

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas,
Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EVALUACIÓN DE LA DEPENDENCIA ESTRUCTURAL TERMOESTABLE
RESPECTO A LOS PUENTES DISULFURO PRESENTES EN LOS CICLÓTIDOS
DE LA FAMILIA RUBIACEAE Y SU CORRELACIÓN RESPECTO A LOS
POTENCIALES ELECTROSTÁTICOS CLÁSICOS Y CUÁNTICOS**

Tesis presentada por el Bachiller:
Morales Fernández, Dante Alexander

Para optar el Título Profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:
Dr. Gómez Valdez, Badhin

Arequipa – Perú

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 16001308
N° Trámite en Fac. 267-2016
Fecha Recep. Fac. 12-01-2016

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **MORALES FERNANDEZ, Dante Alexander**


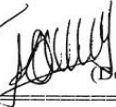
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION DE LA DEPENDENCIA ESTRUCTURAL TERMOESTABLE RESPECTO A LOS PUENTES DISULFURO PRESENTES EN LOS CICLOTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS Rubiaceae Y SU CORRELACION RESPECTO A LOS POTENCIALES ELECTROSTATICOS CLASICOS Y CUANTICOS"

DICTAMINADORES: 1) **Dr. Jaime Cárdenas García** 2) **Dr. José Villanueva Salas**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 25/1/16

ASESOR: **Dr. Badhin Gómez Valdez**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente trabajo de Investigación y después de efectuada las observaciones y verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente



FIRMA  FECHA 17-04-18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Dr. Jaime Cárdenas García** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA   (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 21/06/18

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 04/07/18 HORA 19.00 LOCAL SUM C-402

FIRMA DEL DECANO  FECHA 21/06/18

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al centro de investigación en Ingeniería Molecular quienes fueron un gran apoyo durante el tiempo en que escribía esta tesis, a mis compañeros de proyecto y en especial a mi compañera de cálculo quien me ayudo concluir con mi investigación.

A mis padres y personas cercanas quienes me apoyaron todo el tiempo.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar el poco conocimiento que tenía en ciencia teórica, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi universidad, gracias por haberme permitido formarme y en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes, fueron ustedes los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en la culminación de mi paso por la universidad. Gracias a mis padres, que fueron mis mayores promotores durante este proceso.

Este es un momento muy especial que espero, perdurará en el tiempo, no solo en la mente de las personas a quienes agradecí, sino también a quienes invirtieron su tiempo en el proceso y desarrollo de mi investigación, a ellos asimismo les agradezco con todo mi ser.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
GLOSARIO.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	XVIII
OBJETIVOS.....	XX
OBJETIVO GENERAL.....	XX
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	XX
HIPÓTESIS.....	XXI
CÁPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Familia <i>Rubiaceae</i>	1
1.1.1. Distribución Geográfica.....	1
1.1.2. Taxonomía.....	1
1.2. Ciclótidios.....	2
1.2.1. Ciclótidios en la clase Eudicots.....	3

1.2.2. Ciclotidos en la Familia <i>Rubiaceae</i>	4
2.2.2.1. División de los Ciclotidos	5
1.3. Estructura y características de los ciclotidos de <i>Rubiaceae</i>	6
1.3.1. Enlace peptídico	8
1.3.2. Enlace disulfuro.....	9
1.3.3. Nudo ciclico de cisteínas	11
1.3.4. Influencia de los puentes disulfuro en el plegamiento	13
1.3.5. Plegamiento y flexibilidad de las proteínas cíclicas.....	13
1.3.6. Termoestabilidad.....	14
1.3.7. Biosíntesis de los ciclotidos	15
1.3.7.1. Secuenciación de los ciclotidos de <i>Rubiaceae</i>	16
1.3.7.2. Aplicación biológica de los ciclotidos	17
1.3.7.3. Polipéptidos cíclicos y defensinas.....	18
1.3.7.4. Potencial inmunosupresor de los ciclotidos	19
1.4. Bioinformática	19
1.4.1. Mecánica Molecular	20
1.4.1.1. Modelamiento proteico	20
1.4.1.2. Estructura conformacional	21
1.4.1.3. Plegamiento oxidativo	22
1.4.1.4. Dinámica Molecular.....	22
1.4.1.4.1. Elementos de la Dinámica Molecular.....	24
1.4.1.4.2. Optimización Geométrica.....	26
1.4.1.4.3. Integrador Steepest descent	26
1.4.1.4.4. Gradiente de Conjugación.....	27

1.4.1.5. Potencial Electrostatico APBS	27
1.4.2. Mecánica Cuántica	27
1.4.2.1. Ecuación de Schrödinger	28
1.4.2.2. Teoría funcion de la densidad	28
1.4.2.3. Funcional CAM-B3LYP	29
1.4.3. Validación de estructuras	29
1.4.3.1. Calculo de la convergencia del sistema (RMSD)	30
1.4.3.2. Calculo de la raiz cuadrada media de las fluctuaciones (RMSF) ...	30
1.4.2.1. Diagrama Ramachandran	30
CAPÍTULO II.....	32
METODOLOGÍA Y DETALLES COMPUTACIONALES.....	32
2.1. Equipos y Software	32
2.2. Metodología	36
2.2.1. Recopilación de información sobre las estructuras de los ciclótidos.....	36
2.2.2. Dinámica molecular en un ensamble Canónico (NVT)	37
2.2.3. Minimización a nivel de mecánica cuántica.....	45
2.2.4. Evaluación de la estabilidad térmica de los ciclótidos	46
2.2.5. Determinación de la estabilidad de los puentes disulfuro de los ciclótidos..	46
2.2.6. Potencial electrostático	46
2.2.7. Validacion de las distancias de los enlaces disulfuro	48
CAPÍTULO III.....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
3.1. Recopilación de información de las estructuras de los ciclótidos	49

3.1.1. Ciclotidos en la Familia <i>Rubiaceae</i>	53
3.2. Estados fundamentales de los ciclotidos.....	55
3.2.1. Estructura lineal de los ciclotidos de <i>Rubiaceae</i>	55
3.2.2. Estructura terciaria de los Ciclotidos de <i>Rubiaceae</i>	55
3.2.3. Optimización geométrica de los Ciclotidos	62
3.3. Minimización a nivel de mecánica cuántica	88
3.4. Estabilidad térmica de los ciclotidos en la simulación annealing	89
3.5. Variación de los puentes disulfuro de los ciclotidos.....	99
3.6. Evaluación del potencial electrostático	103
3.6.1. Comparación de los Potenciales electrostáticos de los ciclotidos.....	105
3.7. Validación de las distancias de enlaces disulfuro.....	108
CONCLUSIONES.....	110
BIBLIOGRAFÍA	111
APÉNDICE A	120
APÉNDICE B	121
APÉNDICE C	135

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1.	Estructura secundaria del ciclótido Kalata B12.	7
1.2.	Secuencia lineal del ciclótido Palicourein.	8
1.3.	Formación del enlace peptídico.	8
1.4.	Extremos terminales de una proteína.	9
1.5.	Formación de los enlaces disulfuro.	9
1.6.	Enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína.	10
1.7.	Estructura clásica del ciclótido Kalata B1.	11
1.8.	Modelos de cisteínas en diferentes péptidos.	12
1.9.	Formación de un péptido cíclico.	15
1.10.	Reducción de los enlaces disulfuro.	16
1.11.	Gradiente descendiente.	27
1.12.	Diagrama ramachandran de los ángulos de torsión.	31

2.1.	Caja cúbica de la proteína Kalata B1 y moléculas de agua.	38
2.2.	Valores de las condiciones periódicas de contorno PBC	39
2.3.	Valores iniciales empleados en el cálculo de minimización de energías.	40
2.4.	Valores empleados en el cálculo de la dinámica molecular.	41
2.5.	Programa-DM empleado en la optimización de la DM	42
2.6.	Selección del grupo de cálculo RMSD.	43
2.7.	Servidor Molprobit.	44
2.8.	Parámetros para la optimización cuántica.	45
2.9.	Parámetros utilizados en el cálculo de la estabilidad térmica.	47
3.1.	Representación de la estructura lineal en formato fasta de la Kalata B1.	53
3.2.	Identificación del código PDB de la Kalata B1.	54
3.3.	Representación gráfica de la secuencia fasta de la Kalata B1.	55
3.4.	Servidor Robetta.	56
3.5.	Formato PDB.	57
3.6.	Estructura de un pre-ciclótido de la Kalata B1.	58
3.7.	Ausencia del nudo cíclico de cisteínas.	58
3.8.	Estructura cíclica del ciclótido Kalata B1.	59
3.9.	Estructura cíclica del ciclótido Kalata B7.	59
3.10.	Estructura cíclica del ciclótido Kalata B12.	60
3.11.	Estructura cíclica del ciclótido Cycloviolacin O22.	60

3.12.	Estructura cíclica de ciclótido Palicourein.	61
3.13.	Nudo cíclico de cisteínas del ciclótido Kalata B1.	61
3.14.	Archivo specbond.dat.	62
3.15.	Enlaces disulfuro del nudo cíclico de cisteínas de la Kalata B1.	64
3.16.	Modelo optimizado del ciclótido Kalata B1.	64
3.17.	Desviación media cuadrática RMSD del ciclótido Kalata B1.	65
3.18.	Fluctuación de los aminoácidos de la Kalata B1.	66
3.19.	Diagrama ramachandran de la Kalata B1.	67
3.20.	Aminoácido TRP 23 de la Kalata B1	68
3.21.	Enlace disulfuro del nudo cíclico de cisteínas de la Kalata B7.	68
3.22.	Modelo optimizado del ciclótido Kalata B7.	69
3.23.	Desviación media cuadrática RMSD del ciclótido Kalata B7.	69
3.24.	Fluctuación de los aminoácidos de la Kalata B7.	70
3.25.	Diagrama ramachandran de la Kalata B7.	71
3.26.	Enlace disulfuro del nudo cíclico de cisteínas de la Kalata B12.	72
3.27.	Modelo optimizado del ciclótido Kalata B12.	72
3.28.	Desviación media cuadrática RMSD del ciclótido Kalata B12.	73
3.29.	Fluctuación de los aminoácidos de la Kalata B12.	74
3.30.	Diagrama ramachandran de la Kalata B12.	75

3.31.	Enlaces disulfuro del nudo cíclico de cisteínas del Cycloviolacin O22.	76
3.32.	Modelo optimizado del ciclótido Cycloviolacin O22.	76
3.33.	Desviación media cuadrática RMSD del ciclótido Cycloviolacin O22.	77
3.34.	Fluctuaciones de los aminoácidos del ciclótido Cycloviolacin O22.	78
3.35.	Diagrama ramachandran del ciclótido Cycloviolacin O22.	79
3.36.	Enlaces disulfuro del nudo cíclico de cisteínas del ciclótido Palicourein.	80
3.37.	Modelo optimizado del ciclótido Palicourein.	80
3.38.	Desviación media cuadrática RMSD del ciclótido Palicourein.	81
3.39.	Fluctuaciones de los aminoácidos del ciclótido Palicourein.	82
3.40.	Diagrama ramachandran del ciclótido Palicourein.	85
3.41.	Estructuras minimizadas en QM utilizando el software deMon2k.	89
3.42.	Annealing de los ciclótidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein a 309.65 K.	90
3.43.	Annealing de los ciclótidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein de 0 a 7.5 ns.	91
3.44.	Annealing de los ciclótidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein a 399.65 K.	92
3.45.	Annealing del ciclótido Kalata B1.	93
3.46.	Annealing del ciclótido Kalata B7.	93

3.47.	Annealing del ciclótidos Kalata B12.	94
3.48.	Annealing del ciclótido Cycloviolacin O22.	95
3.49.	Annealing del ciclótido Palicourein.	95
3.50.	Estructuras superpuestas de los ciclótidos estudiados	98
3.51.	APBS inicial del ciclótido Kalata B1.	104
3.52.	APBS final del ciclótido Kalata B1.	104
3.53.	Comparación del APBS de la Kalata B1.	105
3.54.	Comparación del APBS de la Kalata B7.	106
3.55.	Comparación del APBS de la Kalata B12.	107
3.56.	Comparación del APBS del Cycloviolacin O22.	107
3.57.	Comparación del APBS del Palicourein.	108

ÍNDICE DE TABLAS

1.1.	Distribución taxonómica de la familia <i>Rubiaceae</i> .	2
3.1.	Listo de ciclótidos presentes en la familia <i>Rubiaceae</i> .	49
3.2.	Códigos PDB de los cristales de ciclótidos.	54
3.3.	Cambio de los campos de fuerza de la Gromacs.	63
3.4.	Energía total del ciclótido Kalata B1	63
3.5.	Energía total de los ciclótidos de la familia <i>Rubiaceae</i> .	84
3.6.	Indicadores analizados	96
3.7.	Distancias de los enlaces disulfuro a 309.65 K.	99
3.8.	Distancias de los enlaces disulfuro de los ciclótidos optimizados de 309.65 a 399.65 K.	103
3.9	Tabla comparativa de la distancia S-S entre los modelos optimizados y cristales PDB.	109

GLOSARIO

1. NCC = Nudo Cíclico de Cisteínas
2. Método Clásico = Análisis y estudio de las proteínas en base a la mecánica molecular
3. QMMM = Método híbrido donde aplica las aproximaciones clásicas junto a los cálculos cuánticos.
4. MM = Mecánica molecular, aplicado a sistemas moleculares
5. MQ = Mecánica Cuántica, método aplicado a la interpretación de sistemas atómicos.
6. In silico = diseño de simulaciones empleando herramientas computacionales.
7. Sistema Explícito = espacio conformado por agua donde interactúa la molécula durante la dinámica molecular.
8. BOX = conforma las condiciones periódicas de contorno, definiendo el volumen y el espacio del sistema.
9. NVT = colectivo canónico con número de moles, volumen y temperatura constante.
10. GLY = Glicina.
11. APBS = Potencial electrostático de superficie.
12. GROMACS = Máquina Groningen para Simulaciones químicas.

13. OPLSAA = Potencial optimizado para simulaciones líquidas de aminoácidos.
14. ASN = Asparagina.
15. CYS = Cisteína.
16. VMD = Visualizador de Dinámicas Moleculares.
17. ROBETTA = Servidor online para la predicción de estructuras de proteínas de cadenas completas.
18. MODELLER = Programa de modelado comparativo de estructuras proteicas por el cumplimiento de las restricciones espaciales.
19. Minimización = matización de energías de una proteína para alcanzar el mínimo energético.
20. Demon2k = Paquete de software para cálculos de la teoría funcional de la densidad (DFT).
21. DFT = Método computacional de modelado mecánico cuántico utilizado en física, química y ciencia de materiales para investigar la estructura electrónica de sistemas de muchos cuerpos, en particular átomos, moléculas y las fases condensadas.

RESÚMEN

Los ciclótidos son polipéptidos circulares sin residuos terminales, se encuentran en especies vegetales pertenecientes a la clase Eudicots de las Angiospermas, utilizados por tribus del Congo en la medicina tradicional formulando infusiones y ungüentos de las plantas silvestres. La especie más conocida es la Kalata-kalata de la familia *Rubiaceae* por su amplia distribución y su función uterotónica. Las características principales de estos polipéptidos cíclicos es la presencia de un nudo cíclico y un enlace peptídico terminal entre las colas carboxilo y amino. Utilizamos la dinámica molecular aplicando el campo de fuerza OPLS-AA en el software Gromacs 2016. Usamos 78 ciclótidos pertenecientes a la familia *Rubiaceae*. Las estructuras fueron minimizadas usando el método “steepest descent”. La simulación de dinámica molecular fue realizada con un ensamblé canónico NVT en unas condiciones periódicas de contorno de 5x5x5 manteniendo la temperatura fisiológica 36.5 °C dentro de un sistema explícito. El análisis de la mecánica cuántica fue hecho en cinco ciclótidos en el software deMon2k v.4.7. En esta investigación presentamos resultados comparativos con respecto a la termoestabilidad (mecánica clásica) y la longitud de los puentes disulfuro (mecánica cuántica).

Palabras claves: Ciclótidos, Modelamiento proteico, Mecánica Molecular, Mecánica Cuántica, Annealing, Potencial Electroestático, Puentes disulfuro, *Rubiaceae*.

ABSTRACT

Cyclotides are circular polypeptides without terminal residues, are in the category of plants belonging to the class Eudicots of Angiosperms, used by tribes of the Congo in traditional medicine formulating infusions and ointments of wild plants. The most well-known species is the Kalata-kalata of the Rubiaceae family because of its wide distribution and its uterotonic function. The main characteristics of these cyclic polypeptides is the presence of a cyclic knot and a peptide terminal bond between the carboxyl and amino tails. The molecular dynamics applying the OPLS-AA force field in the Gromacs 2016 software. We use 78 cyclotides belonging to the Rubiaceae family. The structures were minimized using the "steepest decent" method. The simulation of molecular dynamics was performed with a canonical NVT assembler at environmental conditions of 5x5x5 maintaining the physiological temperature 36.5°C within an explicit system. The analysis of quantum mechanics was done in five cyclotides in the software of Mon2k v.4.7. In this research, we present comparative results with respect to thermostability (classical mechanics) and the length of disulfide bridges (quantum mechanics).

Keywords: Cyclotides, Protein Modeling, Molecular Mechanics, Quantum Mechanics, Annealing, Electrostatic Potential, Disulfide Bridges, Rubiaceae.

INTRODUCCIÓN

Los ciclótidos son polipéptidos circulares que no poseen residuos terminales, fueron descubiertos en el continente africano, siendo investigados por sus usos medicinales y antiguas creencias populares de las tribus del Congo. Estas preparaban infusiones y ungüentos de plantas silvestres de la región, siendo la más utilizada la planta denominada kalata-kalata (*Oldelandia affinis*) de la familia *Rubiaceae* por su amplia distribución geográfica. Más adelante los médicos de la cruz roja aislaron los componentes de la planta *Oldelandia affinis*, debido a la importancia que prestaban los nativos en el tratamiento de gestantes de tribus alejadas del África, logrando identificando la función uterotónica de la planta.

Los ciclótidos se encuentran en especies vegetales pertenecientes a la clase Eudicots de las Angiospermas, la característica principal de estos polipéptidos macrocíclicos es la presencia de un nudo conformado por residuos de cisteínas conocido como Nudo Cíclico de Cistina (NCC), esta conformación es la encargada de la estabilidad estructural y actividad biológica de la proteína cíclica, presentando actividad antimicrobiana, potencial activador e inhibidor celular (enfermedades neoplásicas) y actividad citotóxica.

Por otro lado, la bioinformática y la química computacional permiten el desarrollo y aplicación de técnicas computacionales en el procesamiento de datos biológicos utilizando potentes hardware capaces de realizar cálculos matemáticos, generando una simulación in silico de los procesos y comportamiento de las proteínas en un espacio de tiempo. Una herramienta útil en el estudio de estas interacciones intermoleculares es la utilización métodos híbridos (QMMM), este nos garantiza una interpretación más precisa de los resultados experimentales, permitiéndonos comparar las aproximaciones energéticas y establecer una metodología capaz de realizar modelos matemáticos en la predicción y modelamiento de proteínas.

Las metodologías clásicas y cuánticas proporcionadas en su mayor parte por la química computacional permiten identificar a nivel clásico la posición, comportamiento, interacciones y capacidad energética de la proteína y en nivel cuántico identifica la interacción de los átomos con el sistema, la posición de los orbitales, la energía de los enlaces entre átomos y una energía total más precisa respecto a datos experimentales.

Es por lo que el objetivo de la presente investigación es la evaluación de la dependencia estructural termoestable respecto a los puentes disulfuro presentes en los ciclótidos de la familia de las *Rubiaceae* y su correlación respecto a los potenciales electrostáticos clásicos y cuánticos.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los estados configuracionales dependientes de los puentes disulfuro presentes en ciclótidos de la familia *Rubiaceae*, así como la influencia en la variación de su potencial electrostático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Recopilar información sobre las estructuras configuracionales de los ciclótidos presentes en la familia *Rubiaceae*, en formato PDB “Protein Data Bank”.
2. Determinar los estados fundamentales de los ciclótidos, utilizando la simulación de dinámica molecular y matización de fuerzas, en un ensamble Canónico (NVT).
3. Minimizar a nivel de mecánica cuántica las regiones de los puentes disulfuro, manteniendo el resto condición de mecánica cuántica, a través de la aproximación ONIOM, en el contexto QMMM en.
4. Evaluar la estabilidad térmica de los ciclótidos, mediante técnicas de simulación annealing, en el rango de temperaturas de 309.65 a 399.65 K.
5. Determinar la estabilidad e influencia de los puentes disulfuro presentes en los oligopéptidos de los ciclótidos al sufrir variaciones de temperatura.
6. Evaluar la variación y dependencia del potencial electrostático de los ciclótidos producidos por efecto de la temperatura en la región de los puentes disulfuro.
7. Validar las distancias de los enlaces disulfuro de las estructuras cuánticas respecto a sus modelos experimentales.

HIPÓTESIS

Mediante el uso de métodos mixtos y la simulación de dinámica molecular, es posible determinar los cambios configuracionales de las estructuras moleculares cíclicas, sometidas a cambios de temperatura y aproximaciones que experimentan en una trayectoria determinada por las posiciones y velocidades de sus átomos.



CAPÍTULO I

Marco Teórico

1.1. Familia *Rubiaceae*

La familia *Rubiaceae* es una de las familias más cosmopolita y está compuesta de 10.700 especies descritas por Mabberly y colaboradores, entre las más representativas están la *Coffea arabica* utilizada en Etiopía para la producción de café, otra especie es la *Cinchona officinalis* conocida por su producción de quinina, quinoleína y otros alcaloides empleados en tratamientos contra la malaria o fiebre amarilla.¹

1.1.1. Distribución geográfica

Las especies de la familia *Rubiaceae* tienen una distribución mundial, su hábitat se encuentra en la mayoría de los continentes, incluso en el continente Antártico, pero la mayoría se encuentra en la región trópico y subtropical de toda América.² El Perú posee alrededor de 102 géneros y 740 especies reportadas, estas se ubican a 100 – 3700 msnm. Se han reportado especies como *Psychotria*, *Stilnophyllum* en regiones de Bosques Húmedos Amazónicos.³

1.1.2. Taxonomía

La familia *Rubiaceae* es la cuarta y más extensa de las angiospermas, generalmente se encuentran en bosques tropicales. La principal característica de las rubiáceas es la oposición entre hojas y estípulas, estas rubiáceas en su mayoría están compuestas de árboles, hierbas pequeñas, malezas y arbustos, llegando a comprender 13.000 especies⁴,

clasificados en 620 géneros (Tabla 1.1). Se observa la distribución taxonómica de la familia *Rubiaceae*.

Las especies presentes en la familia de *Rubiaceae*, poseen gran potencial químico, por su aplicativo en culturas nativas y costumbres medicinales, ya que expresan un potencial tóxico.⁵ Otras cualidades de esta familia es la producción de polipéptidos, conocidos como ciclótidos.

Tabla 1.1. Distribución taxonómica de la familia *Rubiaceae*

Taxonomía	
REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Gentianales
FAMILIA	<i>Rubiaceae</i>

1.2. Ciclótidos

La historia de los ciclótidos tiene su origen alrededor de los años 1960 donde tribus del Congo (África) utilizaban recursos naturales para el tratamiento y cura de enfermedades que padecían. Una práctica común en las mujeres era la preparación de infusiones con plantas silvestres (*Oldenlandia affinis* – *Rubiaceae*), para acelerar las contracciones durante el parto. Estos hallazgos fueron reportados por el profesor Finn Sandberg, siendo identificados y aislados por Lorents Gran, identificando la presencia de un agente estimulador conformado por polipéptidos, provocando el aumento de las contracciones del parto.⁶

Años después se reportó una estructura macrocíclica compuesta por péptidos de 27-37 residuos de aminoácidos, denominándose ciclótidos por su estructura circular. Más adelante el ciclótido más estudiado fue denominado “*kalata b1*” por su obtención de la planta silvestre conocida como *Kalata-kalata*.^{7,8} Esta planta fue estudiada por su utilización en la preparación de infusiones y remedios tradicionales, estas infusiones eran

empleadas en el proceso de parto provocando el aumento de las contracciones y reduciendo el índice de hemorragias post parto, demostrando así las propiedades uterotónicas presentes en la planta, dando origen a la identificación del primer polipéptido macrocíclico conocido como kalata B1.⁹ Otra especie de planta es *Chassalia parvifolia*, perteneciente a la familia *Rubiaceae*, estudiada por la actividad de los ciclótidos denominados como “circulinas” que expresaron una actividad anti VIH. Otros ciclótidos de *Rubiaceae* y *Violaceae* fueron descubiertos por su actividad hemolítica.¹⁰

Se conoce poco acerca de cómo se producen los ciclótidos en la planta, ya que se observa una gran variación, dependiendo de su especie y región. En ocasiones la producción de estos péptidos se da por el sistema inmunitario cuando la planta sufre una enfermedad o está sometida a estrés, para poder tener un mejor entendimiento se reportaron que familias de *Violaceae*, expresaron diferentes niveles de producción de ciclótidos, esto sucedía cuando la planta era sometida a condiciones cambiantes de presión, temperatura, cambio estacional y estrés. Revelando variaciones en la producción de péptidos cíclicos provocados por pequeñas diferencias atmosféricas. La producción de ciclótidos en diferentes partes de la planta (raíces, peciolo, hojas, pedicelo y flores), es de manera constante. En variaciones del clima se observa el aumento de la producción de ciclótidos, otra condición para el aumento de ciclótidos es someter a la planta a factores climáticos externos, se puede obtener una producción de ciclótidos 14 veces mayor durante un periodo cálido, relacionando el aumento de ciclótidos con las variaciones climáticas que experimente la planta.¹¹

1.2.1. Ciclótidos en la clase Eudicots

Se han reportado más de 160 ciclótidos, donde solo 3 familias han sido las más estudiadas (*Violaceae*, *Rubiaceae*, *Fabaceae*). Estos ciclótidos se encuentran en todos los tejidos de la planta como hojas, flores, tallos y raíces, debido a esto no se tiene un registro completo acerca de los porcentajes que se encuentran distribuidos en la planta pero se presume que la producción es constante.¹² Otra familia conocida es la familia *Fabaceae*, esta tiene las mismas propiedades uterotónicas como la kalata B1 de *Rubiaceae*, los ciclótidos de *Fabaceae* se encuentran en todos los tejidos incluyendo hojas, flores, tallos y raíces.¹³ Los

ciclótidos de *Rubiaceae* como lo son las Kalatas, Circulinas, Caripes y otros polipéptidos de *Violácea* fueron reportados gracias a los estudios etnofarmacológicos y terapias etnomedicinales de tribus nativas del África.¹⁴ Las características de los ciclótidos de kalata B1, ciclopsicotrido A y circulina A presentan una actividad biológica que inhibe el crecimiento y desarrollo de microorganismos y afecta el crecimiento de larvas e insectos, estas propiedades pueden ser aplicadas a tecnologías agrarias frente a plagas e infecciones, como lo podría ser la utilización de kalata B1 como un agente insecticida ya que a diferencia de otros ciclótidos esta presenta una mayor actividad citotóxica.

Otros estudios indican la inactividad de algunos ciclótidos contra *Staphylococcus aureus* estos resultados fueron obtenidos por Tang y colaboradores, indicaron que los ciclótidos de *Viola labridorica* (*Violaceae*) son activos frente al crecimiento *Staphylococcus aureus*. Gracias a estos estudios se destacan las especies de *Rubiaceae* y *Violaceae* como opciones antimicrobianas, siendo necesario la investigación e identificación de todos estos.^{15, 16}

Se ha reportado la presencia de péptidos circulares en la medicina tradicional, estas sustancias son utilizadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la dermatitis inflamatoria.

