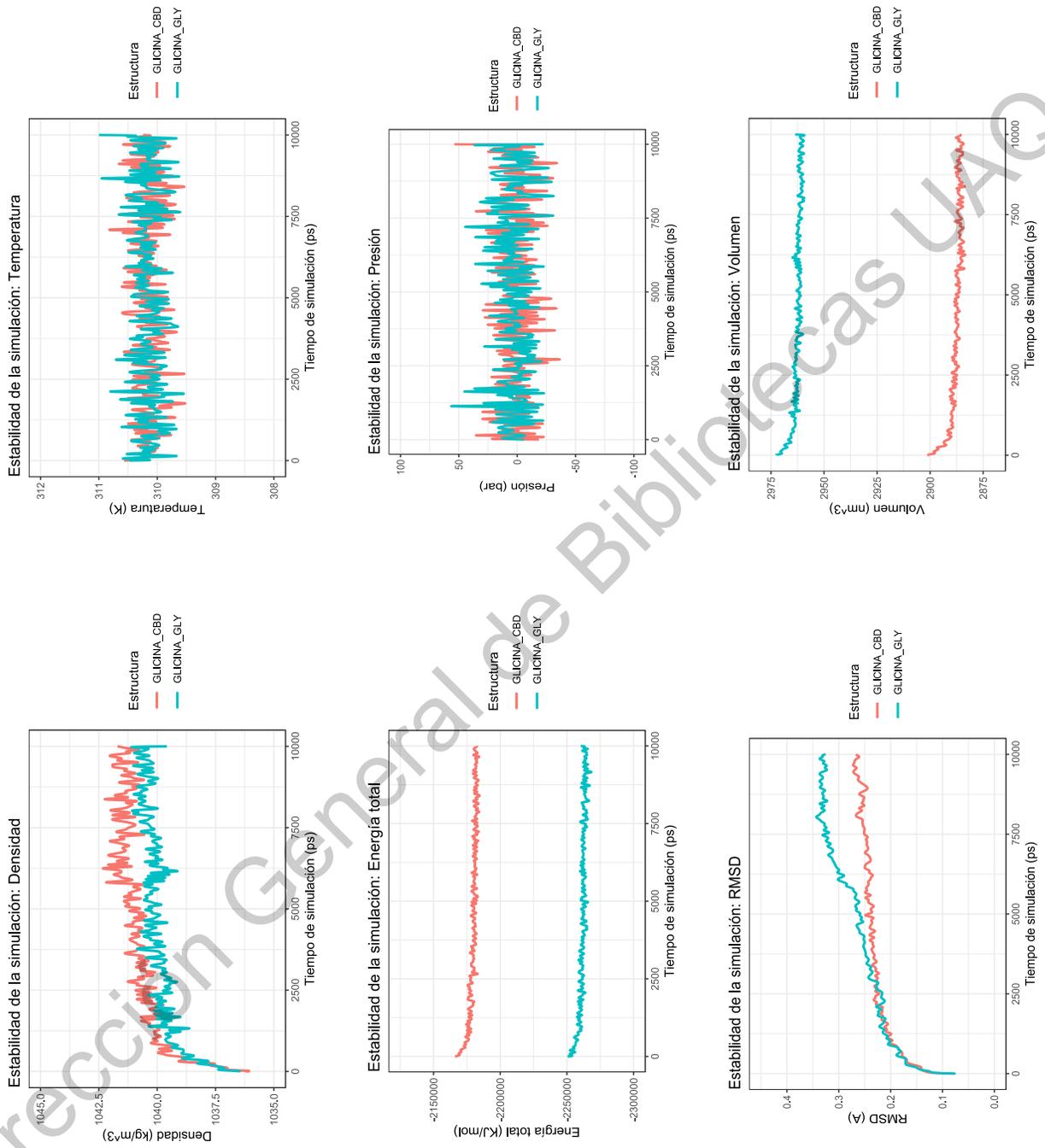


Figura 68. Estabilidad de la simulación de los complejos del receptor de Glicina $\alpha 1\beta$