Para demostrar de las formas estructurales de los ciclótidos se utilizó Espectroscopia de masa (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN), para proporcionar datos de la naturaleza cíclica. Sin embargo, la falta de C- y N-terminales hace necesario la utilización de un proceso enzimático para lograr romper el anillo que estos forman, por lo que realizar un análisis de estructuras cíclicas no purificadas es extremadamente difícil.¹⁷

1.2.2. Ciclótidos en la familia *Rubiaceae*

Las proteínas circulares son moléculas con plegamientos en su estructura terciaria, configurando una conformación tridimensional cíclica definiendo esta estructura su actividad biológica. Este pliegue es similar y general para la mayoría de las estructuras de ciclótidos Kalatas. Uno de los pliegues se debe a la presencia de un ácido glutámico en el bucle 1 de los ciclótidos, mejorando la estabilidad de la estructura y proporcionando actividad esencial en la interacción y alteración de la membrana celular.¹⁸ En plantas provenientes de la familia *Rubiaceae* se reportó la producción de moléculas cíclicas,

sintetizadas por enzimas con actividad péptido sintasa. La mayoría de estos péptidos son poco sensibles a enzimas, debido a las metilaciones, quiralidad y enlaces peptídicos. Para mejorar su estabilidad, estos péptidos forman conexiones intramoleculares formando enlaces de puentes disulfuro, configurando una estructura cíclica y estable.¹⁹

No se encuentra los mecanismos que puedan explicar el enlace que se produce en los extremos de las proteínas cíclicas, estos pueden estar unidos por enlaces peptídicos como lo es en la mayoría de los residuos presentes en la proteína, por lo tanto, se acepta la existencia de proteínas circulares de síntesis ribosómica en microorganismos, plantas y animales, siendo estas moléculas cíclicas uniones peptídicas, sin extremos amino o carboxilo.²⁰

La característica de los ciclótidos de *Rubiaceae* es la presencia de residuos de cisteína que son codificados por genes formando en la estructura un triplete de cistinas. Estos ciclótidos forman parte de la protección en la planta, siendo resistentes por su estructura formada por cisteínas, brindándole una estabilidad estructural cíclica, resistencia a la degradación enzimática, resistencia térmica y resistencia química. Esta resistencia es ideal en la creación de andamios de polipéptidos para el diseño de fármacos, utilizándolos como soportes para la inserción de agentes bioactivos.

Estas proteínas presentan una variedad de actividades intrínsecas, ya que pueden ser utilizados como ligandos de la oxitocina y la vasopresina humano receptores V1a, también inhiben la actividad de prolil oligopeptidasa humano y una serina-proteasa que está implicada en los mecanismos de neuro péptidos.²¹

1.2.2.1. División de los ciclótidos

Los ciclótidos se dividen en tres subfamilias, *Brazelete* (kalataB1), *Mobius* (Cycloviolacin O1) e *inhibidor de tripsina* (MCoTI-II),²² esta división se debe a la presencia o falta de un residuo de cis-prolina en el bucle 5. Otra diferencia es el número de aminoácidos y la posición de los aminoácidos en la estructura.²³

La diferencia entre estas dos subfamilias *Mobius* y *Brazelete* es por la presencia o ausencia, de un enlace peptídico cisteína–prolina en el residuo de cisteína frente a una región de prolina conservada del bucle 5, que le confiere un giro a la estructura de cadena

peptídica. Entre estas divisiones hay una subfamilia de "híbridos", es decir, estructuras que contienen características de ambas divisiones a pesar de la diferencia de tamaños. Según la base de datos Cybase (base de datos de proteínas cíclicas) la subfamilia de Brazalete está conformada por dos tercios de los ciclótidos reportados, además es la más grande y diversa.²⁴

La división *Mobius* de polipéptidos macrocíclicos se diferencian por la presencia de un enlace peptídico. Esta clasificación de polipéptidos está compuesta por 29 a 33 aminoácidos hidrófobos, con un porcentaje del 60 % de regiones conservadas, provocando que la variabilidad y diversidad de estas estructuras sean limitadas, los ciclótidos más representativos de esta división son la Kalata B1 y Kalata B2.²⁵

En la división de *Brazalete* se han encontrado alrededor de 60 miembros. La totalidad de estos ciclótidos no poseen enlace peptídico en posición Cis, originando la formación de un brazalete. Estos polipéptidos macrocíclicos tienen alrededor de 28 y 31 aminoácidos, a diferencia de la división *Mobius* estos solos tienen 10 residuos conservados (los 6 residuos de cisteína que forman el nudo cíclico de cisteínas "NCC"). Los más representativos de esta clasificación son la circulina A11 y la cicloviolacina que presentaron actividad anti-VIH.²⁶

1.3. Estructura y características de los ciclótidos de *Rubiaceae*

Los ciclótidos están compuestos por cadenas de aminoácidos (27 – 33 aminoácidos), estos aminoácidos varían su posición en las diferentes conformaciones que puedan tener los ciclótidos, determinando así su actividad biológica, caracterizándose por la formación de un enlace peptídico terminal formando un enlace entre un grupo amino – carboxilo.²⁷

En los ciclótidos los residuos que intervienen en esta unión son un residuo de Aspartato (ASP) junto a un residuo Glicina (GLY) y otras variantes, al replicar numerosas veces este proceso, se forma una cadena de polipéptidos originando así el esqueleto de los ciclótidos.²⁸

La estructura cíclica de los ciclótidos fue demostrada en un ensayo de identificación en un árbol tropical *Palicourea condensata*, donde se aisló el ciclótido Palicourein, utilizando la espectrometría de masas de ionización, obteniendo un peso molecular de 3904,1 Da. La

masa calculada para el péptido lineal fue de 3928,5 Da. obteniendo 6 Da. más que el peso molecular obtenido, sugiriendo que la estructura de 37 aminoácidos era un péptido cíclico ya que el peso sobrante era representado por la pérdida de una molécula de agua (18 Da) en la formación del enlace peptídico terminal del ciclótido, los restantes 6 Da eran por la pérdida de hidrógenos en la formación de los puentes disulfuro del NCC.²⁹

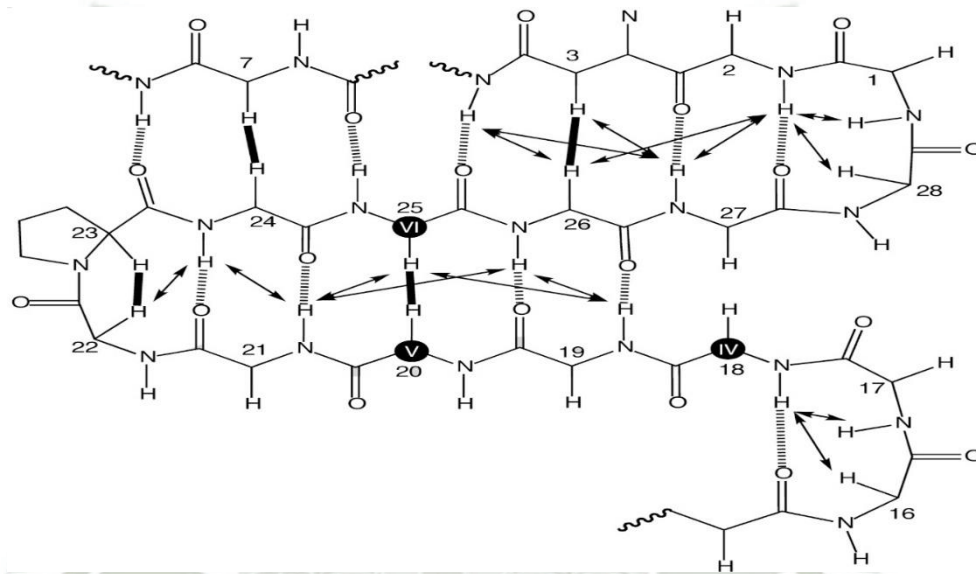


Figura 1.1. Estructura secundaria del ciclótido kalata B12, los residuos de las tres cisteínas (CysIV, CysV y CysVI) están representadas en círculos negros junto a la numeración de los residuos presentes en el ciclótido.²⁷

Al tratar de secuenciar los residuos de cisteínas, se tuvo inconvenientes, ya que esto se debe a que las enzimas no encontraban un punto de unión debido a que el N-terminal se encontraba enlazado al C-terminal demostrando así la estructura cíclica del ciclótido palicourein.³⁰ También fue reportado un ciclótido de 34 residuos, este polipéptido macrocíclico fue aislado de una *Cucurbitaceae* que posee una cadena principal y residuos de cisteína junto a sus enlaces peptídicos, este presenta una estructura tridimensional parecida a su semejante de la familia *Rubiaceae* pero poseen poca homología. Entre las moléculas que fueron reportadas en los últimos años, el ciclótido

Palicourein (*Rubiaceae*) es el que posee 37 aminoácidos (Figura 1.2) siendo el ciclótido más grande de origen vegetal.

RNGDPTFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRS DGLCK

Figura 1.2. Secuencia lineal del ciclótido Palicourein, obtenida luego de una digestión con endoproteinasa Lys- C

1.3.1. Enlace peptídico

El enlace peptídico está presente en la mayoría de los aminoácidos, estos se forman a través de una reacción de condensación, originando en la mayoría de los casos un enlace trans y siendo algunas veces en posición Cis. En la reacción de condensación los aminoácidos forman una cadena lineal y una molécula de agua ³¹ (Figura 1.3), originando así el enlace amina entre los aminoácidos.

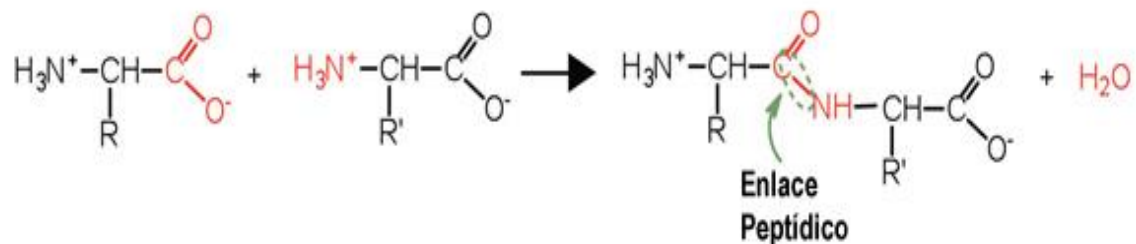


Figura 1.3. Formación del enlace peptídico, donde interaccionan las colas amino y carboxilo formando el enlace amida enlace peptídico y originando una reacción de condensación formando una molécula de agua.³²

Una cadena de solo dos aminoácidos se denomina dipéptido, sin embargo, una cadena con más de tres aminoácidos es considerado como polipéptido. Las proteínas poseen colas, están conformadas por dos aminoácidos terminales, un aminoácido con grupo amino libre (extremo N-terminal) a la izquierda y un aminoácido con un grupo carboxilo libre (el extremo C-terminal) a la derecha (Figura 1.4).

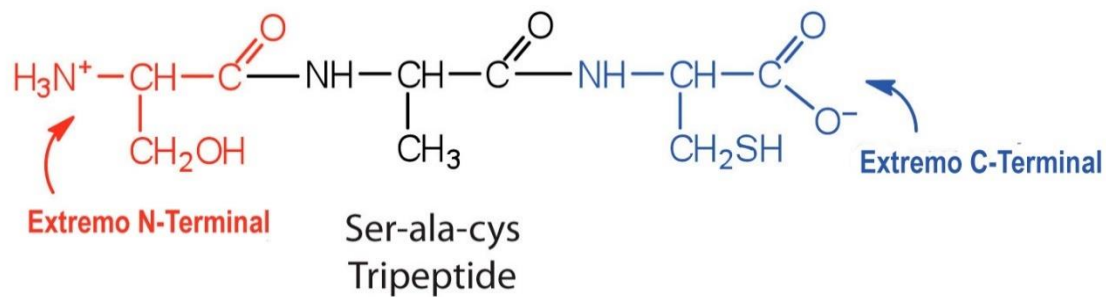


Figura 1.4. Formación del enlace peptídico, donde interaccionan las colas amino y carboxilo formando el enlace amida/ enlace peptídico y originando una reacción de condensación formando una molécula de agua.³²

1.3.2. Enlaces disulfuro

El enlace disulfuro o puente disulfuro es un enlace covalente formado de dos grupos tiol, su formación se da por reacción de oxidación de los grupos sulfhídrico (Figura 1.5).³³

Los puentes disulfuro muchas veces proporcionan a la proteína su estabilidad y funcionalidad, debido a que participan en el plegamiento oxidativo, formación de la estructura y estabilidad. El estudio de los puentes disulfuro permite determinar las propiedades conformacionales y la formación e interacción entre los residuos de cisteínas dentro de la proteína (Figura 1.6).³⁴

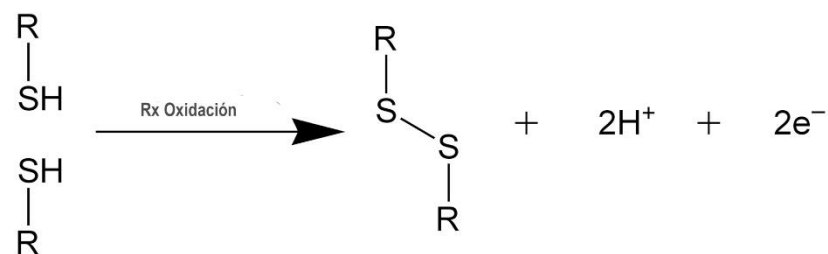


Figura 1.5. Formación de los enlaces disulfuro mediante la Oxidación de grupos sulfhídricos.³³

Los enlaces disulfuro tienen una energía de disociación de 60 kcal/mol, y la distancia de los enlaces ronda los ~ 2.05 Å. Su estabilidad esta relacionada a la posición de sus ángulos, siendo más estable en diedros de 90°, en ángulos de 0 a 180° expresan una capacidad oxidante y afectan directamente a la función de la proteína.³⁴

En los ciclótidos los puentes disulfuro cumplen un rol importante en la estabilidad de la estructura terciaria, ya que, para lograr la secuenciación, es necesario reducir los puentes disulfuro con la utilización de grupos tiol.

La formación de los puentes disulfuro está relacionada directamente con la proximidad de los residuos de cisteína, uniendo a sus átomos de azufre dentro de un rango requerido para realizar el enlazamiento, con esto se puede lograr identificar y caracterizar las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas ya que se puede complementar la medición entre enlaces.³⁵

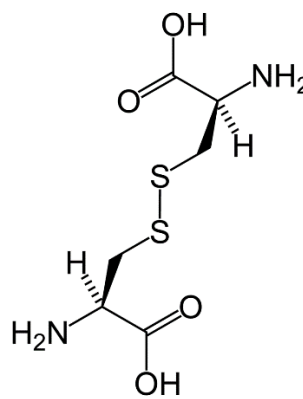


Figura 1.6. Enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína.³⁴

Los ciclótidos son polipéptidos de origen vegetal, estos presentan residuos de cisteína las cuales interactúan y forman puentes disulfuro para darle estabilidad estructural a la molécula. La formación de los puentes disulfuro en los ciclótidos es conocido como Nudo Cíclico de Cisteínas (NCC), dándole funciones a los ciclótidos, estabilidad térmica, resistencia frente a la degradación enzimática y química.³⁶ La presencia del NCC confiere a la planta mecanismos de defensa contra microorganismos e insectos dañinos. Los enlaces producidos por los residuos de cisteína están constituidos por una variedad de aminoácidos que pueden ser intercambiados, formando nuevas conformaciones estructurales con actividades biológicas que pueden ser utilizadas para fármacos que interactúen con la membrana celular.³⁷ El bucle o nudo de cistina (Figura. 1.7), y estructura circular de los ciclótidos permiten ser susceptibles a la síntesis química, permitiendo ser más flexible a una gran variedad de combinaciones y sustituciones de

residuos de aminoácidos; estas propiedades permiten generar una configuración para la creación de moldes de péptidos, generando andamios para medicamentos capaces de expresar diferentes bioactividades.³⁸

Para generar el enlace peptídico entre el C/N-terminal se repite la liberación de agua, pero aún no se detalla quienes participan en la conformación, por lo que se supone la intervención de una proteasa, liberando al residuo Ácido aspártico (ASP) y obligando a la estructura a formar un enlace peptídico originando una estructura cíclica, todo este proceso se origina dentro de la vacuola de la planta.³⁹

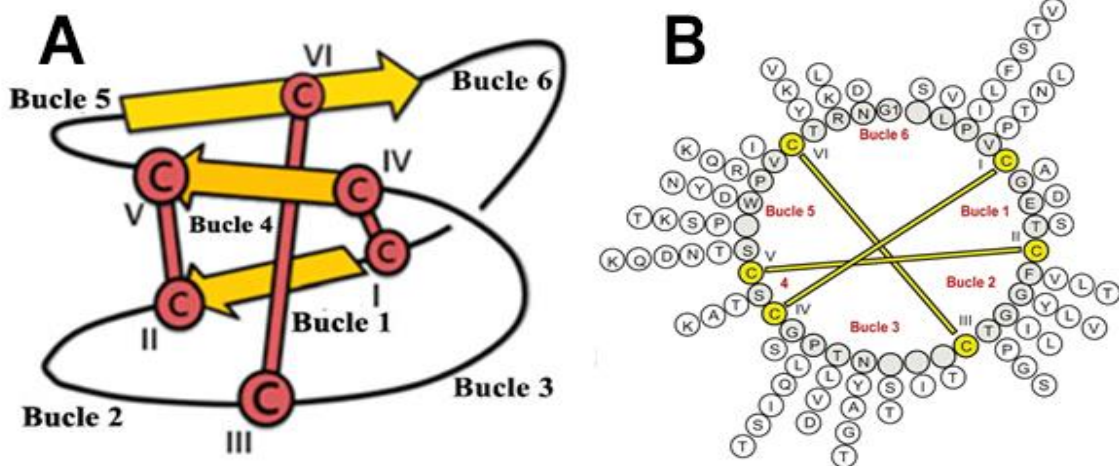


Figura 1.7. A. Estructura clásica de un ciclótido, se observa la presencia del nudo de cisteína NCC, también se muestra el plegamiento oxidativo. B. Estructura desarrollada de ciclótido kalata B1, formando los enlaces disulfuro (I-IV, II-V, III-VI), mostradas en barras amarillas que son los residuos de cisteína.⁴¹⁻⁴²

1.3.3. Nudo cíclico de cisteínas

Para determinar la presencia de un nudo cíclico de cisteínas se puede utilizar RMN, rayos X o cristalografía, ya que revelan los enlaces disulfuro entrelazados.

Este nudo aporta una notable estabilidad, resistencia al calor, evitan la degradación endoproteolítica y les da resistencia frente a enzimas. El NCC se asocia muchas veces a las funciones que expresan algunas proteínas, estas tienen un potencial terapéutico ya que algunos péptidos presentan actividad frente al control de la obesidad y la diabetes.⁴³ Los residuos de cisteína forman parte de la estructura principal de la mayoría de los polipéptidos, muchas veces este bucle formado participa en la resistencia contra proteasas.

Este NCC le brinda una estabilidad a su estructura nativa, ya que muchas veces al romper el bucle se ha visto dañado al péptido, dificultando su plegamiento *in vitro*, esto se ve reflejado al momento de realizar el plegamiento oxidativo, para ello es necesario la utilización de los puentes disulfuro con diseleniuro provocando su plegamiento y sin afectar a la conformación nativa o actividad biológica. En la mayoría de casos al momento de aislar los polipéptidos se observa dificultades al formar tanto estructuras cíclicas como el plegamiento oxidativo, ya que este último se forma gracias a la presencia de la cisteína y los puentes disulfuro, una alternativa para realizar este plegamiento *in vitro* es con la aplicación del plegamiento oxidativo integrado, donde este actúa sobre los residuos de cisteína y sustituye los puentes disulfuro con un puente diseleniuro formando un selenopéptido (Figura 1.8).⁴⁴

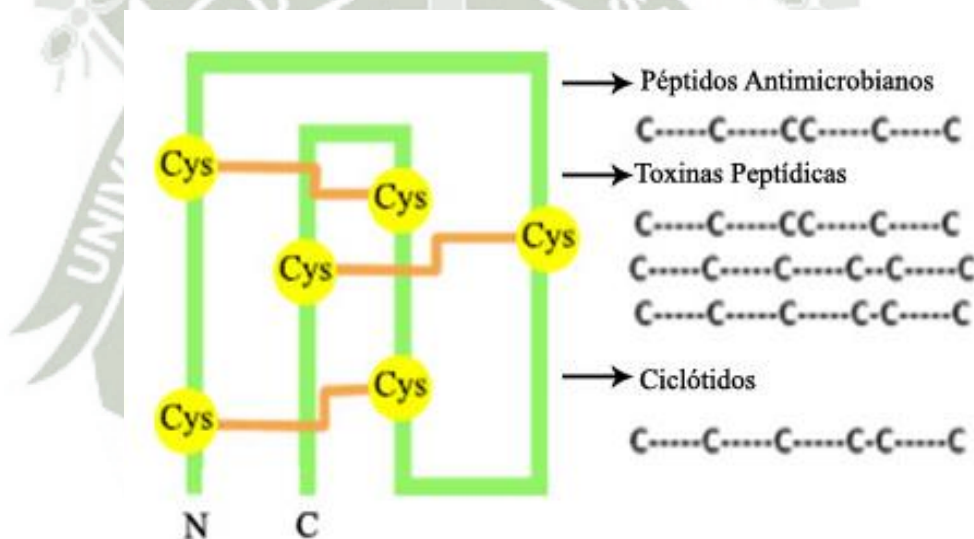


Figura 1.8. Se observa los diferentes modelos de cisteína inhibitoria en diferentes péptidos, también se aprecia el enlace característico de cisteína de los ciclotidos.⁴⁵

Estos polipéptidos macrocíclicos obtienen su actividad biológica a su nudo de cisteína, así como la estabilidad térmica ya que al verse afectada la estructura de cisteína se disminuye su estabilidad además de formar un mal plegamiento. La estructura cíclica de los ciclotidos es formada gracias a la presencia de los residuos de cisteína, brindándole una superioridad

sobre proteínas lineales, estabilidad y resistencia frente a enzimas proteolíticas ya que carecen de un final asegurando su funcionalidad. Entre las diversas actividades biológicas, destaca la posibilidad de utilizar a los ciclótidos como andamios para fármacos.⁴⁶

1.3.4. Influencia de los puentes disulfuro en el plegamiento

Los enlaces disulfuro se encuentran en la mayoría de las proteínas, ya que estabilizan a las cadenas de péptidos. Estos enlaces formados imponen restricciones al momento de plegar a la proteína, dicho esto los enlaces disulfuro son de importancia al momento de formar la estructura terciaria determinando las funciones (forma, reología, acción enzimática). También están relaciones con la activación o desactivación de las funciones, la proteína puede formar enlaces disulfuro, así como reducirlos dependiendo de la función, estrés o influencia de los alrededores.⁴⁷

1.3.5. Plegamiento y flexibilidad las proteínas cíclicas

Las proteínas están compuestas por aminoácidos, estos contienen la información para realizar el plegamiento en los diferentes residuos que contenga la proteína con el fin de poder formar su estructura tridimensional. Los ciclótidos poseen puentes disulfuro, estos forman enlaces covalentes entre los residuos de cisteína junto a los grupos tiol, son los encargados de darle rigidez al ciclótido, dando estabilidad a su estructura terciaria y protegiendo a su conformación nativa.^{48, 49} En la formación del plegamiento oxidativo se da la interacción de diferentes uniones interatómicas, estas uniones originan campos de fuerza y determinan el estado energético de la proteína, gracias a estos campos de fuerza se puede regular el desplazamiento de los átomos, generalmente en las proteínas de polipéptidos se encuentran interacciones de van der Waals y coulómbicas.⁵⁰ Para definir el plegamiento de la proteína muchas veces depende de cada átomo, ya que solo la presencia de los puentes de disulfuro en el nudo de cisteína estabiliza a la proteína, en cambio la mayoría de átomos tiende a buscar un estado de mínima energía, esta energía mínima esta relacionan con la energía cinética y la temperatura a la que es expuesta la proteína, indicando que el plegamiento puede originarse en un rango de temperatura.⁵¹ Los efectos de la temperatura y el nudo de cisteína intervienen en el plegamiento, ya que

producen un ordenamiento molecular donde los átomos buscan la energía mínima, estas características se repiten en todas las proteínas y solo varía el potencial energético debido al tamaño o composición de la proteína.⁵² Este plegamiento oxidativo que se origina en los ciclótidos es de suma importancia, es el encargado de activar a la proteína conformando el sitio activo y sitios de unión pero los ciclótidos carecen de este último por ser estructuras cíclicas sin C/N terminal. En tanto a su flexibilidad, es el movimiento de sus átomos, estos pueden presentar deformaciones y desplazamientos al momento de formar un plegamiento o cuando la estructura terciaria se está definiendo por su topología estructural, todo este proceso tiene relación con el rango de temperatura a la que la proteína está expuesta, modificando su estructura.⁵³

1.3.6. Termoestabilidad

La aplicación física y química que algunas proteínas han desarrollado a lo largo de su evolución, lograron que estas puedan adaptarse a variaciones de temperatura, preservando su conformación nativa y asegurando su actividad biológica. El estudio molecular de las proteínas termoestables, permitirá el desarrollo de técnicas que permitan identificar las regiones termoestables y la posterior manipulación de enzimas para el entorno industrial.⁴⁶ Estos ciclótidos poseen un elevado grado de termoestabilidad, gracias a la poca flexibilidad de su estructura ya que poseen un nudo de cisteína (NCC), esto reduce considerablemente la flexibilidad de la proteína y asegura que esta sea estable a variaciones en la temperatura.⁵⁴ La proteína ven afectadas su actividad por la temperatura, estas pueden reducir su actividad al ser expuestas a rangos elevados o bajos de temperatura.⁵⁵ La temperatura es la encargada de moldear la proteína, esto debido a que gran parte de la distribución entre átomos se ve afectada por esta, provocando así una relación directa entre la termoestabilidad y la flexibilidad.⁵⁶ Para determinar la estructura termoestable de una proteína, se puede utilizar dos técnicas; la forma experimental o computacional, en ambas técnicas es necesario la identificación de la topología tridimensional de la proteína, puede obtenerse mediante difracción de rayos X o por simulación de campos de fuerza.⁵⁷

1.3.7. Biosíntesis de los ciclótidos

Se cree que son sintetizados ribosómicamente como proteínas precursoras, esto se da en el retículo endoplasmático (RE) con una secuencia-targeting, una pro-región y una región conservada N-terminal junto a un dominio C-terminal. Este precursor pasa por un proceso postraduccional para generar un péptido cíclico. Se cree que una región conservada de Asparagina (ASN) en el sitio de unión C-terminal puede ser enlazada por asparaginil endoproteínasa (AEP) formando así las ciclaciones del péptido. Este AEP participa en el proceso postraduccional, esta enzima es la encargada de enlazar los terminales de los péptidos.⁵⁸ En la Figura 1.9, se puede apreciar la formación teórica del enlace cíclico-peptídico.

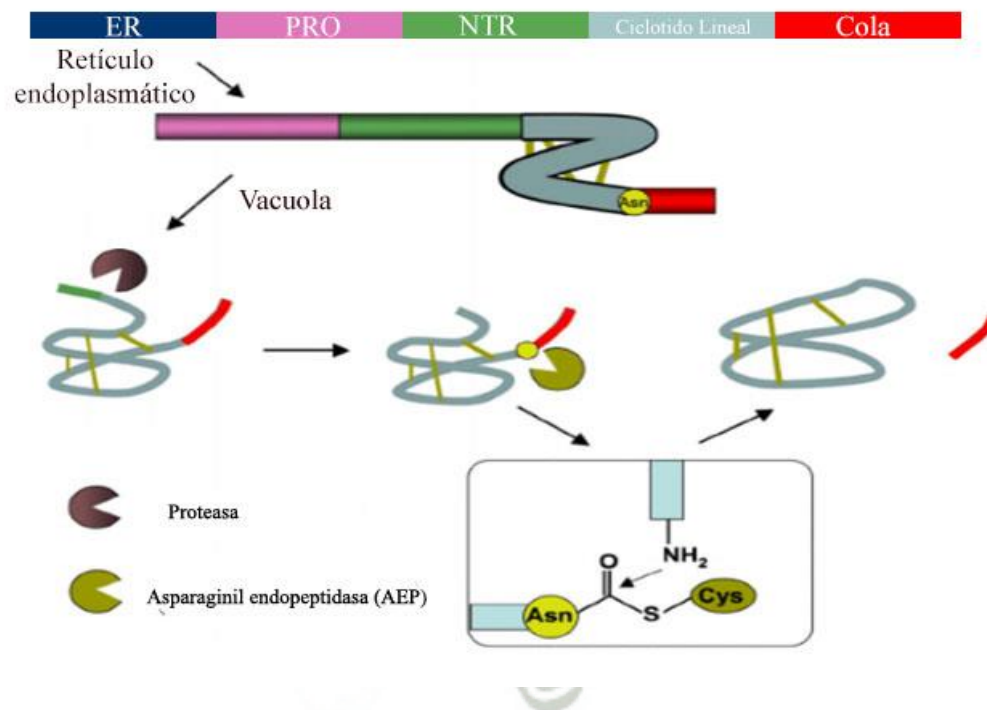


Figura 1.9. Formación de un péptido cíclico dentro de una planta, en esta participa el Retículo Endoplasmático, comprende una secuencia Target (azul), una pro-región (púrpura), un dominio del ciclótido (gris) y la cola C-terminal (rojo), dentro de la vacuola se forman los enlaces disulfuro, para dar paso a una proteasa (marrón) desconocida que recorta al precursor, la enzima AEP rompe una porción de la cola C-terminal, exponiendo a un residuo de Aspartato (ASP) que es enlazado con el residuo GLY N-terminal para formar un estructura cíclica.⁵⁹

1.3.7.1. Secuenciación de los ciclótidos de *Rubiaceae*

El primer ciclótido fue obtenido de una planta africana llamada *Oldenlandia affinis* (*Rubiaceae*), para lograr esto se utilizó una digestión enzimática y resonancia magnética nuclear, detallando la estructura macrocíclica de 29 aminoácidos.⁶⁰ Gracias a estos estudios se buscó aislar a otros similares, es así que se emplearon varios tejidos de la planta generalmente de hojas y tallo, logrando determinar tres criterios para su correcta identificación, se utiliza un extracto con metanol, seguidamente la identificación con HPLC de fase inversa, esto con el fin de determinar su masa (2700-3800 Da) y confirmando su estructura con una espectroscopia de masa (EM), ya que presenta dificultades al momento de secuenciar, estos ciclótidos son resistentes a la proteólisis enzimática impidiendo el acoplamiento de las enzimas, para lograr una correcta secuenciación es necesario reducir los puentes disulfuro afectando a su estructura oxidativa, con este proceso se puede utilizar enzimas seleccionadas liberando los extremos terminales más específicamente la endoproteinasa-GLU (Figura 1.10), esta enzima afecta al residuo conservado GLU en el bucle 1.⁶¹ Este métodos para secuenciar con endoproteinasa-GLU solo es posible si el ciclótido posee un residuo de ácido glutámico (GLU), otra opción es la utilización de diseños de primers para secuencias conservadas cercanas al retículo endoplasmático (RE) siendo un método más eficaz y rápido. Gracias a estos métodos se logró desarrollar una base de datos especializada en proteínas circulares (www.cybase.org.au) albergando aproximadamente a 300 secuencias, además de brindar herramientas capaces de graficar las estadísticas del bucle, así como la búsqueda de fragmentos para la digestión de secuencias y otros análisis de secuencias lineales.⁶²



Figura 1.10. Reducción de los enlaces disulfuro con tripsina y endoproteinasa GluC.⁶³

1.3.7.2. Aplicación biológica de los ciclótidos

Estas estructuras poseen una importancia biológica, debido a la gran variedad de funciones proporcionadas por su conformación y estabilidad estructural, reflejando un elevado interés para la industria farmacéutica. Entre las funciones que estos expresan, está la bioactividad como insecticida, actividad uterotónica, actividad antimicrobiana, actividad anti-VIH, actividad anticáncer, actividad hemolítica, antagonista de la neurotensina e inhibidora de la tripsina, siendo estos atractivos para la creación de fármacos y su posterior aplicación en tratamientos contra enfermedades. Se ha demostrado la eficiencia de los ciclótidos que tienen frente a microorganismos e insecticidas, partiendo de su andamio para el diseño de fármacos y penetración celular, dando como resultados la utilización de ciclótidos para tratamientos contra el cáncer, estos expresan una estabilidad en el suero humano y una elevada actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer p53, con la ingeniería de péptidos se diseñó un péptido lineal capaz de imitar el fragmento N-terminal de p53, resultado ser en un potencial antagonista a Hdm2/HdmX, para lograr esto se diseñó el ciclótido MCotI-I logrando una unión óptima intracelular formando interacciones proteínas-proteína.^{64,65} Además los ciclótidos forman grandes poros en las bicapas lipídicas, propiedad que puede ser utilizada para el diseño de andamios moleculares, con el fin de introducir medicamentos a la región afectada, ya que las membranas celulares son el sitio de acción natural (esto puede deberse a la afinidad de los ciclótidos con la fosfatidietanolamina), este proceso paralelamente en las plantas genera moléculas encargadas de la defensa y protección. Otros estudios de productos naturales que expresaban una actividad anti-VIH demostraron que extractos de *Palicourea condensata* (*Rubiaceae*) presentaban actividad en XTT-tetrazolio.^{66, 67} Esta actividad fue analizada en el Instituto Nacional del Cáncer de los EE. UU, este hallazgo fue dado por tamizaje de principios activos procedentes de plantas y productos naturales, realizando un análisis RMN. Este estudio permitió encontrar a un par de péptidos más estables que el péptido estándar; para la validación de los resultados se empleó métodos de secuenciación donde se pudo apreciar que estos péptidos expresaban actividad anti-VIH.⁶⁸

La actividad biológica de los ciclótidos dentro de la planta *Rubiaceae*, están relacionados con los mecanismos de defensa contra microorganismos y plagas; por este motivo son

considerados agentes plaguicidas para la regulación y control de cultivos vegetales.⁶⁹ Al poseer un efecto citotóxico estos ciclótidos han demostrado tener efecto frente al crecimiento bacteriano de bacterias grampositivas y gramnegativas,⁷⁰ esta característica que se da en la naturaleza brinda la defensa de las plantas, cumpliendo un rol antimicrobiano y anti-insecticida, en animales se ha observado la misma función de defensa, condensado a los péptidos hasta convertirlos en veneno y en hongos les brinda un alto grado de toxicidad, produciendo anatoxinas, estas estructuras se forman por presencia de tryptationine, todas estas toxinas se sintetizan en los ribosomas.⁷¹

1.3.7.3. Polipéptidos cíclicos y defensinas

Las defensas humanas están conformadas por péptidos, estos cumplen un rol antimicrobiano, mucho se especula acerca de su actividad biológica frente a enfermedades incurables como lo es el VIH, estos péptidos son considerados defensinas, y son los encargados de activar el sistema inmunitario y quimiotaxis, con esta propiedad se podrá diseñar drogas específicas y antirretrovirales. Las defensinas son péptidos de estructura conservada, al tener una síntesis endógena pertenecen a la respuesta inmune innata, dentro de sus funciones poseen un potencial profiláctico y actividad anti-VIH, respecto a su estructura tienen un tamaño de 2-5 kDa específicamente entre 30-45 aminoácidos, además estos péptidos tienen en su estructura la formación de un bucle de cisteínas, esta propiedad es la que le confiera todas sus actividades biológicas y antimicrobianas (antibacterianas, antifúngicas, antivirales), esta actividad antimicrobiana puede verse afectada por su estructura tridimensional o la carga catiónica neta. Estos son sintetizados en epitelios y algunos leucocitos, se clasifican en familias alfa (α), beta (β) y teta (θ) debido a su distribución de sus puentes disulfuro en el espacio.⁷² Estas tres subfamilias presentan actividad VIH algunas en menor grado debido a su estructura o número de aminoácidos.⁷³
⁷⁴ Por este motivo es de gran importancia el estudio de péptidos provenientes de la naturaleza, ya que estos pueden representar un tratamiento a enfermedades retrovirales, ya que pueden dar un potencial a la actividad natural de defensa, formando agentes profilácticos capaces de detener o retardar la replicación del VIH, estas nuevas terapias serán posibles gracias a la aplicación de la ingeniería de péptidos.⁷⁵ La aplicación de la

ingeniería de péptidos permitirá la utilización de los ciclótidos aislados de plantas en tratamientos experimentales, ya que permitirá el desarrollo y creación de nuevos fármacos, considerándolos como andamios capaces de atravesar cualquier célula, además de la propia acción que estos ejercerán en la membrana celular. La diferencia más notable con terapias basadas en productos biológicos, estos ofrecen una rápida accesibilidad sintética, debido a sus moléculas pequeñas, tienen un costo bajo de producción, estabilidad estructural por su enlace amino y puentes disulfuro, permeabilidad de la membrana, estabilidad biológica (esto gracias a que la mayoría de ciclótidos puede permanecer por grandes lapsos de tiempo en el suero sanguíneo sin degradarse) y finalmente la biodisponibilidad oral.⁷⁶

1.3.7.4. Potencial inmunosupresor de los ciclótidos

El cuerpo humano posee una de las más rápidas respuestas inmunológicas, esta es la principal línea de defensa contra enfermedades y patógenos, muchas de estas funciones se ven afectadas por virus, estos afectan el correcto funcionamiento de las defensas, produciendo en muchos casos enfermedades autoinmunes, una enfermedad que afecta constantemente a personas ancianas es la artritis reumatoide, está relacionada con las alteraciones en el sistema defensivo, provocando una distorsión entre glóbulos blancos y haciendo que estos se ataquen entre sí, resultando la degradación de tejidos y provocando la enfermedad.⁷⁷

1.4 Bioinformática

La Bioinformática muestra una utilidad y simplicidad en la realización de un experimento computacional, donde se puede determinar la estructura de una proteína o la información de la función de una pieza recién secuenciada de ADN, reforzando la investigación asistida por ordenador, facilitando datos para el científico experimental, permitiéndole ejecutar aplicaciones informáticas, incluido el uso de base de datos e Internet.⁷⁸

Una característica de la Bioinformática es la que permite llevar a cabo los análisis estadísticos y procesamiento de base de datos de manera rápida y exacta ofreciendo

herramientas que facilitan al investigador diferenciar los resultados, reduciendo la redundancia y acelerando la investigación.⁷⁹

1.4.1 Mecánica molecular

El modelamiento molecular es la correcta distribución en el espacio de todos los átomos, esto se puede lograr teniendo en cuenta los campos de fuerza, finalmente se obtiene una estructura terciaria, esta define las propiedades y actividades biológicas de la proteína. Para realizar el debido modelamiento es necesario obtener las secuencias de los ciclótidos, estas secuencias obtenidas de la base de datos Cybase (Cybase.org) son secuencias lineales, siendo de suma importancia el modelar su estructura y determinar su posición en el espacio, para poder activar las funciones del ciclótido.⁸⁰ Este modelamiento se divide en modelamiento molecular y modelamiento cuántico, la diferencia entre estos es la región orientada, esto quiere decir que a nivel molecular abarca un sistema robusto pero inexacto, mientras que a un nivel cuanto se realiza un cálculo más fino y detallado.⁸¹

1.4.1.1 Modelamiento proteico

Para realizar el modelamiento proteico, es necesario tener en cuenta la variedad de aminoácidos, en la naturaleza se han reportado 20 aminoácidos naturales distintos. Para la conformación del esqueleto de la proteína, se necesita integrar un proceso dinámico donde intervengan atracciones y repulsiones físico-químicas, estos aminoácidos contienen toda la información para la distribución en el espacio de su estructura tridimensional, esta información es obtenida de las secuencias de los aminoácidos.⁸² El modelamiento proteico puede ser desarrollado por numerosos métodos, estos métodos están basados en homología, campos de fuerza, probabilidad matemática, ordenamiento molecular, distribución electrónica.

Entre las principales técnicas de desarrollo están:

a) Técnicas estadísticas

Están basadas en clasificadores de bayes, estos realizan un análisis cualitativo de los atributos y valores del sistema, señalando la importancia de estos, y cómo se relacionan

estas variables. Brinda una medida probabilística de todas las variables y cómo estas intervienen en el sistema

b) Método de Chou-Fasman

Método basado en algoritmos, desarrollado en 1974, tiene la función de predecir la estructura secundaria, pero como fue diseñada en los inicios de la bioinformática, solo se puede calcular la estructura de proteínas globulares, este algoritmo analiza cada aminoácido y lo distribuye en el espacio, esta distribución está relacionada con las sus estructuras cristalográficas.^{83,84}

c) Garnier, Osguthorpe y Robson

Este método está basado en el algoritmo de Chou-Fasman, esta emplea la información contenida en los aminoácidos y el efecto de los residuos vecinos, determinando la conformación que tendrá el aminoácido central.

d) Modelamiento de rejillas

Este modelo representa a la proteína en una distribución simplificada, este ordenamiento se da de manera en que encajen todos los aminoácidos en una rejilla (diseñada en dos o tres dimensiones). Existen variantes de este método, el más conocido es el HP, como lo define sus siglas este comprende la hidrofobicidad y polaridad de los aminoácidos.⁸⁵

e) Modelamiento por vecinos más cercanos

El método utiliza las características de los vecinos, esto refiriéndose a que todos comparten una distribución y característica igual, este método utiliza la homología de las proteínas para poder determinar la estructura de la proteína desconocida.⁸⁶

f) Modelamiento por algoritmos evolutivos

Utiliza la búsqueda computacional, está conformada por aproximaciones heurísticas de búsqueda global. Esta búsqueda es realizada por algoritmos genéticos, estos algoritmos utilizan variables evolutivas en biología (herencia, mutación, selección, recombinación).⁸⁷

1.4.1.2. Estructura conformacional

Es la conformación de la proteína, estructura, desarrollo durante el plegamiento oxidativo, evaluando el papel que cumplen los puentes disulfuro. La estructura conformacional está conformada por la estructura, el orden conformacional y la topología terciaria. La

estructura está compuesta por una específica distribución espacial de todos los grupos funcionales, teniendo en consideración la distancia entre residuos debe ser $< 3 \text{ \AA}$, obteniendo la estructura secundaria del péptido y una estructura terciaria describiendo la posición espacial de todos los átomos en el espacio.⁸⁸ El Orden conformacional es la distribución de variables fijas, refiriéndose a que los átomos no dependen de una distribución espacial, debido a que todos tienen la misma conformación en conjunto utilizando solo el radio de giro, estas conformaciones pueden variar por las distancias interatómicas. Finalmente, la topología terciaria es la obtención global de la posición de todos los átomos en el espacio definiendo el esqueleto de la proteína, donde solo se obtienen los dominios y subdominios que conforman a la proteína.⁸⁹

1.4.1.3. Plegamiento oxidativo

Para lograr la formación del plegamiento oxidativo es necesario que la proteína tenga dos características, la presencia de los puentes disulfuro y la formación de la estructura terciaria nativa obteniendo una distribución espacial estable, de lo contrario la proteína tendrán un mal plegamiento, originando trampas cinéticas. Dado que hay conformaciones de proteínas sin enlaces disulfuro nativo, estas se ven afectadas al no poder tener un correcto plegamiento, por lo que para su estabilización solo sería necesario la formación de puentes disulfuro. Los enlaces disulfuro se encuentran en la mayoría de las proteínas, ya que estabilizan a las cadenas de péptidos. Estos enlaces formados imponen restricciones al momento de plegar a la proteína, dicho esto los enlaces disulfuro son de importancia al momento de formar la estructura terciaria determinando las funciones (forma, reología, acción enzimática). También están relacionados con la activación o desactivación de las funciones, la proteína puede formar enlaces disulfuro, así como reducirlos dependiendo de la función, estrés o influencia de los alrededores.⁹⁰

1.4.1.4. Dinámica molecular

La dinámica molecular es utilizada para determinar el estado final de un sistema en un tiempo futuro, siendo este un método determinístico, este proceso solo puede ser efectuado con un sistema posicionado en el espacio (topología y velocidades de los átomos), logra

refinar energéticamente el sistema, utiliza un algoritmo de minimización, disminuyendo las tensiones de la estructura.⁹¹ La dinámica molecular es un método determinístico, este predice el sistema en un estado futuro, la dinámica molecular calcula las fuerzas de los átomos en cada paso de tiempo junto a la posición y velocidad, generando la trayectoria (describiendo las variables dinámicas con el tiempo).

Para realizar una simulación de dinámica molecular se debe:

- Función de energía potencial, esta función debe expresar la energía de las partículas individuales.
- Respuesta a la ecuación de Newton, obteniendo las posiciones y velocidades de cada partícula en un tiempo (t).

Finalmente, la dinámica molecular proporciona las posiciones “x” y velocidades “v” de cada átomo en el sistema en un periodo de tiempo, denominando estos datos como la trayectoria del sistema.

Determinando la trayectoria del sistema se puede calcular las propiedades macroscópicas, como lo es: Energía cinética; energía potencial; energía total; temperatura; presión; distribución radial; capacidad calorífica; constante dieléctrica. La simulación de dinámica molecular comprende tres etapas en su proceso de ejecución, la primera de estas es la “iniciación”, las partículas del sistema son distribuidas en el espacio, cada partícula posee una posición conocida y una velocidad al azar determinada por la temperatura total del sistema. Este proceso es ejecutado con el fin de obtener un sistema con velocidad cero (la velocidad de las partículas del sistema sea cero, reduciendo la energía del sistema). La segunda etapa continúa con las velocidades en cero, repite el procedimiento del primer paso para asegurar que el sistema se encuentre en equilibrio, permitiendo obtener las trayectorias finales de las partículas (posición y velocidad en un tiempo “t”). Finalmente, la tercera etapa son los resultados obtenidos y determinación de las trayectorias para poder definir las propiedades del sistema.

1.4.1.4.1. Elementos de la dinámica molecular

a) Campo de Fuerza

Un campo de fuerza está conformado por ecuaciones potenciales y parámetros, esto con el fin de representar las interacciones interatómicas, manteniendo la geometría de las moléculas. Los campos de fuerza comprenden las interacciones de los átomos, desprendiendo las interacciones de enlace (torsión de los enlaces, desviación de los ángulos y la rotación de los diedros) y las interacciones no enlazantes (potencial electrostático, dispersión de las partículas y exclusión de Pauli). Los campos de fuerza permiten determinar el comportamiento de sistemas analizando sus átomos, por este motivo son derivados de las aproximaciones de datos experimentales considerándolos empíricos, entre los campos de fuerza utilizados para las simulaciones de dinámica molecular se encuentran: AMBER (Construcción de modelos asistidos y refinamiento de energía), utilizado para minimización de energías en estructuras terciarias; CHARMM (Química en Harvard mecánica molecular) y el OPLS (Potencial optimizado para las simulaciones de líquidos), que contiene los parámetros de la mayoría de los átomos y moléculas siendo este el utilizado en Gromacs.

El Campo de Fuerza OPLSAA está conformado por:

Enlace de estiramiento:

$$E_{bond} = \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 \quad (2.1)$$

Enlace angular:

$$E_{angle} = \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \quad (2.2)$$

No enlazante:

$$E_{ab} = \sum_i^{on a} \sum_j^{on b} [q_i q_j e^2 / r_{ij} + 4\epsilon_{ij} (\sigma_{ij}^{12} / r_{ij}^{12} - \sigma_{ij}^6 / \sigma_{ij}^6)] f_{ij} \quad (2.3)$$

Enlace torsional:

$$E(\phi) = \frac{V_1}{2} [1 + \cos(\phi + f1)] + \frac{V_2}{2} [1 - \cos(2\phi + f2)] + \frac{V_3}{2} [1 + \cos(3\phi + f3)]$$

(2.4)

Donde:

- **Enlace de estiramiento:** Son las deformaciones de las longitudes, alargamiento o acortamiento de los enlaces.
 - Kr , Constante de fuerza de enlace.
 - r , Valor real de la longitud.
 - req , Enlace variable o valor en equilibrio.
- **Enlace angular:** Mide las distorsiones de los ángulos de enlace.
 - $K\theta$, Constante de fuerza angular.
 - θ , valor real de la longitud angular.
 - θeq , Término angular variable.
- **No-enlazante:** Términos no enlazantes, formado por las interacciones coulómbicas, representa a las cargas atómicas parciales. también se encuentra las interacciones épsilon y sigma que corresponden a los coeficientes de Lennard Jones.
- **Enlace torsional:** Energía de torsión debida a la modificación de los ángulos diedros por rotación de los enlaces.

b) Energía Potencial

La energía potencial cumple un rol muy importante en la determinación de las trayectorias, proporcionando al sistema una función que determine su posición. En la dinámica molecular la energía potencial es la energía de una molécula en un campo de fuerza, el campo de fuerza proporciona una distribución de las moléculas en el espacio. Esta energía

de la molécula es obtenida por la interacción entre las fuerzas de atracción y la repulsión de otras moléculas en el sistema. La energía potencial del sistema es obtenida con la posición relativa de los átomos de las moléculas que comprenden el sistema, pudiendo determinar la superficie de la energía potencial (SEP) con los cambios geométricos que experimente el sistema. Para una representación del SEP, partiría de un modelo plano y que experimente deformaciones como valles y picos, donde los valles serían los mínimos de la SEP y los picos representan los máximos del sistema. La SEP está directamente relacionado con los grados de libertad, estos grados de libertad son los movimientos de cada átomo relacionado con los ejes de sistema de coordenadas tridimensionales, permitiendo determinar el movimiento con la variación que experimente cada átomo en función de los ejes x, y, z. Entre los grados de libertad, seis de estos comprenden las rotaciones y translaciones del sistema como uno solo, estos comprenden a las rotaciones y translaciones del sistema determinando los movimientos y dirección de los átomos en tiempo real. Esto seis grados de libertad no modifica al sistema, por lo que no determinan la Superficie de la energía potencial. Por lo tanto, los grados de libertad que determinan a una Superficie de Energía Potencial de un sistema serán dados por la fórmula de $3N - 6$.

92

1.4.1.4.2. Optimización geométrica

La optimización geométrica es la reducción de energía de un sistema, está busca encontrar la menor energía de un sistema minimizando su estructura, utiliza los grados de libertad geométricos aplicando métodos derivativos. Generalmente al aplicar este método, el sistema es conducido a mínimos locales, estos mínimos pueden presentar un falso dato, ya que el mínimo local no es el mínimo global.

1.4.1.4.3. Integrador steepest descent

Es utilizado para encontrar una aproximación en sistemas alejados del mínimo local, este operador desciende rápidamente la energía al mínimo, utilizando una minimización en línea (line search). Esta modifica el sistema utilizando los grados de libertad geométricos y el mínimo local, direccionando al sistema global con la gradiente. Este proceso es repetido hasta alcanzar un cambio en el umbral.

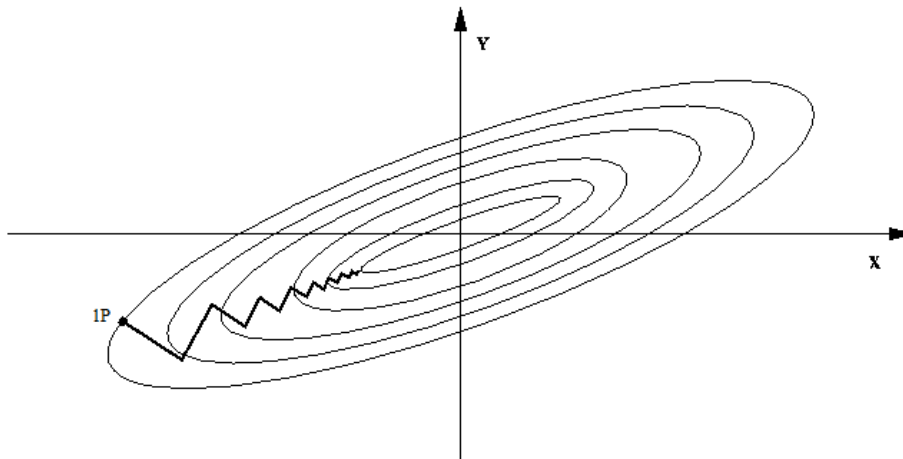


Figura 1.11. Gradiente descendiente – Steepest descent

1.4.1.4.4. Gradiente de conjugación

Utiliza el gradiente, y explora las geométricas que están cerca al mínimo global del sistema, este método tiene diferentes variantes, Fletcher-Reeves propone utilizar el primer mínimo, y encontrar una dirección que no sea perpendicular, esta dirección conjugada facilita y garantiza encontrar el mínimo de la función.

1.4.1.5. Potencial electrostático APBS

El potencial electrostático, proporciona información sobre la interacción intermolecular y las propiedades moleculares de las moléculas. Mediante un mapa de superficie, identifica las regiones donde las moléculas experimentan cambios electrónicos, mostrando aminoácidos cargados positivamente o negativamente.⁹³

Los potenciales electrostáticos de los aminoácidos son obtenidos a través de la resolución de ecuación Poisson y Boltzmann.⁹⁴ las cargas de los aminoácidos pueden verse afectadas cuando la proteína es sometida a cambios configuracionales, ya sea un aumento de temperatura “Annealing” o durante una dinámica molecular.

1.4.2. Mecánica cuántica

La mecánica cuántica se concentra a un nivel electrónico, teniendo un amplio rango de cálculo y mayor aproximación de datos, permitiendo determinar las estructuras de las

moléculas y realizar estudios a nivel electrónico, la mecánica cuántica utiliza la relación que existe entre las funciones de onda, obteniendo las coordenadas de las partículas y el tiempo, con este método se puede obtener la información del sistema global.⁹⁵

1.4.2.1. La Ecuación de Schrödinger.

La ecuación de Schrödinger explica la evolución de la función de onda de un sistema en un periodo tiempo, aplicando la energía total y las condiciones externas que rodean al sistema (2.1).

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.5)$$

- El hamiltoniano H = Contiene a núcleo y electrones del sistema.
- La función de onda Ψ = Muestra la ubicación y velocidad de las partículas.
- E = Valor energético para el sistema.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo es resuelta de manera precisa en sistemas de moléculas simples o pequeñas. Para sistemas de moléculas más complejas la ecuación se acerca a aproximaciones para su resolución.⁹⁶

1.4.2.2. Teoría funcional de la densidad (DFT)

La DFT es un método de cálculo variacional, la energía del sistema electrónico es minimizada con respecto a la densidad electrónica. Este método permite obtener el cálculo de estructuras moleculares, energía de las reacciones químicas, frecuencias de vibracionales y distribución electrónica de un sistema, utilizando solo la densidad electrónica, facilitando el cálculo de sistemas más grandes y complejos.⁹⁷

La DFT considera a la energía como una funcional de la densidad expresándola:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (2.6)$$

- E^v = Energía potencial, engloba las interacciones núcleo-electrón y núcleo-núcleo.
- E^J = Energía de Atracción electrón-electrón.
- E^{xc} = Correlación de intercambio electrónico.

E^v , E^J , y E^T son la energía clásica de la distribución electrónica, E^{xc} es la energía de intercambio mecánico-cuántico, que relaciona el espín electrónico y la energía de correlación dinámica.