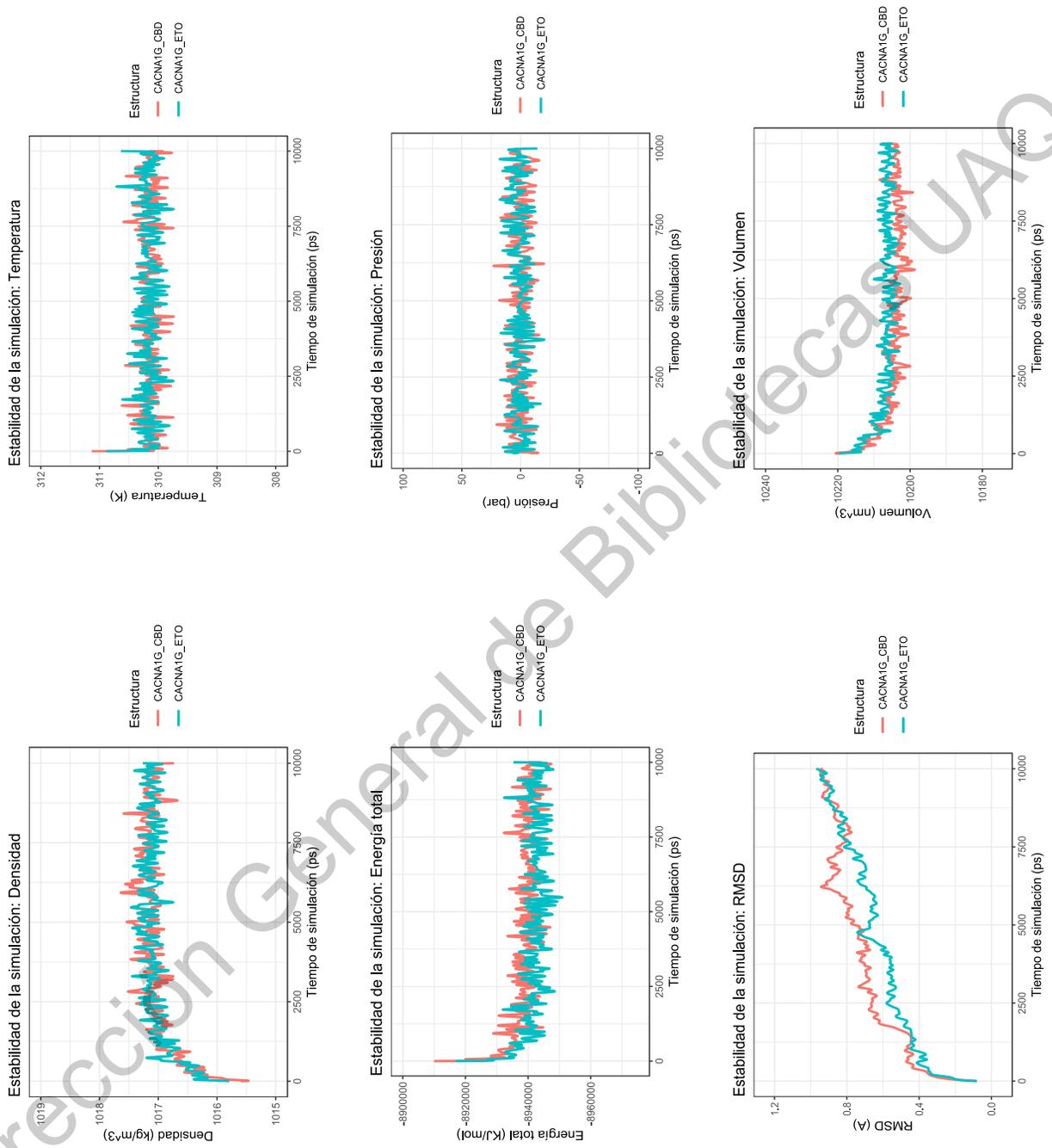


Figura 69. Estabilidad de la simulación de los complejos del receptor de calcio voltaje-dependiente de tipo T.