1.4.2.3. Funcional CAM-B3LYP

El CAM-B3LYP es una funcional de correlación de intercambio híbrido, es la combinación de la funcional de intercambio (Becke B3 en 1993) con la funcional de correlación (Lee, Yang y Parr LYP). Esta funcional utiliza como base de cálculo el CAM (Método de Corrección de Largo Alcance, presentada por Tawada et-al.).

La energía de intercambio mecánico-cuántico está representada en la expresión (2.6).⁹⁸

$$E_{XC} = E_{XC}^{LSDA} + a_0(E_X^{exact} - E_X^{LSDA}) + a_x \Delta E_X^{B88} + a_c \Delta E_C^{PW91} \quad (2.7)$$

Donde:

- E_{XC} = Energía de intercambio
- ΔE_X (B88) = Corrección de gradiente para el intercambio de Becke de 1988.
- ΔE_C (PW91) = Corrección de gradiente para la correlación de Perdew y Wang de 1991.

1.4.3. Validación de estructuras

La mecánica cuántica se concentra a un nivel electrónico, teniendo un amplio rango de cálculo y mayor aproximación de datos, permitiendo determinar las estructuras de las moléculas y realizar estudios a nivel electrónico, la mecánica cuántica utiliza la relación que existe entre las funciones de onda, obteniendo las coordenadas de las partículas y el tiempo, con este método se puede obtener la información del sistema global.⁹⁹

1.4.3.1. Calculo de la convergencia del sistema (RMSD)

Esta herramienta de análisis nos permite determinar la estabilidad estructural de las simulaciones de la dinámica molecular utilizando la desviación cuadrática media (RMSD) como un indicador de convergencia de la estructura hacia un estado de equilibrio. Este análisis permite identificar la estabilidad relativa (estructura secundaria, puentes de hidrógeno y desviaciones cuadráticas medias de las posiciones atómicas a partir de la estructura RMN) y la flexibilidad estructural (desviaciones cuadráticas medias de las fluctuaciones posicionales y transiciones de ángulos diedros).

1.4.3.2. Calculo de la fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF)

Las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) es una medida de los movimientos térmicos de un residuo y/o aminoácido. Identifica la fluctuación de su posición media para cada átomo. Este análisis da una visión general sobre las regiones flexibles en la proteína y corresponde a los factores cristalográficos (factores de temperatura).

Las desviaciones cuadráticas medias de las fluctuaciones entre posiciones atómicas (RMSF) por residuo para la cadena principal (promediando sobre los átomos de estudio). Se puede comprobar que las regiones en las que el RMSF es más alto se corresponde con aquellas en las que se pierde la estructura secundaria y viceversa. También se puede ver como las RMSF para los residuos correspondientes al péptido son claramente más altos que los correspondientes al dominio. Esto se debe a las enormes transiciones conformacionales que se producen en el péptido a lo largo de la simulación y a la gran amplitud de las fluctuaciones

1.4.2.1. Análisis ramachandran

El diagrama de Ramachandran muestra las regiones energéticamente permitidas para la posición de los ángulos diedros ψ contra ϕ de residuos de aminoácidos de la proteína, esta comparación nos permite mostrar una conformación teórica de la posición de la proteína midiendo en porcentaje la posición de cada aminoácido dentro de regiones teóricamente favorecidas (Figura 1.12).¹⁰⁰

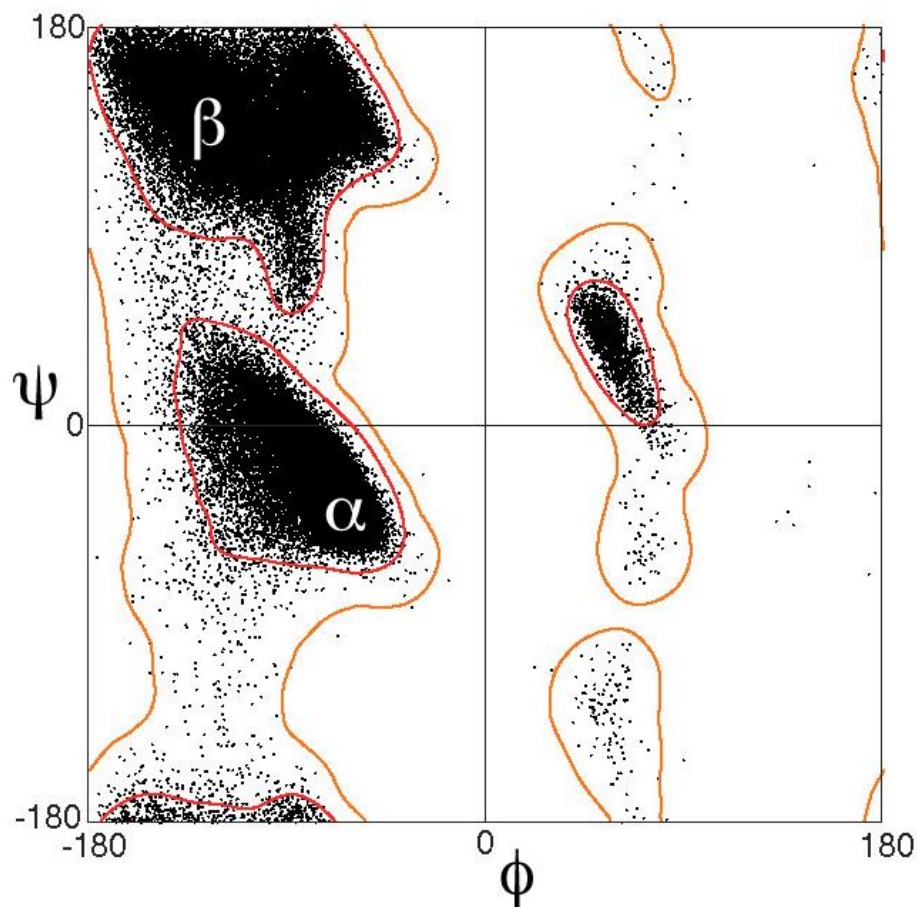


Figura 1.12. Diagrama Ramachandran de los ángulos de torsión de la cadena principal de la proteína, con las regiones alfa-hélice y beta-cadena, siendo las regiones marcadas en rojo las favorecidas y las regiones remarcadas en naranja las permitidas.¹⁰⁰

CAPÍTULO II

Metodología y Detalles Computacionales

2.1. Equipos y Software

Para realizar los cálculos y simulaciones computacionales, emplearemos las siguientes herramientas:

2.1.1. Hardware

Workstation, con procesador i7 de 3.2GHz, memoria RAM de 64Gb, 2 discos duros de 04 y 06 TB, Acelerador de Video GTX 980 con 4GB de memoria, y un almacenamiento en discos duros de 11 TB.

2.2.2 Software computacional

Base de datos de Cybase

Cybase es una base de datos, especializada en la recopilación y almacenamiento de secuencias lineales de péptidos macrocíclicos provenientes en su mayoría de plantas y otros organismos, este servidor tiene como objetivo la caracterización de las secuencias cíclicas para su aplicación en la industria. Su interés se centra en los ciclótidos provenientes de plantas, ya que estas expresan una variedad de actividades biológicas. Cybase contiene alrededor de 960 secuencias aisladas, estas se encuentran en formato FASTA y presentan una breve descripción de su descubrimiento, algunas de las secuencias presentan su cristal PDB así como imagen de su estructura terciaria.

Su dominio es <http://www.cybase.org.au/>.

Base de datos del NCBI

NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) es una base de datos online, el nombre completo de la abreviación NCBI es Centro Nacional para la información Biotecnológica, conforma la mayor base de datos de información pública de interés científico, dentro de su base de datos se encuentran investigaciones en biología, genómica, Microbiología, Filogenia, e información biomédica. Esta página ofrece una gran variedad de herramientas bioinformáticas, siendo la más conocida la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Además, ofrece el acceso a las publicaciones de Bioinformática y Medicina, y facilitando el acceso de las proteínas registradas en el PDB utilizado del Protein Data Bank. Esta base de datos está disponible en el dominio es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Base de datos del PDB

PDB (Banco de datos de proteínas), es una base de datos especializada en el almacenamiento de estructuras tridimensionales de proteínas, estas contienen información de su estructura terciaria, autor, publicación, método experimental y en algunas ocasiones presentan una pequeña descripción de la función. Estas proteínas almacenadas, fueron determinadas de forma experimental por RMN y cristalografía de rayos X. Su dominio es <https://www.rcbs.org/>.

Gromacs 2016

Gromacs (GRONingen MACHine for Chemical Simulations), es un software especializado en la simulación y estudio de proteínas, permitiendo realizar la dinámica molecular de sistemas proteicos y evaluando su evolución en un periodo de tiempo, este programa utiliza las ecuaciones de Newton para estimar un sistema (conformado por millones de partículas), en un periodo de tiempo. Estas simulaciones permiten calcular en el tiempo, el número de interacciones formadas entre átomos, prediciendo la conformación de estructuras terciarias. Para la obtención de coordenadas y velocidades, Gromacs utiliza los campos de fuerza, siendo el más usado el OPLSAA (Optimized Potentials for Liquid Simulations All Atoms) y permitiendo obtener la trayectoria de la proteína para realizar

los análisis y validación de la estructura final. Este programa es de licencia libre y puede ser obtenida desde su dominio <http://www.gromacs.org/>.

DeMon2k 4.3.7

Demon (Density of Montréal) es un paquete de software para la teoría funcional de la densidad (DFT). Este software nos permite realizar una optimización a nivel cuántico de cualquier molécula de estudio, identificando el mínimo global calculado en ciclos, así como también la obtención de los estados de transición y validación de los enlaces intermolecular e intramolecular.

GaussView 6.0

Es la interfaz gráfica del software *Gaussian 09*, sirve para construir analizar y editar moléculas, permite a su vez visualizar y analizar archivos que contengan información de proteínas.

Molden

Molden es un software que permite crear, modificar y visualizar moléculas. Este utiliza un lenguaje basado en Z-matrix Editor, esta herramienta permite editar en tiempo real las moléculas (agregar o quitar residuos), reescribiendo los cambios en su archivo original. Molden opera en plataforma Linux, ya que utiliza la topología de las moléculas con un lector-terminal de Linux. Este programa está disponible desde su dominio <http://www.cmbi.ru.nl/molden/>.

Chimera UCSF

UCSF Chimera es un software en grado menor a molden, este presenta una interface sencilla y completa para modelar, analizar, alinear, encontrar regiones hidrofóbicas y trayectorias de las proteínas. Chimera proporciona una herramienta para poder exportar las estructuras terciarias de las proteínas en formato PNG – JPG. Este programa puede ser descargado desde su dominio <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

VMD – Visual Molecular Dynamics

Es un visualizador de moléculas, este permite realizar análisis y evaluación de estructuras, dentro de sus opciones están la realización de dinámicas moleculares y análisis de residuos ramachandran, además permite realizar múltiples cambios a estructuras con la utilización de sus comandos especializados. Con este visualizador se puede obtener el rmsd y la trayectoria de una simulación de mecánica molecular, para realizar su posterior análisis mediante sus herramientas de cálculo.

PDB2PQR

Herramienta que se encuentra dentro del software Chimera USCF, esta permite identificar las cargas de los aminoácidos construyendo las cargas de las moléculas utilizando el campo de fuerza Amber y calculando las cargas directamente del servidor online. Servidor online: http://nbc2-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.1.1/.

APBS

Herramienta que permite identificar las variaciones electrostáticas de las proteínas en mapas de superficie coloreados, donde las regiones neutras de la proteína se colorean en color verde, las regiones rojas equivalen a cargas negativas y regiones azules son cargas positivas, identificando los centros activos y comportamiento de las proteínas. Servidor online: http://nbc2-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/.

MolProbity Ramachandran

Este software es proporcionado de manera online por la Duke University school of Medicine, donde nos permite analizar la distribución en el espacio de los aminoácidos contenidos en los archivos PDB o utilizar directamente su código de acceso para descargar su estructura terciaria del Protein Data Bank, este software permite graficar el diagrama de ramachandran y exportar los resultados en formato PDF, además que ofrece otras herramientas especializadas en la interpretación del comportamiento de la proteína. Su dominio online es: <http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>.

2.2. Metodología

2.2.1. Recopilación de información sobre las estructuras de los ciclótidos

En la recopilación de las estructuras de los ciclótidos se utilizó las bases de datos NCBI, PDB y Cybase, las cuales albergan una librería de datos biológicos, genómicos, microbiológicos, filogenéticos e información médica, además estas bases de datos tienen un especial énfasis en información sobre secuencias aminoacídicas de origen animal y vegetal, obtenidos principalmente por métodos experimentales. Para este estudio se buscaron proteínas cíclicas pertenecientes a la familia *Rubiaceae*, identificando a la especie de planta y el ciclótido. Se obtuvieron 78 secuencias aminoacídicas de Cybase distribuidas en 17 especies de plantas pertinentes a la familia *Rubiaceae*, estas secuencias fueron descargas en formato FASTA, seguidamente se realizó el modelamiento proteico utilizando los formatos fasta, el método de modelamiento fue por homología comparando modelos de proteínas reportadas en el PDB, los cuales contaban con su estructura terciaria, una resolución menor a tres y estudios de cristalografía de rayos X.

Las estructuras lineales fueron modeladas utilizando el servidor online Robetta, esta herramienta permite cargar a su servidor una secuencia lineal en formato Fasta, se realizó un alineamiento simple, características e identificación de la estructura secundaria de todas las secuencias. Finalizado el alineamiento con un porcentaje del 83.33%, Robetta predice el dominio de la secuencia fasta y arroja una “referencia padre” junto al código PDB de la proteína relacionada, y un porcentaje de confianza del 95%. La predicción de la estructura del dominio identificado por Robetta se por modelado comparativo, este método de modelamiento se basa en la homología que presentan estas proteínas, siendo realizado en un periodo de 3 horas, obteniendo un total de 5 estructuras. Se seleccionó la primera de las 5 estructuras modeladas y se configuro el archivo final .pdb.

La identificación de los cristales PDB que fueron utilizados en el proceso de modelamiento fueron obtenidos directamente de la base de datos del Protein Data Bank, si Robetta no encuentra los cristales PDB correspondientes a la especie y tipo de proteína, este realiza un alineamiento para identificar el dominio y realizar el modelamiento con los cristales disponibles.

2.2.2. Dinámica molecular en un ensamble Canónico (NVT)

Para la obtención de los estados fundamentales se usó el método clásico, permitiendo el estudio de las interacciones de proteínas y otras moléculas biológicas. Los modelos terciarios de los ciclótidos obtenidos con Robetta fueron comparados con los modelos cristalográficos PDB a través del visualizador Chimera, se utilizó la herramienta de “construcción de estructura”, para la identificación de las distancias entre enlaces disulfuro y definir la unión entre átomos de azufre, además para la formación del enlace peptídico terminal se utilizó la herramienta “selección” para identificar las colas terminales C-N y nuevamente con la herramienta “construcción de estructura” se procedió a unir el C-N terminal, asegurando la presencia del enlace peptídico final entre C-N y el Nudo Cíclico de Cisteínas. Con el fin de obtener una estructura relajada y acomodar las distancias entre enlaces, se realizó una minimización de energías con la herramienta “minimización” de Chimera durante 1000 steps utilizando el campo de fuerza AMBER. Para la matización de fuerzas se utilizó el software Gromacs 2016, con las estructuras minimizadas en AMBER. Adicionalmente se realizó un test de resistencia del enlace peptídico, una vez obtenidas las estructuras cíclicas, se procedido a determinar la estabilidad del enlace peptídico terminal, con la creación de una estructura cíclica conformada por 10 residuos de Alanina, estos fueron ciclados y sometidos a una dinámica molecular de 20 ns para comprobar la resistencia estructural.

Se realizó una nueva minimización con el campo de fuerza OPLSAA, campo de fuerza especializado en la identificación de cargas para aminoácidos, para ello se colocó a la estructura dentro de un espacio comprendido por 5x5x5 unidades, para realizar el proceso de minimización es necesario contener la proteína en un ambiente próximo a las condiciones celulares, para generar este ambiente de interacción o condiciones periódicas de contorno, se realizó la introducción de la proteína a un ambiente cubico utilizando el comando “gmx editconf” de Gromacs, definiendo el tipo de caja/espacio con “-box” y “-c” para centrar la proteína, este comando de Gromacs utiliza el archivos .pdb, luego crea un nuevo archivo con denominación “.gro”(Figura 2.1). Una vez creada la caja con el comando “gmx solvate” se agregó 3936 moléculas de agua utilizando el modelo SPC216, obteniendo un volumen de 125 nm³ y una densidad de 982.577 kg/m³ (Figura 2.2).

Configurada la molécula en un sistema explícito, se realizó la parametrización de los valores para obtener una estructura minimizada con el campo de fuerza Oplsaa, con el comando “gmx pdb2gmx” de Gromacs se creó la topología de la proteína, utilizando el campo de fuerza Oplsaa, además este comando permite identificar los enlaces disulfuro y péptido terminal con los comandos “-inter” y “-ter” respectivamente, creando un nuevo archivo.gro el cual contiene a la proteína y las moléculas de agua.

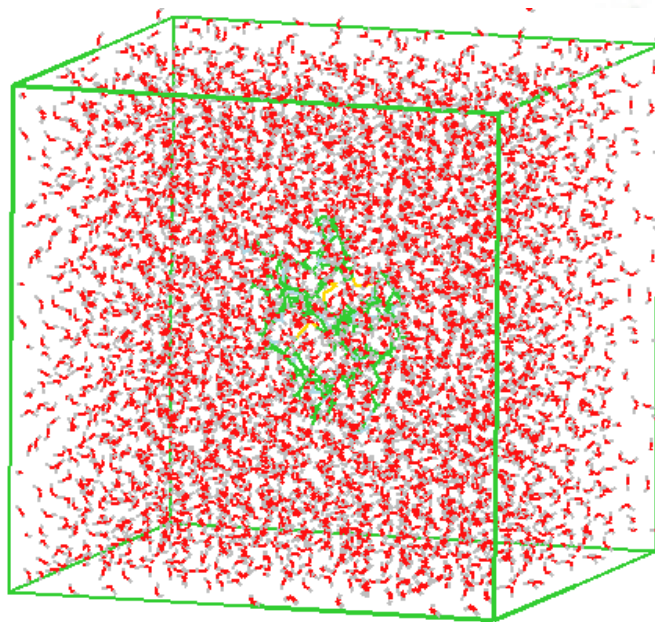


Figura 2.1. Caja cubica de la proteína Kalata B1 y moléculas de agua

La creación de la topología está contenida en el archivo.top, este identifica los campos de fuerza Oplsaa que se utiliza para determinar la carga de cada aminoácido y átomo de la proteína. Identificada las cargas en la topología, con el comando “gmx grompp” se creó un archivo binario que contiene los parámetros para realizar la minimización (Figura 2.3), este comando utiliza, el archivo que contiene a la proteína y las moléculas de agua “.gro” y el archivo de la topología de la proteína “.top”, Grompp crea un nuevo archivo “.tpr” el cual contiene todos los valores anteriores para realizar la minimización y llevar a la proteína a un mínimo global de energía, utilizando el comando “gmx mdrun” de Gromacs, se minimizo el sistema en una trayectoria de 50 ns.

Una vez obtenido el sistema minimizado se procedió a realizar la simulación de dinámica molecular empleando un colectivo canónico NVT (Número de moléculas, Volumen y Temperatura constante), para ello se utilizó el archivo final “.gro” de la minimización, nuevamente con el comando “gmx pdb2gmx” se creó una nueva topología para el archivo final .gro, y se volvió a seleccionar el modelo de agua spc216 junto a la identificación de los enlaces disulfuro y peptídico terminal con los comandos “-inter” y “-ter” respectivamente, este paso generó una nueva topología de la proteína minimizada y un nuevo archivo “.gro”.



```
adelnt@AdeLnt:~/Escritorio/distancias disulfuro mm/kb1
Command line:
gmx editconf -f kb1-399.pdb -o kb1-399.pdb -box 5 5 5 -c

WARNING: all CONECT records are ignored
Read 376 atoms
Volume: 125 nm^3, corresponds to roughly 56200 electrons
No velocities found
  system size : 2.678  1.796  2.172 (nm)
  center      : -0.606  2.698  1.615 (nm)
  box vectors : 5.000  5.000  5.000 (nm)
  box angles  : 90.00  90.00  90.00 (degrees)
  box volume  : 125.00 (nm^3)
  shift       : 3.106 -0.198  0.885 (nm)
  new center  : 2.500  2.500  2.500 (nm)
  new box vectors : 5.000  5.000  5.000 (nm)
  new box angles : 90.00  90.00  90.00 (degrees)
  new box volume : 125.00 (nm^3)

Back Off! I just backed up kb1-399.pdb to ./#kb1-399.pdb.1#
gcq#308: "Don't You Wish You Never Met Her, Dirty Blue Gene?" (Captain Beefheart)
```

Figura 2.2. Valores de las condiciones periódicas de contorno PBC y tamaño de la caja

El siguiente paso es la creación del archivo binario, el cual contiene los parámetros para realizar la dinámica molecular, se utilizó el comando “gmx grompp” para crear el binario “.tpr” utilizando los parámetros contenidos en la Figura 2.4, además en el archivo .tpr se programó al sistema en una trayectoria de 200 ns equivalente a 8 horas de cálculo, llevado a una temperatura constante de 309.65 K controlada por un termostato de Nose-Hoover, además que también se ajustó el área de cálculo pbc en las coordenadas xyz para optimizar todo el contenido de la caja. Creado el archivo .tpr, se procedió a realizar la dinámica molecular utilizando el comando “gmx mdrun –deffnm –cpo cpo.cpt –c final-gro.pdb –

ntmpi 0 -gpu_id 1”, donde “-deffnm” selecciona la información contenida en el archivo .tpr, “-cpo” crea un punto de guardado automático para evitar la pérdida de datos, “-c” genera un nuevo archivo “.pdb” el cual es la estructura optimizada, “ntmpi” define los núcleos mpi disponibles del ordenador para realizar el cálculo y “-gpu_id” es la paralización de los núcleos mpi y las tarjetas de video disponibles en la computadora para realizar la dinámica molecular.

```

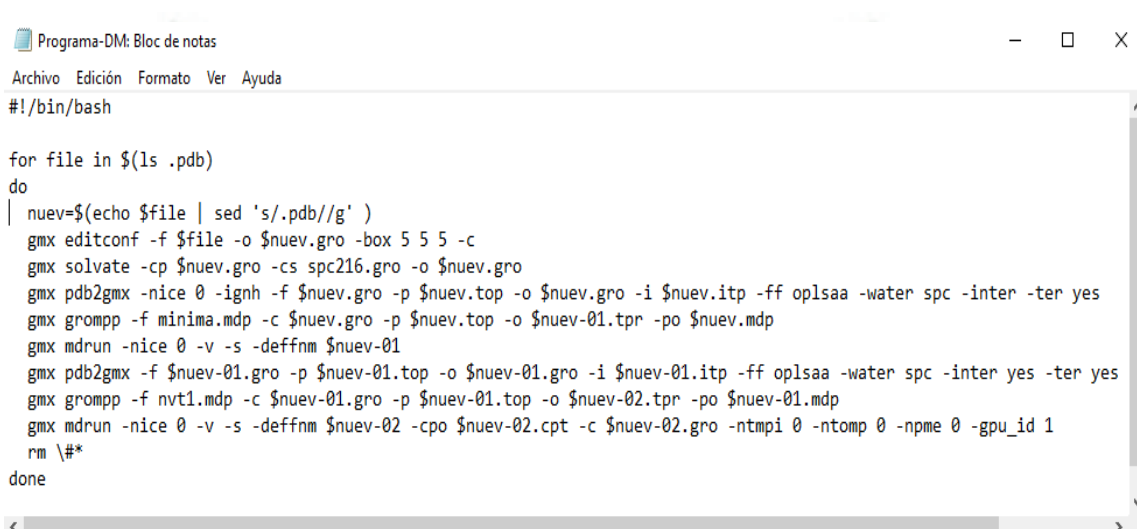
title                = Minimizacion
cpp                  = /lib/cpp
include              = -I../top
define               =
integrator           = steep
nsteps               = 50000000
nstcomm              = 100
emtol                = 1
emstep               = 0.001
nstcgsteep           = 1000
nstxout              = 10
nstvout              = 10
nstfout              = 0
nstlog               = 1000
nstcalcenergy        = 100
nstenergy            = 1000
nstxtcout            = 1
nbgscorr             = 10
xtc-precision        = 1000
xtc-grps             =
energygrps           =
cutoff-scheme        = Verlet
nstlist              = 20
ns-type              = grid
pbc                  = xyz
optimize-fft         = yes
pme-order            = 4
fourierspacing       = 0.3
DispCorr             = Ener
constraints          = none
coulombtype          = PME
rlist                 = 0.9
rcoulomb             = 0.9
vdwtype              = Cut-off
rvdw                 = 0.9
ewald-rtol           = 1e-5
    
```

Figura 2.3. Valores iniciales empleados en el cálculo de minimización de energías, sometiendo al sistema a un periodo de tiempo de 50 ns (nsteps).

```
title           = Dinamica Molecular NVT
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
integrator      = md
dt             = 0.001
nsteps         = 50000000
nstxout        = 1000
nstvout        = 1000
nstlog         = 1000
nstcalcenergy  = 100
nstenergy      = 1000
nstxout-compressed= 1000
xtc-grps       =
energygrps     =
nstlist        = 20
ns-type        = grid
fourierspacing = 0.30
pme-order      = 4
ewald-rtol     = 1e-5
pbc            = xyz
tcoupl         = v-rescale
tc-grps        = system
tau-t          = 0.5
ref-t          = 309.65
gen-vel        = yes
gen-seed       = 173529
constraints    = none
cutoff-scheme  = verlet
coulombtype    = PME
rlist          = 0.9
rcoulomb       = 0.9
vdwtype        = Cut-off
rvdw           = 0.9
```

Figura 2.4. Valores empleados en el cálculo de la dinámica molecular utilizando un colectivo canónico nvt, empleando el radio de giro de análisis en 0.9 angstrom y una temperatura inicial de 309.65 K

Todo el proceso de la dinámica molecular, fue optimizado empleando un programa en código fuente Bash, el cual solo requiere la proteína en formato .pdb y realiza todas las tareas de manera automática, esto con el fin de acelerar el proceso de cálculo, además que permite identificar de una manera más rápida los errores que Gromacs pueda experimentar al momento de realizar la dinámica molecular, en la Figura 2.5 se observa el código fuente del programa empleado en la optimización de la dinámica molecular.



```
Programa-DM: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
#!/bin/bash

for file in $(ls *.pdb)
do
| nuev=$(echo $file | sed 's/\.pdb//g' )
  gmx editconf -f $file -o $nuev.gro -box 5 5 5 -c
  gmx solvate -cp $nuev.gro -cs spc216.gro -o $nuev.gro
  gmx pdb2gmx -nice 0 -ignh -f $nuev.gro -p $nuev.top -o $nuev.gro -i $nuev.itp -ff oplaa -water spc -inter -ter yes
  gmx grompp -f minima.mdp -c $nuev.gro -p $nuev.top -o $nuev-01.tpr -po $nuev.mdp
  gmx mdrun -nice 0 -v -s -deffnm $nuev-01
  gmx pdb2gmx -f $nuev-01.gro -p $nuev-01.top -o $nuev-01.gro -i $nuev-01.itp -ff oplaa -water spc -inter yes -ter yes
  gmx grompp -f nvt1.mdp -c $nuev-01.gro -p $nuev-01.top -o $nuev-02.tpr -po $nuev-01.mdp
  gmx mdrun -nice 0 -v -s -deffnm $nuev-02 -cpo $nuev-02.cpt -c $nuev-02.gro -ntmpi 0 -ntomp 0 -npme 0 -gpu_id 1
  rm \#*
done
```

Figura 2.5. Programa-DM empleado en la optimización del cálculo de la dinámica molecular escrito en código fuente bash.

a) Cálculo de la desviación media cuadrática (RMSD)

El análisis fue calculado por herramienta “Gmx rmsd” del software Gromacs, gmx rmsd utiliza los datos de la trayectoria (conformado por las posiciones y velocidades que presenta el sistema en un periodo de tiempo de cálculo), para la obtención de los datos se realizó el análisis del sistema total (Figura 2.6), para poder determinar la estabilidad estructural se utilizó la desviación cuadrática media (RMSD) como un indicador de convergencia de la estructura hacia un estado de equilibrio. La flexibilidad estructural permitida (desviaciones cuadráticas medias de las fluctuaciones posicionales y transiciones de ángulos diedros) se encuentra en el margen de 1.5 Angstrom desde la

media de las fluctuaciones comprendidas por el sistema, asegurando la estabilidad y optimización geométrica de la proteína cíclica.

```

gmx rms -s C1-02.tpr -f C1-02.xtc -o rmsd.xvg

Reading file C1-02.tpr, VERSION 2016 (single precision)
Reading file C1-02.tpr, VERSION 2016 (single precision)
Select group for least squares fit
Group 0 (      System) has 12121 elements
Group 1 (      Protein) has   445 elements
Group 2 (      Protein-H) has   224 elements
Group 3 (      C-alpha) has    31 elements
Group 4 (      Backbone) has   93 elements
Group 5 (      MainChain) has  124 elements
Group 6 (      MainChain+Cb) has 152 elements
Group 7 (      MainChain+H) has 153 elements
Group 8 (      SideChain) has  292 elements
Group 9 (      SideChain-H) has 100 elements
Group 10 (     Prot-Masses) has  445 elements
Group 11 (     non-Protein) has 11676 elements
Group 12 (     Water) has 11676 elements
Group 13 (     SOL) has 11676 elements
Group 14 (     non-Water) has   445 elements
Select a group: 0
Selected 0: 'System'
Select group for RMSD calculation
Group 0 (      System) has 12121 elements
Group 1 (      Protein) has   445 elements
Group 2 (      Protein-H) has   224 elements
Group 3 (      C-alpha) has    31 elements
Group 4 (      Backbone) has   93 elements
Group 5 (      MainChain) has  124 elements
Group 6 (      MainChain+Cb) has 152 elements
Group 7 (      MainChain+H) has 153 elements
Group 8 (      SideChain) has  292 elements
Group 9 (      SideChain-H) has 100 elements
Group 10 (     Prot-Masses) has  445 elements
Group 11 (     non-Protein) has 11676 elements
Group 12 (     Water) has 11676 elements
Group 13 (     SOL) has 11676 elements
Group 14 (     non-Water) has   445 elements
Select a group: 0
    
```

Figura 2.6. Selección del grupo de cálculo, en ambas opciones se escogió la el grupo “0” conformado por el sistema global, permitiendo calcular la convergencia de todos los elementos que conforman el sistema en estudio.

b) Cálculo de la fluctuación de la desviación media cuadrática (RMSF)

Las Fluctuaciones Cuadradas Medias (RMSF) fueron calculadas solo para el ciclótido, ya que este análisis permite identificar las variaciones y fluctuaciones que pueden sufrir los aminoácidos presentes en la proteína, se identificó los aminoácidos que presentan una variación termodinámica que se ve reflejada en la fluctuación de sus átomos y que son expresadas en la gráfica de este análisis, para la obtención de este análisis se empleó la herramienta “Gmx rmsf” del software Gromacs.

c) Diagramas ramachandran

El análisis ramachandran fue realizado en el servidor online de MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>), este análisis permitió identificar los aminoácidos que se encuentran fuera de las regiones favorecidas o permitidas, este software online utiliza las posiciones xyz de los aminoácidos contenidos en el archivo .pdb y los posiciona en regiones pre establecidas por los ángulos de torsión de los aminoácidos contenidos en su base de datos, obteniendo un diagrama de todos los aminoácidos contenidos en la proteína y detectando si los aminoácidos se encuentran fuera de posición, estos pueden ser considerados los más fluctuantes finalizada la dinámica molecular, adicionalmente el diagrama ramachandran utiliza un sistema de porcentaje determinando valores altos de 80% a una elevada probabilidad de la existencia de la proteína.

The screenshot shows the MolProbity website interface. At the top, there is a navigation bar with the 'Main page' title and the 'Duke Biochemistry' logo. Below this, there is a 'FILE UPLOAD/RETRIEVAL (MORE OPTIONS)' section with two input fields for 'PDB/NDB code' and 'type: PDB coords', each with a 'Fetch >' button. A second set of fields is labeled 'Seleccionar archivo' and 'Ningún archivo seleccionado'. Below the upload section, there is a 'MolProbity sites' section listing 'Duke (US) | Manchester (UK) | Beta (Recent developments, Unstable)' and a note that 'Legacy version 4.02 has been retired'. There is also a 'Usage Guidelines' section stating 'These web services are provided for analysis of individual structures, not batch runs.' The main content area is divided into two columns: 'Walkthroughs, tutorials, and usage FAQs' and 'Citations, science, and technical FAQs'. The 'Walkthroughs' section includes links for 'Evaluate X-ray structure', 'Evaluate NMR structure', 'Fix up structure', 'Work with kinematics', 'Guide to Reduce options', and 'Guide to validation options'. The 'Citations' section lists several scientific papers related to MolProbity, such as 'Cite MolProbity' by Chen et al. (2010) and 'Cite KINING' by Chen et al. (2009).

Figura 2.7. Servidor Molprobity de la Universidad Duke University School of Medicine especializada en creación de diagramas ramachandran

2.2.3. Minimización a nivel de mecánica cuántica

Se optimizaron las estructuras completas de los ciclótidos, debido a que estructuralmente son pequeños y no compromete una elevada carga computacional de cálculo, se utilizó el software deMon2k junto a la funcional CAM-B3LYP (Figura 2.8), sometiendo a la estructura a ciclos continuos de cálculo. Finalizada la optimización de las estructuras de los ciclótidos, se procedió a obtener los cubos cuánticos de la mecánica cuántica, esto con el fin de obtener la densidad electrónica de la estructura.

```
%chk=02.chk
%Mem=64GB
%NProc=16
# CAM-B3LYP/TZVP Pop=(Hirshfeld) gfinput iop(6/7=3,6/20=3,3/33=1)

kalata-b-1

0 1
N      28.821969   20.276235   30.406117
H      29.274164   20.177496   29.484851
C      28.380755   19.017723   31.018114
H      29.272304   18.394965   31.249038
H      27.822358   19.200894   31.947644
C      27.553676   18.182492   30.031700
O      28.098646   17.659311   29.038626
N      26.236921   18.035894   30.342292
H      25.820465   18.590894   31.103221
C      25.346732   17.174149   29.569238
H      26.004650   16.526244   28.961062
C      24.466994   16.338633   30.529275
H      23.910633   17.044774   31.184817
H      23.702515   15.792246   29.934584
C      25.239938   15.335624   31.406778
H      26.047249   15.893292   31.935221
C      24.301161   14.753476   32.475063
H      24.847478   14.052244   33.141347
H      23.866060   15.558884   33.102827
H      23.463795   14.195196   32.004091
C      25.894333   14.216118   30.585130
H      26.444340   13.519937   31.252499
H      25.123975   13.626397   30.040213
H      26.622768   14.607526   29.844449
C      24.431937   17.994458   28.643793
O      24.086510   19.172209   28.941475
N      23.958839   17.372631   27.541332
C      22.993032   18.048191   26.644836
H      23.322400   19.092757   26.469908
C      23.055535   17.215546   25.352512
H      22.089272   17.241319   24.815549
H      23.840383   17.633740   24.688205
```

Figura 2.8. Parámetros para la optimización cuántica de las estructuras.

2.2.4. Evaluación de la estabilidad térmica de los ciclótidos

Para la estabilidad térmica se realizó una simulación de annealing, parecida a la dinámica molecular, esta utiliza el archivo “.pdb” final donde está contenida la proteína optimizada, luego se crea un archivo binario “.tpr” el cual contiene los parámetros para la simulación annealing, el archivo que contiene todos los parámetros es el nvt.mdp, dentro de este se configuro el rango de la temperatura de 309,65 K a 399,65 K, distribuidos en 9 saltos térmicos de 10 K, estos saltos de temperatura se dan cada 50 ns y fueron distribuidos en 20 puntos siendo con el fin de obtener un archivo final “.pdb” en cada salto, obteniendo un total de 509 ns en un periodo de cálculo de 12 horas, para iniciar la simulación annealing se empleó el comando “gmx dmrun” de Gromacs utilizando el archivo nvt.mdp conteniendo los parámetros de la Figura 2.9.

Mediante la simulación Annealing los ciclótidos de *Rubiaceae* fueron sometidos a aumentos sucesivos de temperatura permitiendo evaluar la estabilidad estructural, determinando la energía potencial, la energía cinética y energía total del sistema (kJ/mol).

2.2.5. Determinación de la estabilidad de los puentes disulfuro de los ciclótidos

Para la evaluación de los puentes disulfuro se utilizó el visualizador VMD para comparar las posiciones iniciales respecto a las posiciones finales de los ciclótidos sometidos a la dinámica molecular, comparando las posiciones iniciales de los aminoácidos respecto a la trayectoria empleada en el sistema, estimando la variación y distorsión del enlace disulfuro así como también evaluando la estabilidad estructural de la proteína, adicionalmente se comparó la superficie del potencial electrostático de las estructuras iniciales respecto a las estructuras optimizadas.

2.2.6. Potencial electrostático

Finalizado el análisis de la simulación Annealing se procedió a calcular la superficie del potencial electrostático APBS, la determinación de la superficie de carga contenida en el archivo .pqr fue proporcionada por el software Chimera utilizando una extensión del servidor online PDB2PQR, esta extensión se especializa en identificación de cargas de cada aminoácido comprendido dentro de un sistema, permitiendo parametrizar todas las

cargas del sistema con el campo de fuerza AMBER, este determina las variaciones electrostáticas de la estructura. Identificadas las cargas se procedió a calcular la superficie del potencial electrostático para poder determinar los cambios electrostáticos que presenta la proteína.

```

title          = Dinamica Molecular NVI
cpp            = /lib/cpp
include        = -I../top
integrator     = md
dt             = 0.001
nsteps        = 509000000
nstxout       = 1000
nstvout       = 1000
nstlog        = 1000
nstcalcenergy = 100
nstenergy     = 1000
nstxout-compressed= 1000
xtc-grps      =
energygrps    =
nstlist       = 20
ns-type       = grid
fourierspacing = 0.30
pme-order     = 4
ewald-rtol    = 1e-5
pbc           = xyz
tcoupl        = v-rescale
tc-grps       = system
tau-t         = 0.5
ref-t         = 319.65
gen-vel       = yes
gen-seed      = 173529
constraints   = none
cutoff-scheme = verlet
coulombtype   = PME
rlist         = 0.9
rcoulomb      = 0.9
vdwtype       = Cut-off
rvdw          = 0.9
; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing     = single
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing_npoints = 20
; List of times at the annealing points for each group
annealing_time = 0 50000 51000 101000 102000 152000 153000 203000 204000 254000
255000 305000 306000 356000 357000 407000 408000 458000 459000 509000
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing_temp = 309 309 319 319 329 329 339 339 349 349 359 359 369
369 379 379 389 389 399 399

```

Figura 2.9. Parámetros utilizados en el cálculo de la estabilidad térmica de los ciclótidos utilizando la simulación Annealing, este fue llevado a una trayectoria de cálculo de 509 ns, adicionalmente se agregó el parámetro de SIMULATED ANNEALING, donde se estableció los saltos sucesivos de temperatura.

Esta superficie fue calculada con la extensión online APBS dentro del software Chimera, obteniendo un índice de los aminoácidos contenidos en un archivo “.dx”, este índice permite visualizar la superficie de carga, permitiendo identificar las regiones negativas en color azul, las regiones positivas en color rojo y las regiones neutras en color verde. Se comparó las superficies del potencial electrostático de las estructuras cíclicas iniciales (antes de la minimización de energía) y las estructuras finales (después de la simulación Annealing), identificando las posibles variaciones de las regiones electrostáticas que presentan las estructuras de los ciclótidos.

2.2.7 Validación de las distancias de los enlaces disulfuro

Las estructuras obtenidas fueron comparadas mediante la utilización del visualizador GaussView, con la herramienta modificar enlaces se determinó la distancia del enlace disulfuro de las estructuras obtenidas en MM, la distancia de las estructuras obtenidas en QM y la distancia de las estructuras cristalográficas reportadas en PDB, para realizar la comparación teórica-práctica.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

3.1 Recopilación de información de las estructuras de los ciclótidos

Las secuencias lineales de los ciclótidos provenientes de la familia *Rubiaceae*, fueron recopiladas de la base de datos www.cybase.org identificando su nombre, especie de planta y número de aminoácidos, obteniendo un total de 78 secuencias FASTA contenidas en 17 especies de plantas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Lista de ciclótidos presentes en la familia *Rubiaceae*, reportando el nombre del ciclótido, la especie de planta, número de aminoácidos, masa molar de la estructura molecular y secuencia.

#	CICLÓTIDOS	ESPECIE	Nº AA	MASA MOLAR (g/mol)	SECUENCIA
1	kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2890.14	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
2	kalata B2	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2953.14	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
3	kalata B3	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3080.17	GLPTCGETCFGGTCNTPGCTCDPWPICTRD
4	kalata B4	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2891.13	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRD
5	kalata B5	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3059.27	GTPCGESCVYIPICISGVIGCSCTDKVCYLN
6	kalata B6	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3027.15	GLPTCGETCFGGTCNTPGCSCSSWPICTRN
7	kalata B7	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	3069.27	GLPVCGETCTLGTCYTQGCTCSWPICKRN

8	kalata B8	<i>Oldenlandia affinis</i>	31	3281.37	GSVLCNGETCLLGTCTYTTGCTCNKYRVCTKD
9	kalata B9	<i>Oldenlandia affinis</i>	31	3270.3	GSVFNCGETCVLGTCTYTPGCTCNTYRVCTKD
10	kalata B10	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3028.14	GLPTCGETCFGGTCNTPGCSCSSWPICTRD
11	kalata B11	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2882.09	GLPVCGETCFGGTCNTPGCSTDPICTRD
12	kalata B12	<i>Oldenlandia affinis</i>	28	2878.08	GSLCGDTCFVLGCNDSSCSNYPICVKD
13	kalata B13	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3034.16	GLPVCGETCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRD
14	kalata B14	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3020.15	GLPVCGESCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRD
15	kalata B15	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2974.13	GLPVCGESCFGGSCYTPGCSTWPICTRD
16	kalata B16	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3184.39	GIPCAESCVYIPCTITALLGCKCQDKVCYD
17	kalata B17	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3183.4	GIPCAESCVYIPCTITALLGCKCKDQVCYN
18	kalata B18	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3144.31	GVPCAESCVYIPCISTVLGCSCSNQVCYRN
19	kalata B19	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3091.28	GFPCGESCVYVPCLTAAIGCSCSNKVCYKN
20	kalata S	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2876.13	GLPVCGETCVGGTCNTPGCSCSWPVCTRN
21	circulin A	<i>Chassalia parvifolia</i>	30	3149.38	GIPCGESCVWIPCISAALGCSCKNKVCYRN
22	circulin B	<i>Chassalia parvifolia</i>	31	3281.5	GVIPCGESCVFIPCISTLLGCSCKNKVCYRN
23	circulin C	<i>Chassalia parvifolia</i>	30	3099.36	GIPCGESCVFIPCITSVAGCSCSKVCYRN
24	circulin D	<i>Chassalia parvifolia</i>	30	3393.46	KIPCGESCVWIPCVTISIFNCKCENKVCYHD
25	circulin E	<i>Chassalia parvifolia</i>	30	3393.46	KIPCGESCVWIPCLTSVFNCKCENKVCYHD
26	circulin F	<i>Chassalia parvifolia</i>	29	3049.36	AIPCGESCVWIPCISAAIGCSCKNKVCYR
27	hcf-1	<i>Hedyotis centranthoides</i>	30	3192.31	GIPCGESCHYIPCVTSAIGCSCRNRSCMRN
28	htf-1	<i>Hedyotis terminalis</i>	30	3055.17	GIPCGDSCHYIPCVTSTIGCSCTNGSCMRN
29	cycloviolacin Q22	<i>Palicourea tetragona</i>	29	2904.16	GLPICGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN

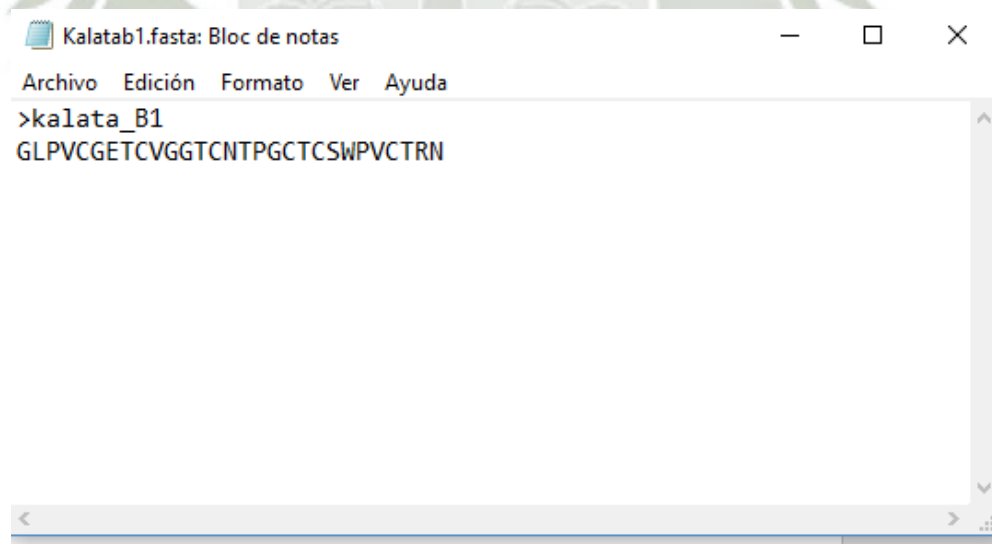
30	PS-1	<i>Psychotria suterella</i>	31	3233.34	GFIPCGETCIWDKTCHAAGCSCSVANICVRN
31	CD-1	<i>Chassalia discolor</i>	34	3607.54	GADGFCGESCYPVICISYLVGCSDTIEKVCKRN
32	vibi B	<i>Palicourea tetragona</i>	29	2929.14	GLPVCGETCFGGTCNTPGCTCSYPICTRN
33	vibi G	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	31	3220.4	GTFFPCGESCVPFIPCLTSAIGCSCSKVKCYKN
34	vibi H	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	31	3270.51	GLLPCAESCVPYIPCLTTVIGCSCSKVKCYKN
35	psyle A	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	28	2910.21	GIACGESCVPFLGCFIPGCSCSKVKCYFN
36	psyle B	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	28	3006.2	GIPCGETCVAFGCWIPGCSCDKLCYD
37	psyle C	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	25	2836.17	KLCGETCFKFKCYTPGCSCSYPFCK
38	psyle D	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	31	3254.41	GIPCGESCVPFIPCTVTALLGCSCQNKVCYRD
39	psyle E	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	31	3254.45	GVIPCGESCVPFIPCISSVLGCSCKNKVCYRD
40	psyle F	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	31	3210.43	GVIPCGESCVPFIPCITAAVGCSCKNKVCYRD
41	Oak6 cyclotide 1	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3033.18	GLPVCGETCFGGTCNTPGCACDPWPVCTRN
42	Oak6 cyclotide 2	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3090.23	GLPICGETCFGGTCNTPGCICDPWPVCTR
43	Oak7 cyclotide	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	3257.24	GSHCGETCFFFGCYKPGCSCDELQCYKN
44	Oak8 cyclotide	<i>Oldenlandia affinis</i>	30	3040.31	GVPCGESCVPFIPCLTAVVGCSCSNKVCYLN
45	Parigidin-br1	<i>Palicourea rigida</i>	32	3278.37	GGSVPCGESCVPFIPCITSLAGCSCKNKVCYYD
46	hedvotide B1	<i>Hedyotis biflora</i>	30	3402.41	GTRCGETCFVLPWSAKFGCYCQKGFYRN
47	hedvotide B2	<i>Hedyotis biflora</i>	29	3042.27	GIQCGESCVPWIPCISSAWGCSCKNKICSS
48	caripe 1	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	31	3268.47	GVIPCGESCVPFIPCISTVIGCSCDKVKCYRN
49	caripe 2	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	31	3243.41	GIPCGESCVPFIRCTITALLGCSCSNNVCYKN
50	caripe 4	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	27	3082.70	LICSSTCLRIPCLSPRCTCRHHICYLN
51	caripe 6	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	28	3199.4	GAICTGTCFRNPCLSRRCTCRHYICYLN

52	caripe 7	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	34	3253.47	GIPCGESC VFIPCTVTALLGCSCKNKVCYRN
53	caripe 8	<i>Carapichea ipecacuanha</i>	31	3237.51	GVIPCGESC VFIPCITAAIGCSCKKKVCYRN
54	chacur 1	<i>Chassalia curviflora</i>	29	2904.16	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPICTRN
55	psvbra 1	<i>Psychotria brachiata</i>	29	2954.26	GLPICGETCTLGTCNTPGCTCSWPICKN
56	paltet 1	<i>Palicourea tetragona</i>	29	2973.17	GLPICGETCFTGTCNTPGCTCSYPVCTRN
57	chassatide C1	<i>Chassalia chartacea</i>	29	2990.1	GDACGETCFTGICFTAGCSNPWPCTCRN
58	chassatide C2	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3282.36	GIPCAESC VWPCTTIT ALMGCSCKNNVCYNN
59	chassatide C3	<i>Chassalia chartacea</i>	29	3165.38	GIPCGESC VWIPCISSALGCSCKNKVCYRN
60	chassatide C4	<i>Chassalia chartacea</i>	29	2962.11	GASCGETCFTGICFTAGCSNPWPCTCRN
61	chassatide C5	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3239.45	GVIPCGESC VFIPCISSVVGCSCKNKVCYRN
62	chassatide C6	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3253.47	GVIPCGESC VFIPCISSVIGCSCKNKVCYRN
63	chassatide C7	<i>Chassalia chartacea</i>	29	2955.3	IPCGESC VWIPCITAIAGCSCKNKVCYT
64	chassatide C8	<i>Chassalia chartacea</i>	30	3084.36	AIPCGESC VWIPCISTVIGCSCKNKVCYR
65	chassatide C9	<i>Chassalia chartacea</i>	30	3127.34	GIPCGESC VFIPCVTTVIGCSCKDKVCYNN
66	chassatide C10	<i>Chassalia chartacea</i>	29	3211.28	GEYCGESC YLIPCFTPGCYCVSRQCVNKN
67	chassatide C11	<i>Chassalia chartacea</i>	28	3008.23	IPCGESC VWIPCISGMFGCSCKDKVCYS
68	chassatide C12	<i>Chassalia chartacea</i>	28	3154.26	EYCGESC YLIPCFTPGCYCVSRQCVNKN
69	chassatide C13	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3373.47	GFPCAESC VYIPCTVTALLGCSCRNRVCYRN
70	chassatide C14	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3290.4	GIPCAESC VYIPCTTIT ALFGCSCKDKVCYNN
71	chassatide C15	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3270.47	GIPCAESC VYIPCTTIT ALLGCSCDKVCYKN

72	chassatide C16	<i>Chassalia chartacea</i>	31	3276.39	GVPCAESCXYIPCTITALFGCSCCKDKVCYNN
73	chassatide C17	<i>Chassalia chartacea</i>	29	3001.32	IPCGESCXYIPCISAVLGCSCQNKVCYR
74	chassatide C18	<i>Chassalia chartacea</i>	30	3069.3	GIPCGESCXYFIPCISALLGCSCSNKVCYNN
75	palicourein	<i>Palicourea condensata</i>	37	3901.64	GDPTFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRSDGLCKRN
76	cyclopsychoiride A	<i>Psychotria longipes</i>	31	3228.46	SIPCGESCXYFIPCTVTALLGCSCSKVCYKN
77	vitri A	<i>Psychotria leptothyrsa</i>	30	3152.38	GIPCGESCXYWIPCITSAIGCSCSKVCYRN
78	hcf-1 variant	<i>Hedyotis centranthoides</i>	29	3029.24	GIPCGESCHIPCVTSAIGCSCRNRSCMRN

3.1.1 Ciclotidos de la familia *Rubiaceae*

Se obtuvieron 78 secuencias lineales en formato FASTA, este formato simple contiene el nombre de la proteína y la secuencia lineal de aminoácidos que conforman a la kalata B1 (Figura 3.1).



```

Kalatab1.fasta: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
>kalata_B1
GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
    
```

Figura 3.1. Representación de la estructura lineal en formato fasta de la Kalata B1.

También se realizó la búsqueda de los modelos cristalográficos, obteniendo 5 modelos contenidos en la base de datos PDB (Tabla 3.2), determinando la selección de estas 5 estructuras para la realización de los análisis cuánticos, identificando los modelos cristalográficos de las estructuras cíclicas, obteniendo su formato .pdb y la comparación de la secuencia fasta (Figura 3.2), mientras que los 73 ciclótidos restante fueron sometidos a análisis clásicos.

4TTO
Quasi-racemic structure of [V25A] kalata B1
DOI: 10.2210/pdb4tto/pdb
Classification: PLANT PROTEIN
Deposited: 2014-06-22 Released: 2014-09-10
Deposition author(s): Wang, C.K., King, G.J., Craik, D.J.
Organism: Oldenlandia affinis | synthetic construct
Mutation(s): 1
Structural Biology Knowledgebase: 4TTO (>11 annotations) [SBKB.org](#)

Experimental Data Snapshot
Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 2.3 Å
R-Value Free: 0.327
R-Value Work: 0.242

wwPDB Validation
Metric Percentile Ranks Value
Rfree 0.296
Clashscore 4
Ramachandran outliers 0

kalata B1 precursor [Oldenlandia affinis]
GenBank: AAL05477.1
[GenPept](#) [Identical Proteins](#) [Graphics](#)
>gi|15667741|gb|AAL05477.1|AF393825_1 kalata B1 precursor [Oldenlandia affinis]
MARFTVCLLCLLLARFVGFAGSELSDSHRTTLVNEIAERMLQRRILOGVEATLVDVAERMFRRMKAE
AKTSETADQVFLKQLKRLGLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWVCTRNGLPSLAA

kalata B1
cycloviolacin O1
kalata B2
palicourein
vhr1
tricyclon A
circulin A
cycloviolacin O2
kalata B6
kalata B3

GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWVCTRN
GIPCAESCVMIPCTVTALLGCSCSNKVCYN
GLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRD
GDPTFCGETCRVIPVCTYSALGCTCDDRSGLCKRN
GIPCAESCVMIPCTVTALLGCSCSNKVCYN
GGTIFDCGESCFLGTCYTKGCSCGEWKLKCYGN
GIPCGESCVMIPCISSAIGCSCKSKVCYRN
GIPCGESCVMIPCISSAIGCSCKSKVCYRN
GLPTCGETCFGGTCNTPGCSCSWVCTRN
GLPTCGETCFGGTCNTPGCTCDEWPICTRD

Figura 3.2. Identificación del código PDB de la Kalata B1.

Tabla 3.2. Códigos PDB de los cristales de ciclótidos presente en www.rcsb.org

Ciclótidos	ESPECIE	Nº AA	Código PDB
Kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	4TTM
Kalata B7	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	2M9O
Kalata B12	<i>Oldenlandia affinis</i>	28	2KVX
Cycloviolacin O22	<i>Palicourea tetragona</i>	29	2GJ0
Palicourein	<i>Palicourea condensata</i>	37	1RF1

3.2 Estados fundamentales de los ciclótidos

3.2.1 Estructura lineal de los ciclótidos de *Rubiaceae*

Las 78 secuencias lineales en formato fasta se analizaron en el visualizador Chimera, estas estructuras lineales de los ciclótidos presentan una estructura proteica simple, donde no se aprecia la formación de la estructura cíclica ni presencia o acercamiento de las colas terminales, ya que se encuentran en extremos contrarios, además que esta proteína no presenta el Nudo Cíclico de Cisteínas ni plegamiento oxidativo, en la Figura 3.3 se obtuvo la representación gráfica de la secuencia FASTA del ciclótido kalata B1.

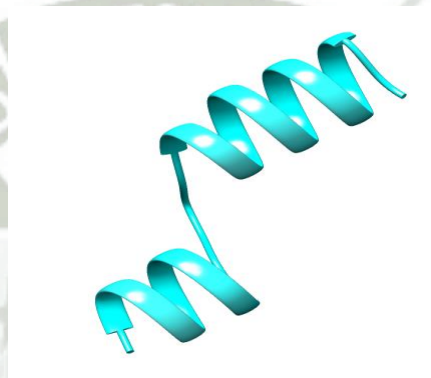


Figura 3.3. Representación gráfica de la secuencia FASTA del ciclótido Kalata B1

3.2.2 Estructura terciaria de los ciclótidos de *Rubiaceae*

Las estructuras lineales recopiladas fueron modeladas por homología y predicción en el servidor online Robetta obteniendo 78 estructuras terciarias.

La Figura 3.4 muestra el modo de trabajo del servidor Robetta, este servidor predice las estructuras realizando una búsqueda en la base de datos PDB, escogiendo modelos que compartan la misma cantidad de aminoácidos, proteínas parecidas o proteínas de una especie de planta perteneciente a la misma familia, utilizando el modelamiento por homología.

ROBETTA BETA
Full-chain Protein Structure Prediction Server

Structure Prediction Fragment Libraries Alanine Scanning DNA Interface Scan
[\[Queue \]](#) [\[Submit \]](#) [\[Queue \]](#) [\[Submit \]](#) [\[Queue \]](#) [\[Submit \]](#) [\[Queue \]](#) [\[Submit \]](#)
[\[Register / Update \]](#) [\[Docs / FAQs \]](#) [\[Logout \]](#) AdeLnt

Robetta Queue

118 Job(s) Queued + Active Status: Sort By:
 Username: ID: Target: Notes: Host:
 Results Per Page:

Page 1 of 407

[How long does a job take?](#)

Robetta is continually evaluated through [CAMEO](#). Template databases are updated weekly on Wednesdays following the RCSB PDB update.

If necessary, jobs may be removed one week after they complete to conserve disk space.

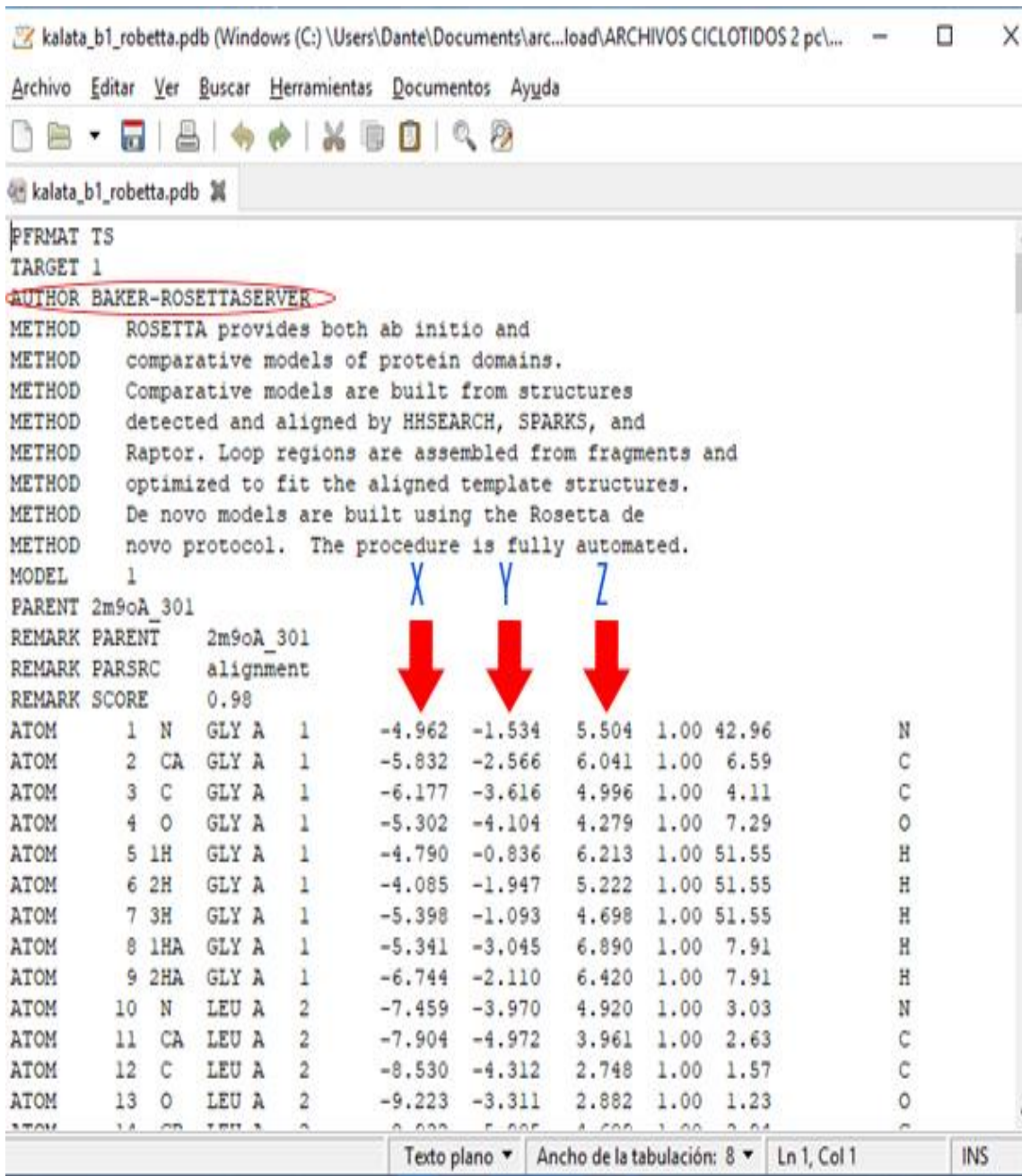
To help conserve disk space, **please remove your jobs after they complete** by following these [instructions](#).

 Identificador del trabajo en cola de espera

X	Num	ID	Status	Method	Username	Target	Length	Domain Prediction
<input type="checkbox"/>	1	82806	Queued	Ginzu	AdeLnt	kb1	29	--
<input type="checkbox"/>	2	82805	Queued	Ginzu	pooja62	SB_Prac9	242	--
<input type="checkbox"/>	3	82804	Queued	Ginzu	fatima1992	1-60	35	--
<input type="checkbox"/>	4	82802	Queued	Ginzu	holckasi	HW7	166	--
<input type="checkbox"/>	5	82801	Queued	Ginzu	Aguirre	F275V	423	--
<input type="checkbox"/>	6	82800	Queued	Ginzu	DFEPT1	TOPD	561	--

Figura 3.4. Servidor Robetta, el trabajo de predicción esta remarcado en rojo, donde se observa el identificador (82806), que es puesto en la cola de espera, seguidamente aparece el “Target” que representa el nombre del trabajo y a su costado la longitud de la proteína, el proceso se divide en dos etapas, siendo la primera la identificación de las posibles cristales PDB a comparar y modelar, y la segunda la realización de la predicción y obtención de la proteína, este proceso se da por orden de llegada colocando los trabajos en cola de espera, la predicción en Robetta finaliza alrededor de 4 a 6 horas.

Encontrando de esta forma la distribución espacial de la proteína, obteniendo las coordenadas XYZ contenidas en formato PDB (Figura 3.5), esta estructura fue denominada un “pre-ciclótido”, ya que no contaba con el enlace peptídico terminal y carecían de la presencia del nudo cíclico de cisteínas por la ausencia de los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína (Fig. 3.6 y 3.7).



```

FFORMAT TS
TARGET 1
AUTHOR BAKER-ROSETTASERVER
METHOD ROSETTA provides both ab initio and
METHOD comparative models of protein domains.
METHOD Comparative models are built from structures
METHOD detected and aligned by HHSEARCH, SPARKS, and
METHOD Raptor. Loop regions are assembled from fragments and
METHOD optimized to fit the aligned template structures.
METHOD De novo models are built using the Rosetta de
METHOD novo protocol. The procedure is fully automated.
MODEL 1
PARENT 2m9oA_301
REMARK PARENT 2m9oA_301
REMARK PARSRC alignment
REMARK SCORE 0.98
ATOM 1 N GLY A 1 -4.962 -1.534 5.504 1.00 42.96 N
ATOM 2 CA GLY A 1 -5.832 -2.566 6.041 1.00 6.59 C
ATOM 3 C GLY A 1 -6.177 -3.616 4.996 1.00 4.11 C
ATOM 4 O GLY A 1 -5.302 -4.104 4.279 1.00 7.29 O
ATOM 5 1H GLY A 1 -4.790 -0.836 6.213 1.00 51.55 H
ATOM 6 2H GLY A 1 -4.085 -1.947 5.222 1.00 51.55 H
ATOM 7 3H GLY A 1 -5.398 -1.093 4.698 1.00 51.55 H
ATOM 8 1HA GLY A 1 -5.341 -3.045 6.890 1.00 7.91 H
ATOM 9 2HA GLY A 1 -6.744 -2.110 6.420 1.00 7.91 H
ATOM 10 N LEU A 2 -7.459 -3.970 4.920 1.00 3.03 N
ATOM 11 CA LEU A 2 -7.904 -4.972 3.961 1.00 2.63 C
ATOM 12 C LEU A 2 -8.530 -4.312 2.748 1.00 1.57 C
ATOM 13 O LEU A 2 -9.223 -3.311 2.882 1.00 1.23 O

```

Figura 3.5. Formato PDB, este formato contiene las coordenadas espaciales de la proteína kalata B1 obtenida de la predicción realizada por Robetta (remarcado en rojo como autor), este archivo también contiene la información de los átomos y los residuos presentes en el ciclótido y adicionalmente en el caso de los ciclótidos también contiene la identificación de los enlaces disulfuro y péptido terminal en una lista final caracterizada con el comando CONNECT y los átomos que forman el enlace.



Figura 3.6. Estructura de un pre-ciclótido de la Kalata B1.

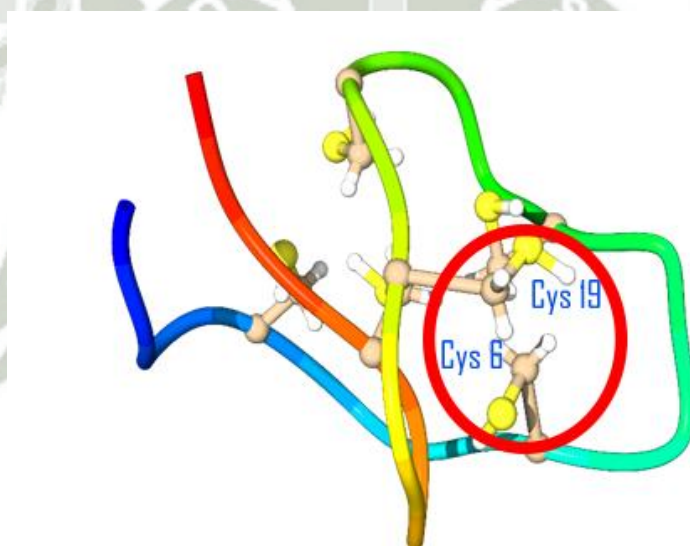


Figura 3.7. Ausencia del Nudo cíclico de cisteínas del ciclótido Kalata B1.

Con el visualizador Chimera se realizó la adición y formación del enlace peptídico final entre las colas amino y carboxilo N-C/C-N respectivamente, seguido de una minimización con el campo de fuerza AMBER originando la estructura cíclica y formando un enlace amida, que se forma mediante una reacción de condensación produciendo una molécula

de agua por la pérdida de 2 hidrógenos de la cola amino y un oxígeno de la cola carboxilo (Figura 3.8).

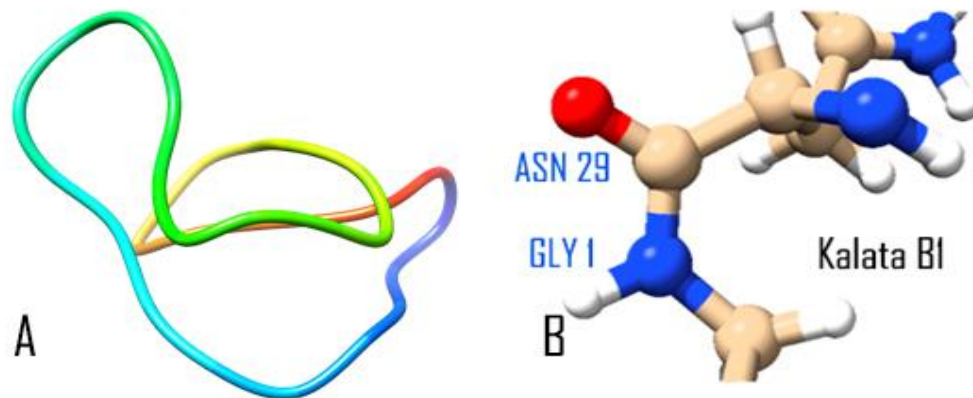


Figura 3.8. A. Estructura cíclica del ciclótido kalata B1, B. Enlace peptídico terminal del ciclótido Kalata B1, este enlace peptídico se da entre los aminoácidos de Asparagina (ASN29) y Glicina (GLY1) interactuando el C-N respectivamente.

La formación del enlace amida de la Kalata B7 entre aminoácidos terminales, permite a la proteína formar su forma cíclica, este enlace peptídico posee dos conformaciones, puede ser Trans (Figura 3.9) o Cis como la kalata B1, al pertenecer a la misma familia de planta ambos ciclótidos poseen 29 aminoácidos en su estructura.

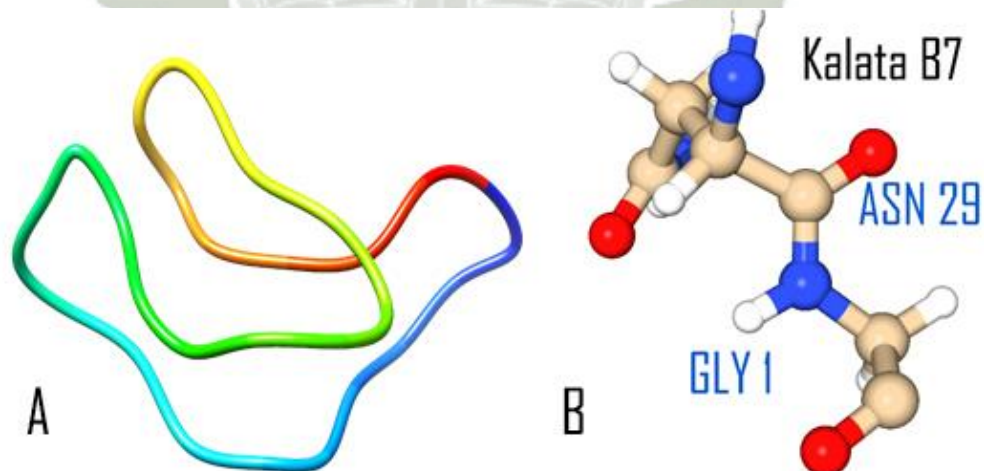


Figura 3.9. A. Estructura cíclica del ciclótido kalata B7, B. Enlace peptídico terminal del ciclótido Kalata B7, este enlace peptídico tiene una conformación trans, se da entre los aminoácidos de Asparagina (ASN29) y Glicina (GLY1).

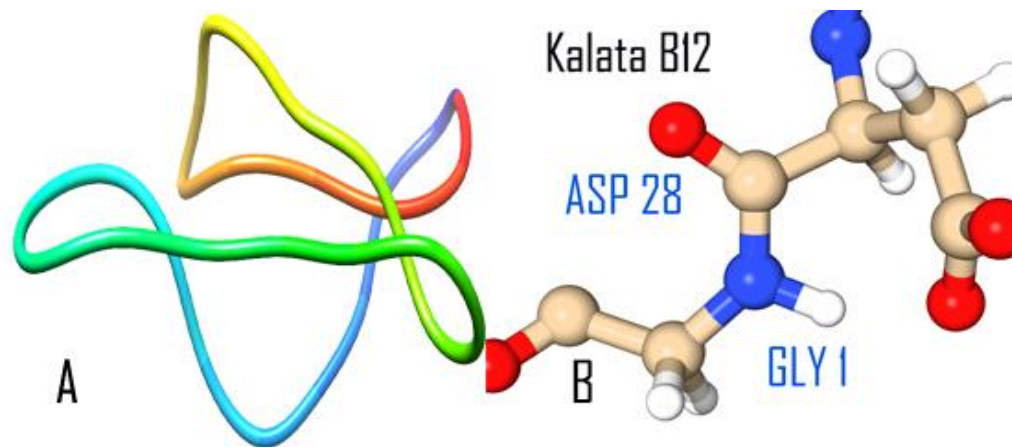


Figura 3.10. A. Estructura cíclica del ciclótido kalata B12, B. Enlace peptídico terminal del ciclótido Kalata B12, este enlace peptídico tiene una conformación trans, se da entre los aminoácidos de Ácido Aspártico (ASP28) y glicina (GLY1)

El ciclótido Palicourein, es el más grande de todos, sin embargo, una de las características de este ciclótido es que a pesar de su variedad de aminoácidos, este no presenta láminas beta, siendo su estructura conformada por loops (Figura 3.12).

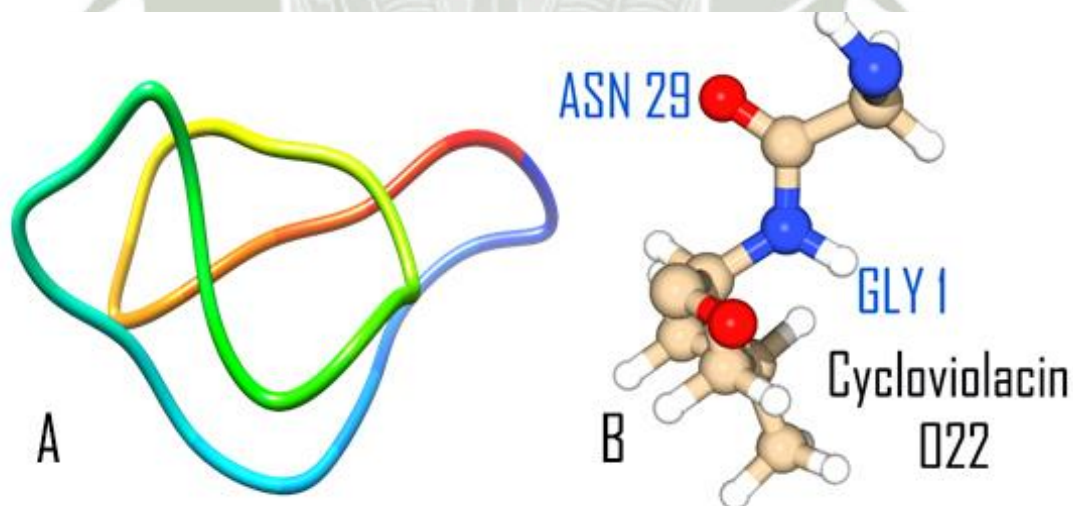


Figura 3.11. A. Estructura cíclica del ciclótido Cycloviolacin O22, B. Enlace peptídico terminal del ciclótido Cycloviolacin O22, este enlace peptídico tiene una conformación trans, se da entre los aminoácidos de Asparagina (ASN29) y Glicina (GLY1).

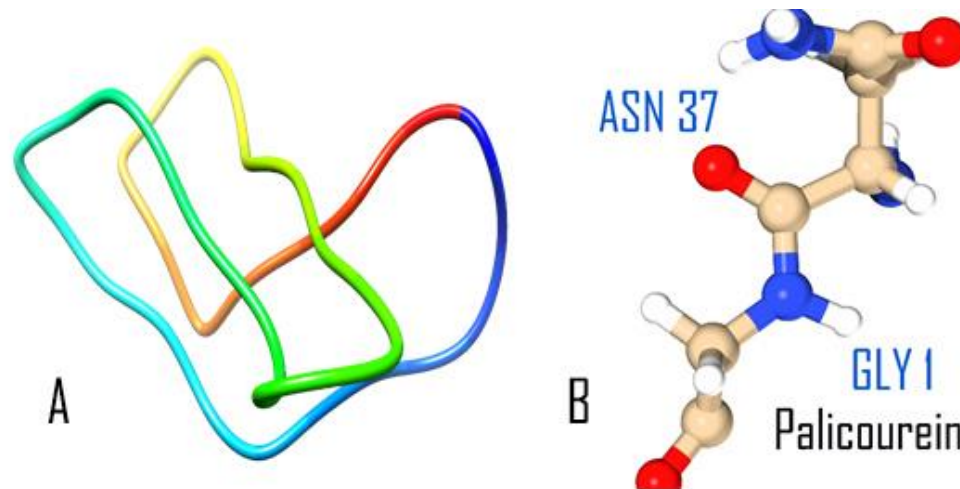


Figura 3.12. A. Estructura cíclica del ciclótido Palicourein. B. Enlace peptídico terminal del ciclótido Palicourein, este enlace peptídico tiene una conformación trans, se da entre los aminoácidos de Asparagina (ASN37) y Glicina (GLY1), siendo considerado el ciclótido más largo.

Con la conformación cíclica del ciclótido se obtuvo la formación de los enlaces disulfuro entre las cisteínas utilizando el visualizador Chimera originando el Nudo Cíclico de Cisteínas. Los enlaces disulfuro del ciclótido ayudan en la conformación del plegamiento oxidativo de la proteína cíclica, además que participan activamente en las actividad biológica y centros activos de la proteína, permitiendo así definir la estructura final del ciclótido (Figura 3.13).

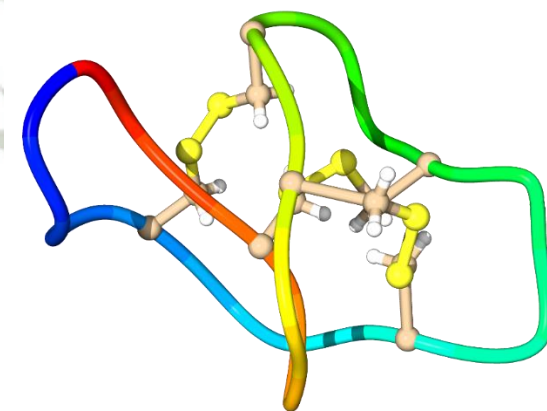
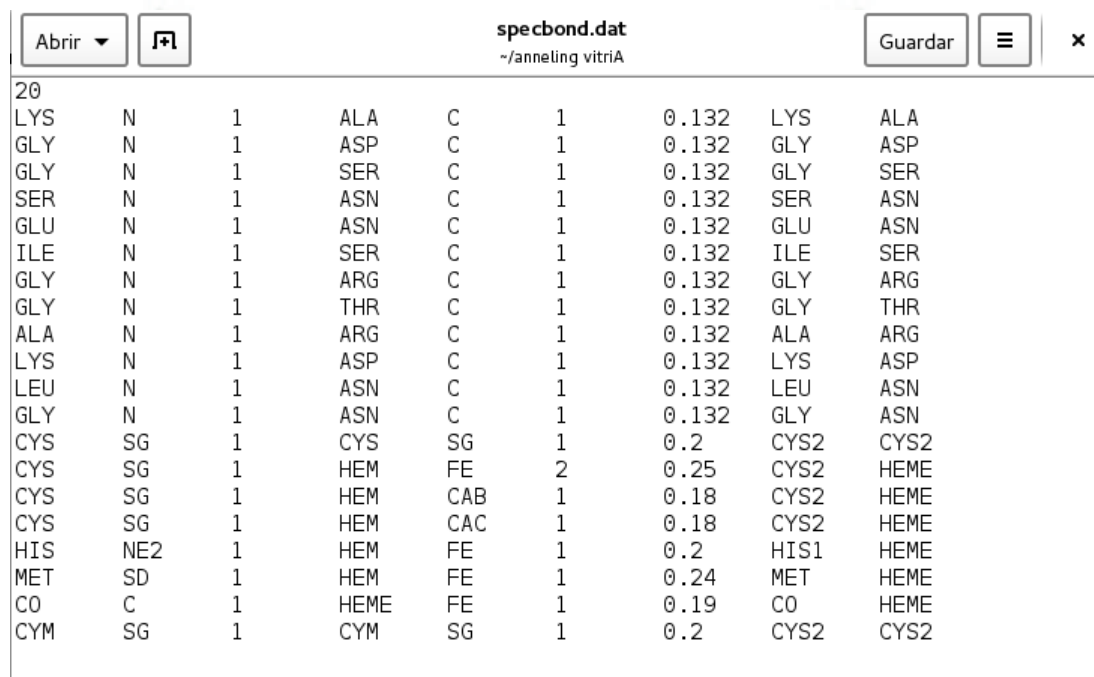


Figura 3.13. Nudo Cíclico de Cisteínas (NCC) ciclótido Kalata B1, estos puentes disulfuro se dan entre las 6 cisteínas presentes en el ciclótido.

3.2.3. Optimización Geométrica de los ciclótidos

3.2.3.1 Dinámica Molecular y optimización de las estructuras cíclicas

Se creó una nueva entrada de datos en la programación interna de los campos de fuerza OPLSSA y archivos enlazantes de Gromacs que se encargaron de reconocer los átomos y la formación de los enlaces peptídicos terminales, permitiendo a Gromacs identificar los enlaces disulfuro entre Cys-Cys y aminoácidos terminales (Figura 3.14).



Abrir ▾		[+] [x]		specbond.dat		Guardar		☰		x	
~/annealing vitriA											
20											
LYS	N	1	ALA	C	1	0.132	LYS	ALA			
GLY	N	1	ASP	C	1	0.132	GLY	ASP			
GLY	N	1	SER	C	1	0.132	GLY	SER			
SER	N	1	ASN	C	1	0.132	SER	ASN			
GLU	N	1	ASN	C	1	0.132	GLU	ASN			
ILE	N	1	SER	C	1	0.132	ILE	SER			
GLY	N	1	ARG	C	1	0.132	GLY	ARG			
GLY	N	1	THR	C	1	0.132	GLY	THR			
ALA	N	1	ARG	C	1	0.132	ALA	ARG			
LYS	N	1	ASP	C	1	0.132	LYS	ASP			
LEU	N	1	ASN	C	1	0.132	LEU	ASN			
GLY	N	1	ASN	C	1	0.132	GLY	ASN			
CYS	SG	1	CYS	SG	1	0.2	CYS2	CYS2			
CYS	SG	1	HEM	FE	2	0.25	CYS2	HEME			
CYS	SG	1	HEM	CAB	1	0.18	CYS2	HEME			
CYS	SG	1	HEM	CAC	1	0.18	CYS2	HEME			
HIS	NE2	1	HEM	FE	1	0.2	HIS1	HEME			
MET	SD	1	HEM	FE	1	0.24	MET	HEME			
CO	C	1	HEME	FE	1	0.19	CO	HEME			
CYM	SG	1	CYM	SG	1	0.2	CYS2	CYS2			

Figura 3.14. Archivo Specbond.dat de Gromacs, este se encarga de reconocer los enlaces terminales de la cola amino y cola carboxilo identificando los aminoácidos, los átomos que participan (N-C) y la distancia del enlace intermolecular que forman.

Para realizar una adecuada simulación del sistema se realizó el cambio del campo de fuerza OPLSA, este cambio se realizó para la identificación de los enlaces disulfuro, la identificación del enlace peptídico terminal y a su vez evitar la adición de átomos de hidrogeno y oxigeno que Gromacs colocaba por defecto al identificar a el ciclótido como una proteína con terminales amino y carboxilo, obteniendo un cambio en la configuración de los archivos “aminoacids.c.tdb” y “aminoacids.n.tdb”, seleccionando códigos nuevos para el campo de fuerza de la cola carboxilo y cola amino (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Cambio de los campos de fuerza de la configuración interna de Gromacs

Aminoacids.c.tdb		Aminoacids.n.tdb	
Original	Nuevo	Original	Nuevo
CA opls_298	CA opls_224B	N opls_287	N opls_238
C opls_271	C opls_235	CA opls_298	CA opls_223B
O opls_272	O opls_236	H opls_290	H opls_241
OXT opls_272	-	-	-

La optimización geométrica de las estructuras permitió obtener proteínas ubicadas en la región del mínimo global energético (Tabla 3.4), garantizando la estabilidad de la proteína en la dinámica molecular.

Tabla 3.4. Energía total Ciclotido Kalata B1 ubicado en el mínimo energético en 200 ns.

Energía Total del Ciclotido Kalata B1			
Energías	Promedio	RMSD	Valor kJ/mol
Energía Potencial	-163161	455.541	-34.2123
Energía Cinética	31833.7	315.742	-4.35461
Energía Total	-131328	592.363	-38.5669

Se obtuvo la optimización geométrica en una trayectoria de 200 ns de los 78 ciclotidos de la familia *Rubiaceae*, todos ellos calculados a una temperatura fisiológica de 36.5 °C/ 309.65 K, con el fin de validar los resultados se escogió 5 ciclotidos representativos los cuales presentaron una elevada estabilidad estructural y una reducida fluctuación de aminoácidos, debido a su modelamiento estructural obtenido por la utilización de sus cristales PDB reportados en www.rcsb.org. Sin embargo, los datos obtenidos de los 73 ciclotidos restantes fueron colocados en el Apéndice 1 reportando la estructura

optimizada, la energía del sistema total y la validación teórica de la estructura representada en su desviación media cuadrática RMSD.

3.2.3.1. Ciclotido Kalata B1

La figura 3.15, muestra la conformación NCC del Ciclotido Kalata B1, estos enlaces se mantuvieron estables y no sufrieron cambios conformacionales en la dinámica molecular, permitiendo identificar la estabilidad estructural que presentan estas proteínas cíclicas.

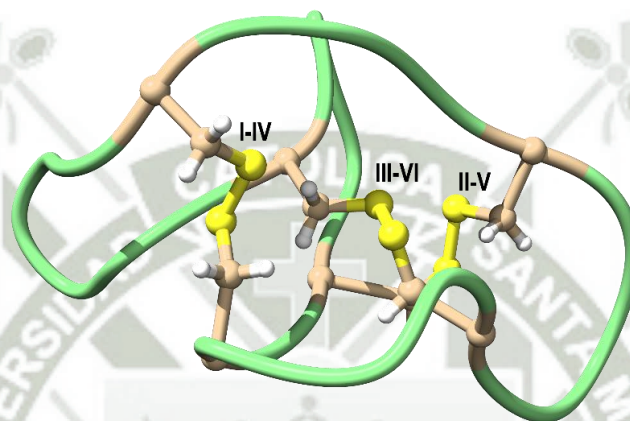


Figura 3.15. Nudo Cíclico de Cisteínas conformadas por la disposición de los enlaces disulfuro (I-IV, II-V, III-VI) de la Kalata B1 finalizada la dinámica molecular.

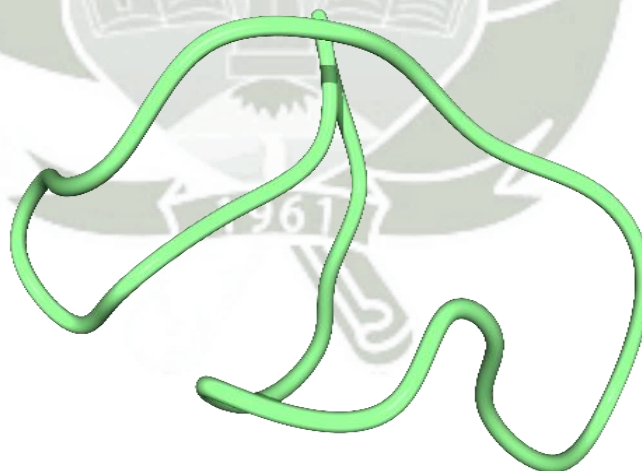


Figura 3.16. Modelo optimizado del ciclotido Kalata B1, este modelo representa la forma circular característica de los ciclotidos.

El modelo de la Kalata b1, fue comprobado por la estabilidad estructural que presentó la proteína durante la trayectoria calculada, en la Figura 3.17 se observa la poca variación conformacional que experimenta el ciclótido Kalata B1 durante un periodo de tiempo de 200 ns, obteniendo la estabilidad a partir de 1.5 ns y manteniendo su estabilidad constante.

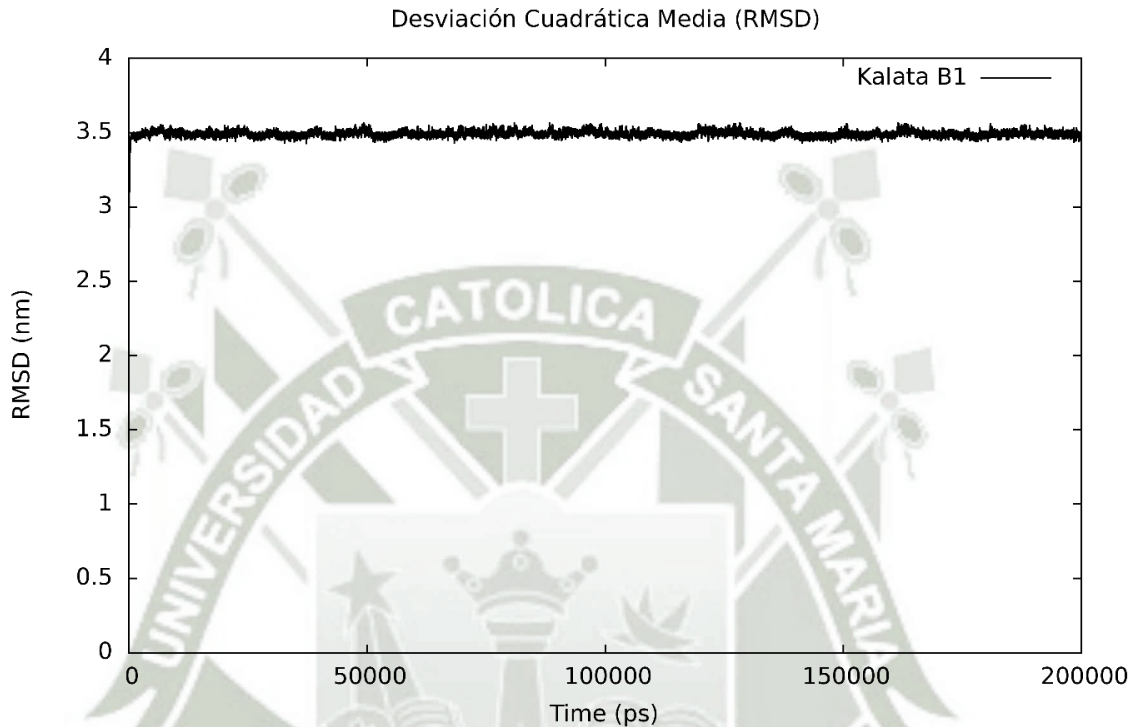


Figura 3.17. Desviación Cuadrática Media RMSD del ciclótido Kalata B1, el sistema se mantuvo estable durante la dinámica molecular.

Se obtuvo las fluctuaciones de los aminoácidos presentes en el ciclótido Kalata B1, en la Figura 3.18, se observa las variaciones que experimentan los residuos, las cisteínas son los aminoácidos que se mantienen estables y sin alteraciones durante la dinámica molecular.

Los residuos de la Kalata B1 que experimentaron una poca actividad durante la dinámica molecular fueron la CYS9, CYS14 Y CYS 26 reflejando su estabilidad estructural, sin embargo, los aminoácidos ASP6 y ASP28 fueron lo que más fluctuaron y expresaron mayor movimiento durante la dinámica molecular.

Finalmente el diagrama Ramachandran de la estructura de la Kalata B1 expreso un porcentaje de 98 % de aminoacidos en regiones favorecidas, y manteniendo solo el 2 % de aminoacidos fuera de region, siendo representado por el residuo de triptofano, este porcentaje es aceptable ya que el triptofano se encuentra en la cara externa de la proteina y la desviación de sus enlaces se debe al movimiento de la cola que este posee, obteniendo el porcentaje total de 98% y demostrando la estabilidad estructural (Figura 3.19).

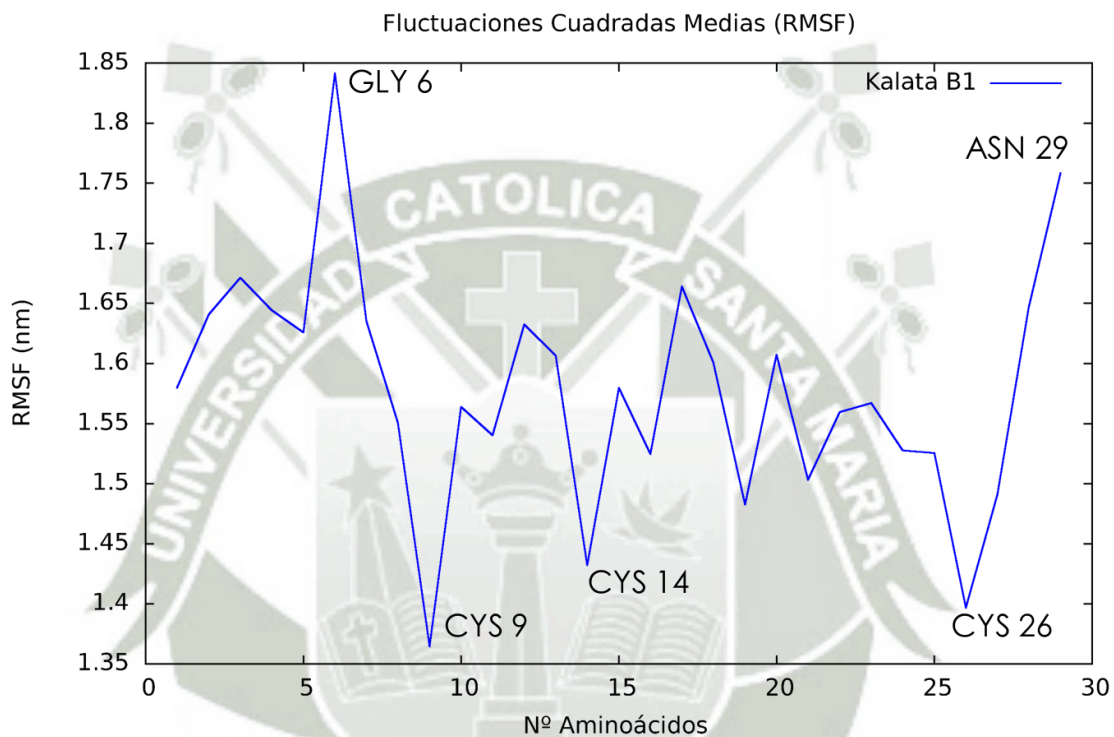


Figura 3.18. Fluctuaciones de los aminoácidos de la Kalata B1, los aminoácidos de menor fluctuación se ubican en los valles, mientras que los aminoácidos que mayor fluctuación tuvieron se ubican en los picos.

Sin embargo se determino que el residuo TRP 23 se encuentra relacionado directamente en la fluctuacion de la proteina, en la grafica general de rmsd este residuo no muestra cambios significativos, pero en el diagrama ramachandran se observa claramente la posicion que este adopta finalizada la dinamica molecular, dando como resultado que el TRP23 (Figura 3.19) experimente cambios bruscos de giro o cambios en sus angulos de torcion durante la dinamica molecular, esto se explica mas por la conformacion que posee

el aminoácido este posee un grupo indol que es el que se mueve constantemente en la dinámica molecular, además es un aminoácido apolar y se encuentra en la región hidrofóbica de la proteína (Figura 3.20).

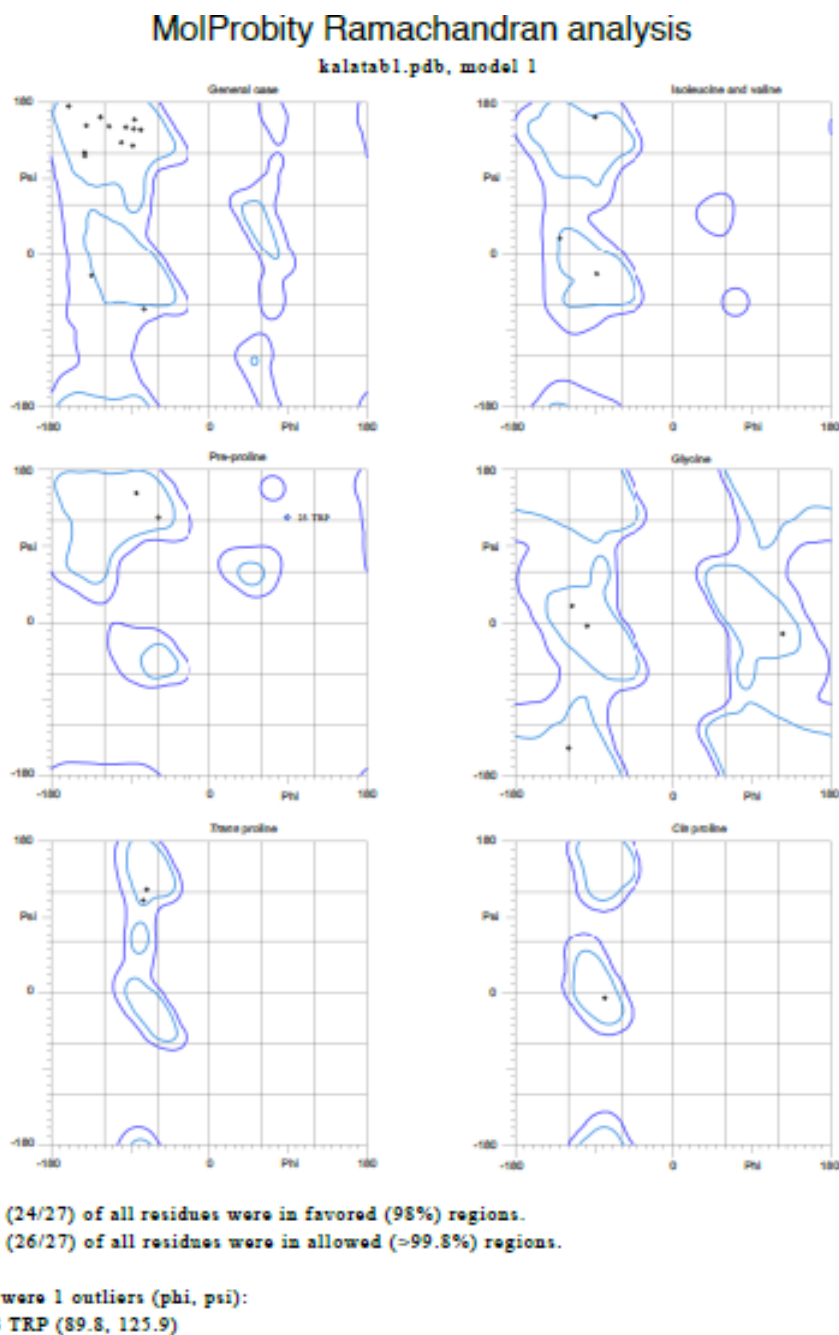


Figura 3.19. Diagrama Ramachandran de la Kalata B1.

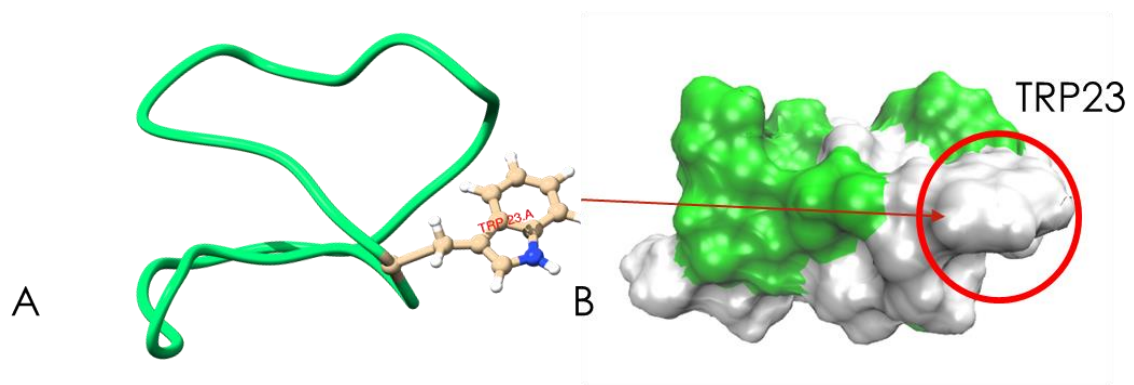


Figura 3.20. A. Aminoácido TRP23 junto a su grupo indol B. Región hidrofóbica del ciclótido kalata B1

3.2.3.2. Ciclótido Kalata B7

El Ciclótido Kalata B7 presenta la misma cantidad de aminoácidos que la Kalata B1, pero este se diferencia por poseer otros aminoácidos en su secuencia, provocando la formación de láminas beta en su estructura terciaria, (Figura 3.22) además no presenta cambios en la posición de los residuos de cisteína ya que se encuentran en las posiciones CYS5-CYS19, CYS14-CYS26 y CYS21-CYS9 (Figura 3.21).

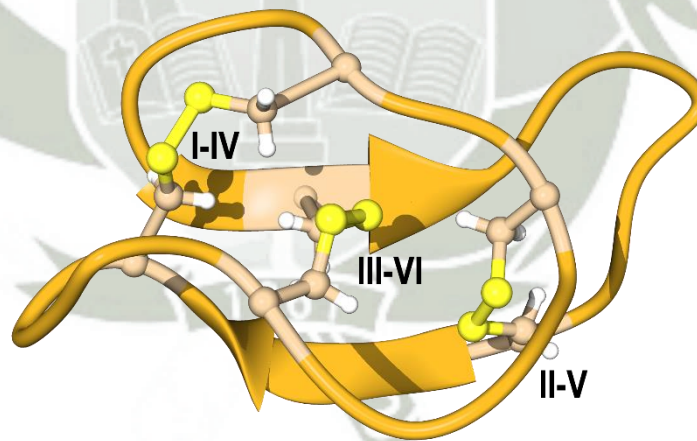


Figura 3.21. Enlaces disulfuro del Nudo Cíclico de Cisteínas de la Kalata B7 finalizada la dinámica molecular.

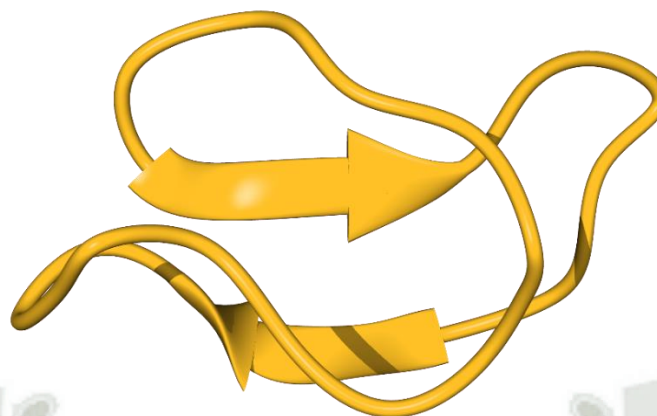


Figura 3.22. Modelo optimizado del Ciclotido Kalata B7, este modelo representa la forma circular característica de los ciclotidos.

La desviación cuadrática media de la Kalata B7 muestra como fue el comportamiento de la proteína en la trayectoria de la simulación, esta se mantuvo estable y constante desde el 1 ns, y manteniendo su estructura conformacional con ligeros cambios, debido a la interacción de los aminoácidos externos con las partículas agua (Figura 3.23).

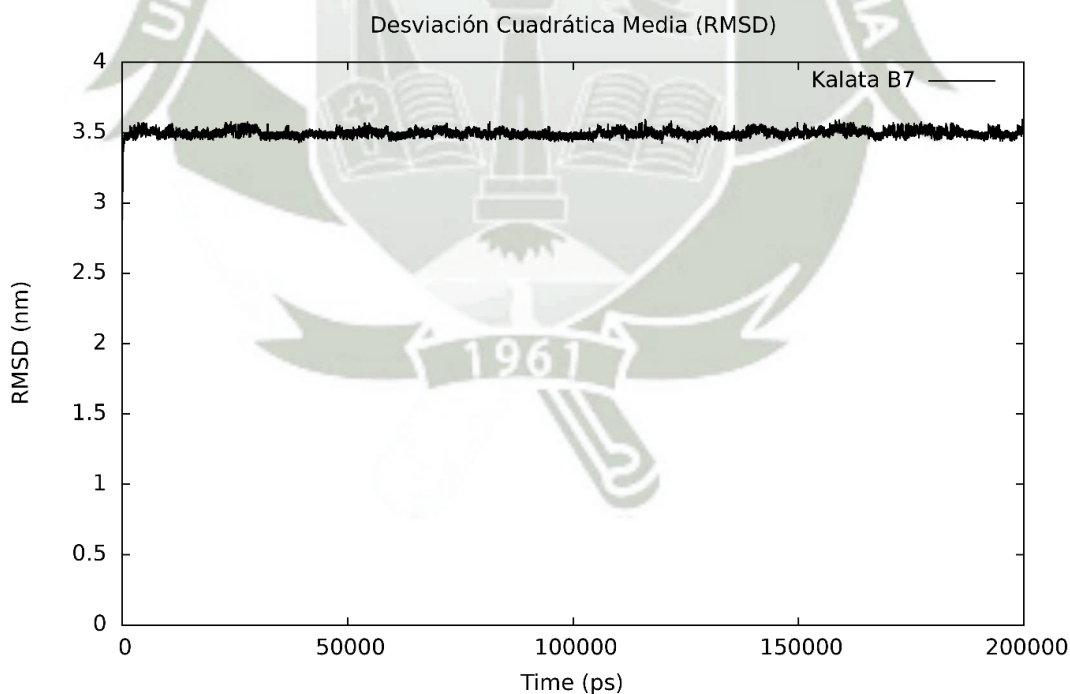


Figura 3.23. Desviación Cuadrática Media RMSD del ciclotido Kalata B7, el sistema se mantuvo estable durante la dinámica molecular.

Los residuos de cisteínas son los más estables durante la dinámica molecular, esto se observa en la fluctuación de los aminoácidos (Figura 3.24) donde las cisteínas se mantienen en los valles de la gráfica y siendo los picos los aminoácidos que tienen una mayor actividad y movimiento durante la dinámica.

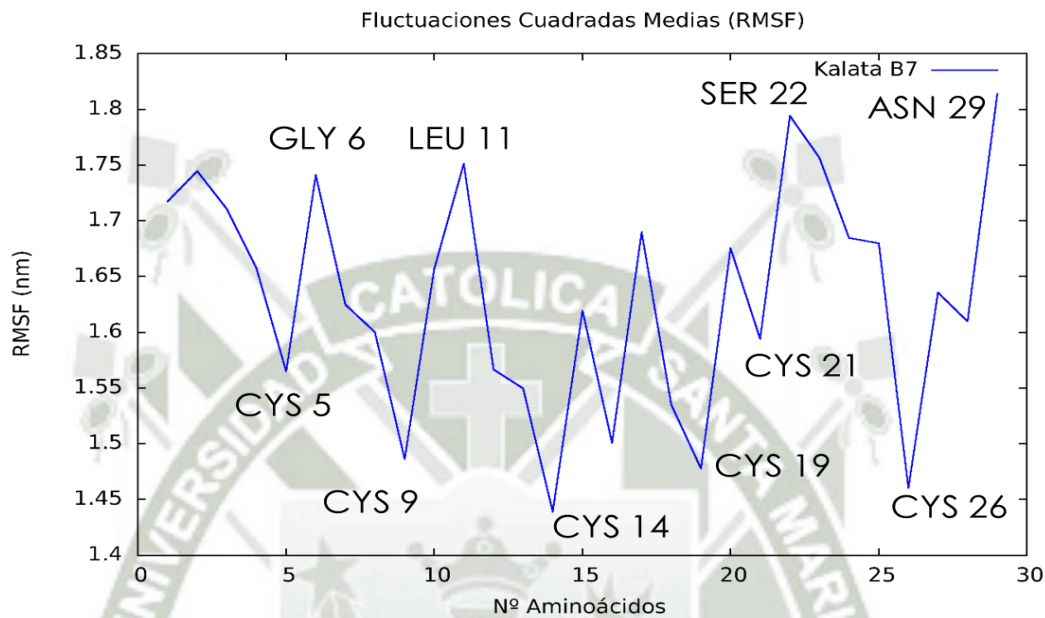
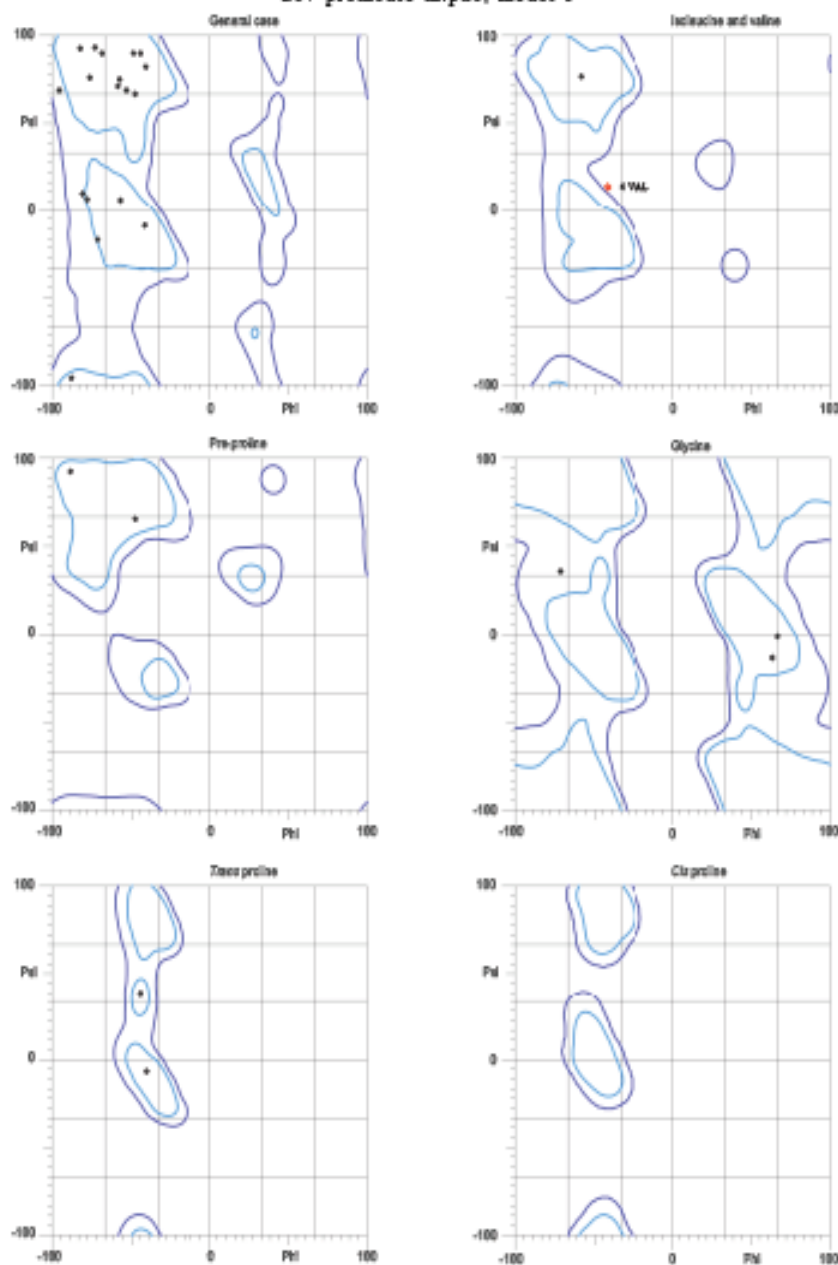


Figura 3.24. Fluctuaciones de los aminoácidos de la Kalata B7, los aminoácidos de menor fluctuación se ubican en los valles, mientras que los aminoácidos que mayor fluctuación tuvieron se ubican en los picos.

El diagrama ramachandran de la Kalata B7 (Figura 3.25), nos muestra un porcentaje de 98% de residuos en regiones favorecidas, siendo el aminoácido Valina 4 el único que se encuentra fuera de regiones permitidas, la diferencia entre la Kalata B1 y la Kalata B7 se encuentra en la posición del aminoácido dentro del diagrama ramachandran, la kalata b1 posee una posición de 89.8, 125.9 obteniendo valores completamente positivos originando que el aminoácido se aleje demasiado de la regiones permitidas o favorecidas, mientras que la Kalata B7 posee una posición de -74.5, 24.0, siendo este valor negativo el que se aproxima más a la región permitida, y descartando la presencia de una cambio conformacional en el aminoácido de la Valina4, demostrando la calidad del modelo optimizado y garantizando la estabilidad de este.

MolProbity Ramachandran analysis

kb7-promedio-m.pdb, model 1



85.2% (23/27) of all residues were in favored (98%) regions.

96.3% (26/27) of all residues were in allowed ($\geq 99.8\%$) regions.

There were 1 outliers (phi, psi):

4 VAL (-74.5, 24.0)

Figura 3.25. Diagrama Ramachandran de la Kalata B7.

3.2.3.3. Ciclotido Kalata B12

La Kalata B12 a diferencia de la Kalata B1 y B7, solo obtuvo 28 aminoácidos, esto no afecta a la estructura, pero si hace un cambio en la posición de sus aminoácidos y la formación del NCC, ya que las posiciones de las cisteínas cambian ligeramente a CYS4-CYS18, CYS13-CYS25 Y CYS8-CYS20. Además, que su estructura terciaria solo presenta loops (Figura 3.27).

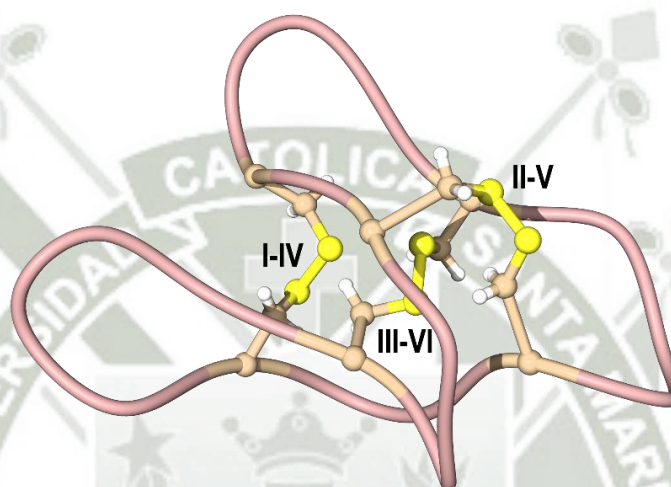


Figura 3.26. Enlaces disulfuro del Nudo Cíclico de Cisteínas de la Kalata B12 finalizada la dinámica molecular.



Figura 3.27. Modelo optimizado del Ciclotido Kalata B12, este modelo representa la forma circular característica de los ciclotidos.

La gráfica RMSD de la kalata B12 (Figura 3.28), representa los cambios conformacionales que experimenta el ciclótido en un periodo de tiempo, el ciclótido Kalata B12 llega a la estabilidad desde 2 ns, y manteniendo su trayectoria constante en 3.5 nm.

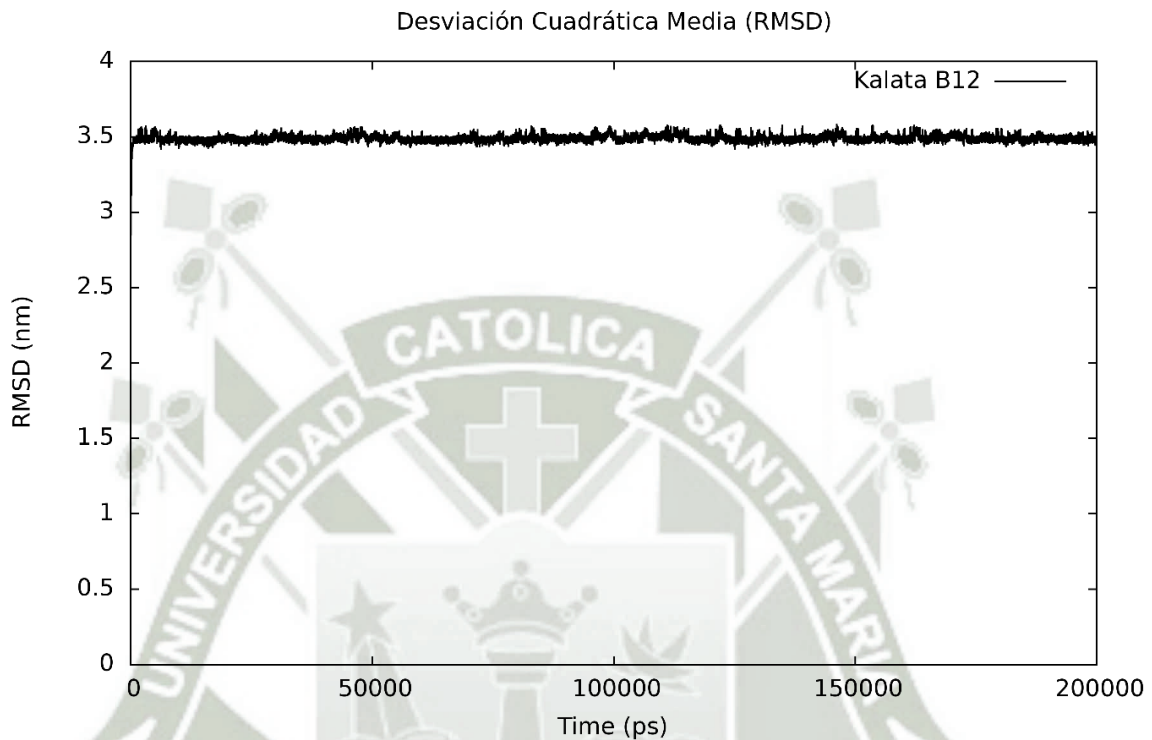


Figura 3.28. Desviación Cuadrática Media RMSD del ciclótido Kalata B12, el sistema se mantuvo estable a los 3.5 nm.

Los residuos de cisteína de la Kalata b12 se mantuvieron constantes, en la gráfica RMSF (Figura 3.29), muestra como los residuos de CYS4, CYS8, CYS13, CYS18 Y CYS25, son los que menos fluctuaron demostrando que necesitan más condiciones para lograr que estos aminoácidos puedan experimentar un cambio conformacional además que la gráfica RMSF está directamente relaciona a la actividad que presentan los aminoácidos frente a un cambio de temperatura, los aminoácidos que se ubican en los valles de la gráfica son aquellos que no sufren cambios conformacionales frente a un cambio de temperatura, y demostrando que los enlaces de cistina presentan una termoestabilidad.

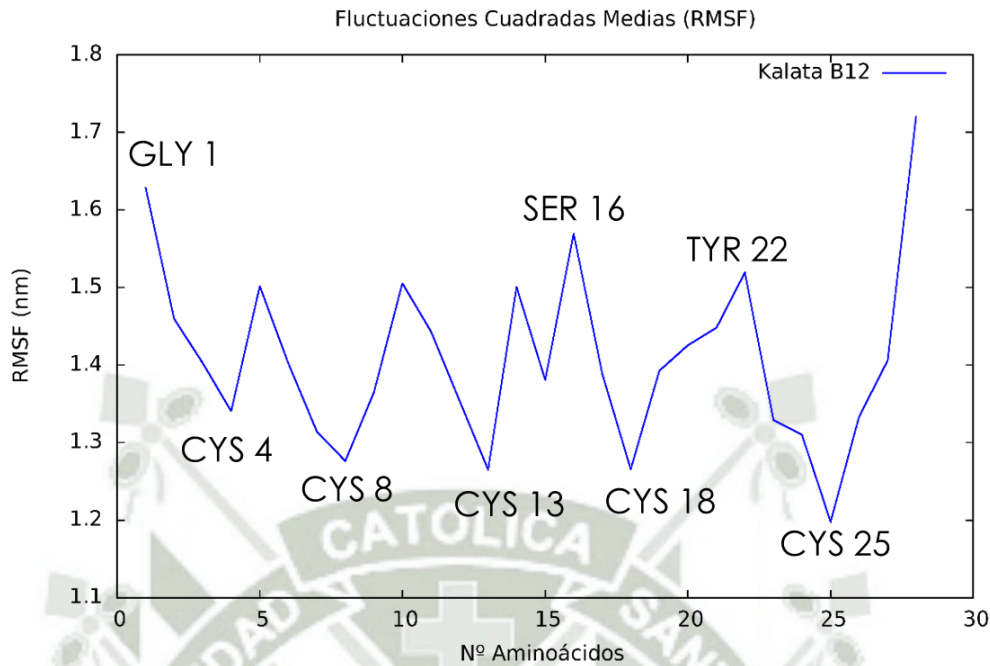
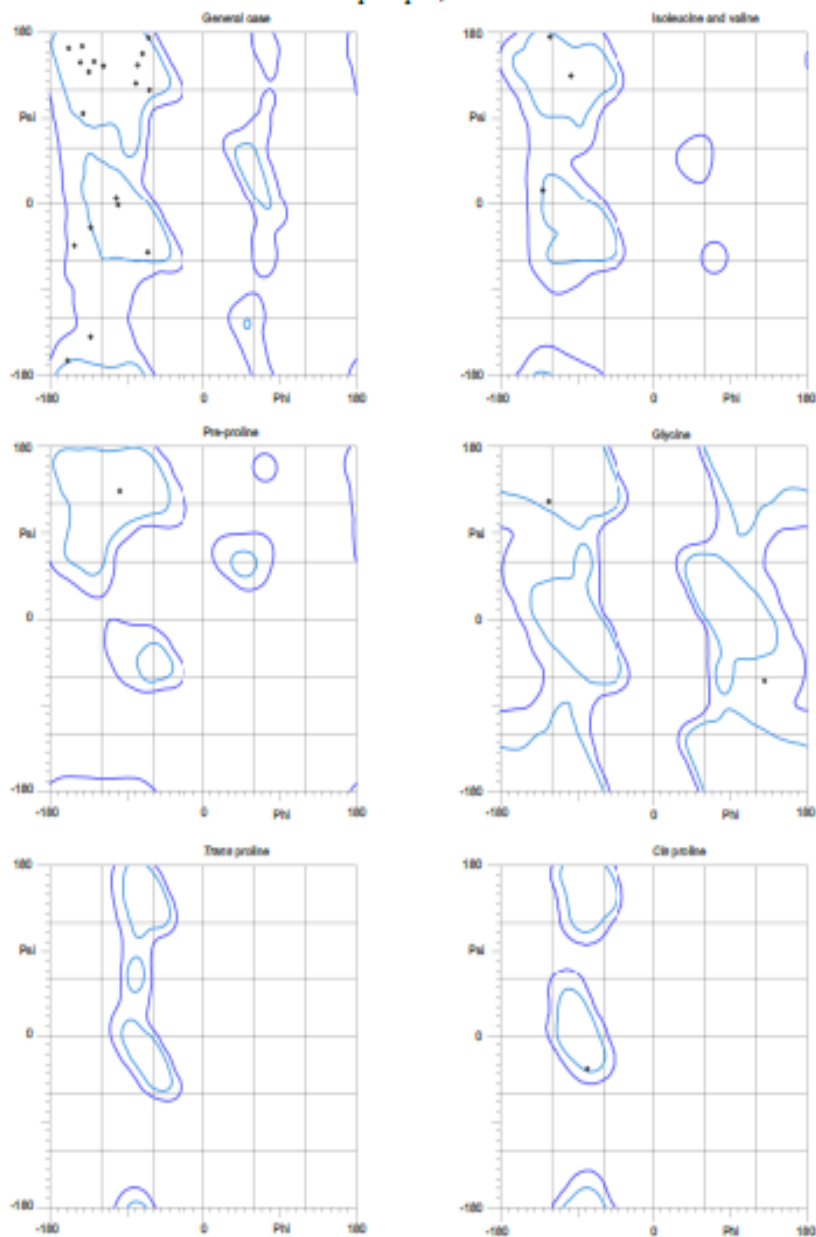


Figura 3.29. Fluctuaciones de los aminoácidos de la Kalata B12.

El diagrama ramachandran de la Kalata B12 (Figura 3.30), nos permitió definir que el ciclótido Kalata B12 fue uno de los mejores modelos, el porcentaje de aminoácidos en regiones favorecidas es de 100%, indicando la aproximación más cercana al modelo experimental, este caso no se repite en los modelos de Kalata B1 y Kalata B7 a pesar de que pertenecen a la misma familia, un claro detalle es de los 6 aminoácidos de cisteínas presentes en la Kalata B12, 5 se posicionan en los valles y solo 1 se encuentra en una región media o de actividad regular, manteniendo sus regiones conservadas estables y ayudando a la proteína a tener una adecuada distribución y posición de sus aminoácidos en el diagrama ramachandran en comparación a sus anteriores.

MolProbity Ramachandran analysis

kb12-pr-1.pdb, model 1



80.8% (21/26) of all residues were in favored (98%) regions.

100.0% (26/26) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were no outliers.

Figura 3.30. Diagrama Ramachandran de la Kalata B12.

3.2.3.4. Ciclótido Cycloviolacin O22

El ciclótido Cycloviolain O22, posee 29 aminoácidos y pertenece a la especie *Palicourea tetragona*, su estructura terciaria solo posee loops (Figura 3.32), la posición de sus cisteínas es similar a la posición de las Kalatas siendo CYS5-CYS19, CYS14-CYS26 y CYS21-CYS9 (Figura 3.31).

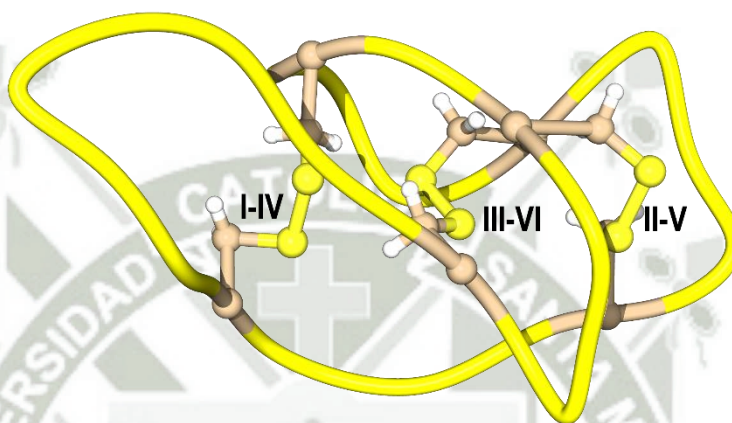


Figura 3.31. Enlaces disulfuro del Nudo Cíclico de Cisteínas del Cycloviolacin O22 finalizada la dinámica molecular.



Figura 3.32. Modelo optimizado del Ciclótido Cycloviolacin O22, este modelo representa la forma circular característica de los ciclótidos.

La grafica de la Desviación cuadrática media del cicloviolacin O22 (Figura 3.33), muestra la estabilidad de la proteína durante los 200 ns, esta alcanza la estabilidad a los 2 ns y se mantiene constante a una altura de 3.5 nm.

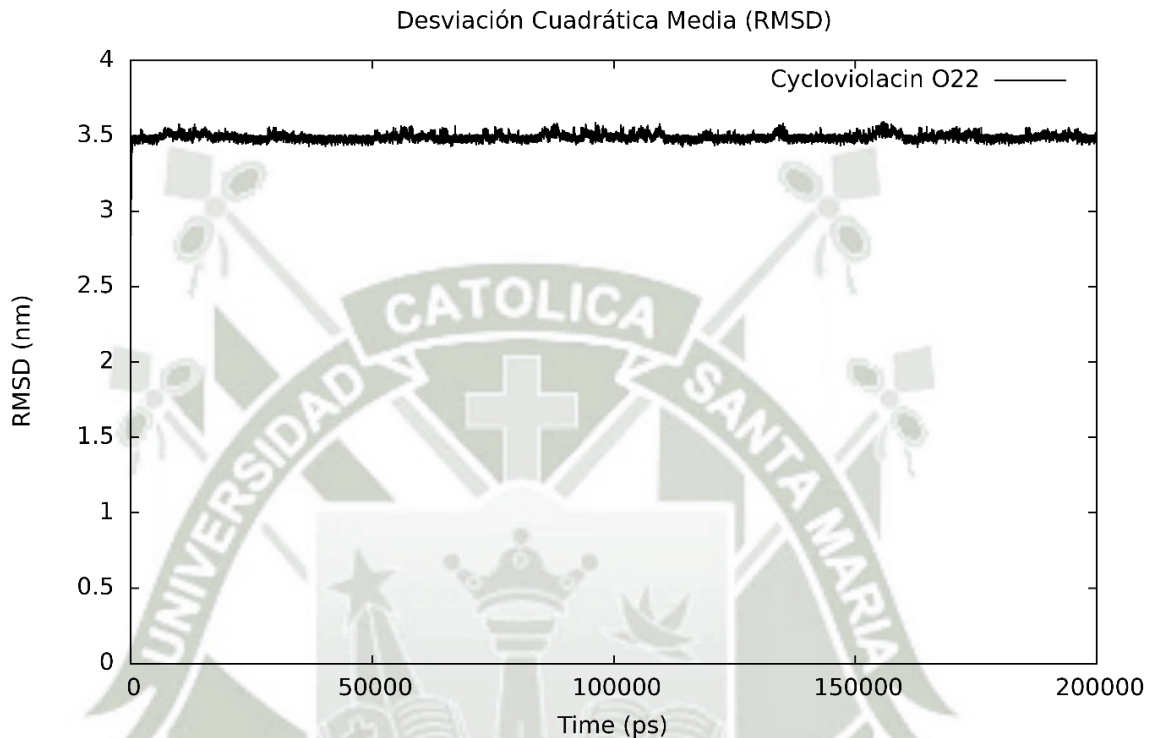


Figura 3.33. Desviación Cuadrática Media RMSD del ciclótido Cycloviolacin O22, el sistema se mantuvo estable a los 3.5 nm.

La fluctuación de los aminoácidos del Cycloviolacin O22 (Figura 3.34), muestra a dos de las 6 cisteínas que mantienen su estado conformacional, siendo la CYS9 Y CYS26, mientras que las demás CYS se encuentran en una región de actividad regular, este caso es particular ya que presenta similitudes con la Kalata B1, ya que esta última tiene a 3 CYS en regiones poco variables y el Cycloviolacion O22 presenta a 2 CYS en regiones poco fluctuantes, esto afecta directamente al momento de realizar el diagrama ramachandran ya que la estructura a pesar de ser estable presentara uno o dos aminoácidos fuera de región, sin embargo este aminoácido no afectara directamente a la estructura.

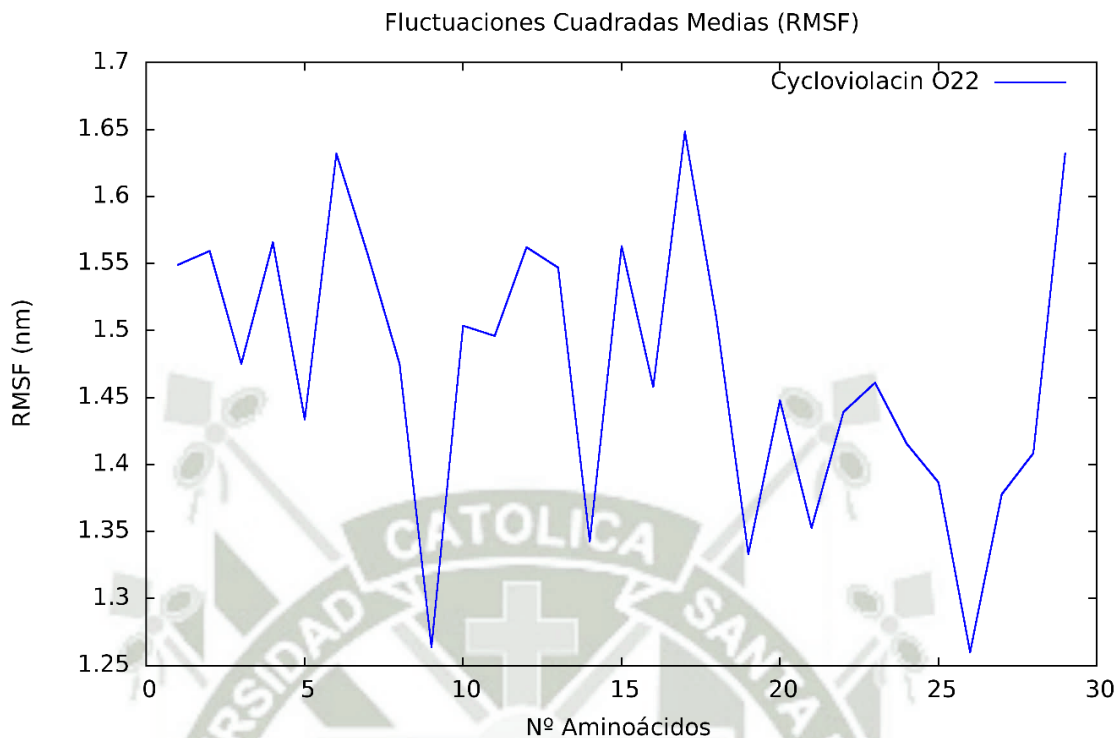


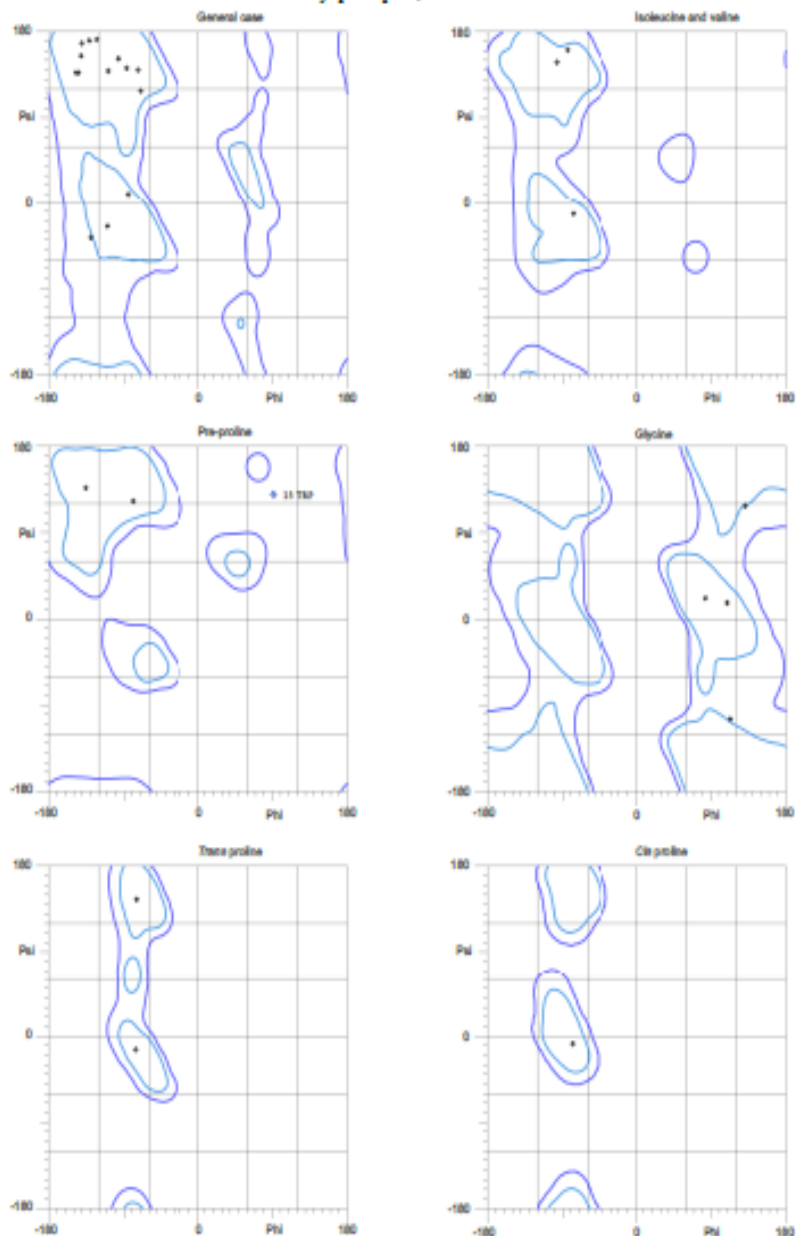
Figura 3.34. Fluctuaciones de los aminoácidos de la Cycloviolacin O22.

El diagrama Ramachandran del Cycloviolacin O22 (Figura 3.35) contiene el 98% de aminoácidos en regiones favorecidas, siendo solo el Triptófano23 el único aminoácido que se encuentra fuera de las regiones, debido a la fluctuación de su cola externa conformada por un grupo Indol, esta misma actividad la presenta la Kalata B1, puede darse por la presencia del grupo Indol o por la relación que existe entre el posicionamiento de los residuos de cisteína en la gráfica de las fluctuaciones de aminoácidos RMSF.

Esta fluctuación afecta directamente a los ángulos de torsión del aminoácido TRP23, ya que en el diagrama ramachandran se observa las coordenadas positivas (91.1, 131.7) que demuestran que a nivel estructural este aminoácido sufrió cambios, puede deberse a la región hidrofóbica o al propio comportamiento del triptófano.

MolProbity Ramachandran analysis

cy-pr-8.pdb, model 1



88.9% (24/27) of all residues were in favored (98%) regions.
96.3% (26/27) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were 1 outliers (phi, psi):
23 TRP (91.1, 131.7)

Figura 3.35. Diagrama Ramachandran de la Cycloviolacin O22.

3.2.3.5. Ciclótido Palicourein

El Ciclótido Palicourein, tiene 37 aminoácidos siendo este el Ciclótido más grande de todos, por lo tanto, la posición de sus residuos de cisteína es variables respecto a los demás, siendo sus posiciones CYS24-CYS6, CYS34-CYS16 Y CYS 26-CYS10 (Figura 3.36), en tanto a su estructura terciaria presenta dos laminas beta amiloides que empiezan en ARG11 y LEU33 respectivamente (Figura 3.37). El Ciclótido Palicourein pertenece a la familia *Palicourea condensata*.

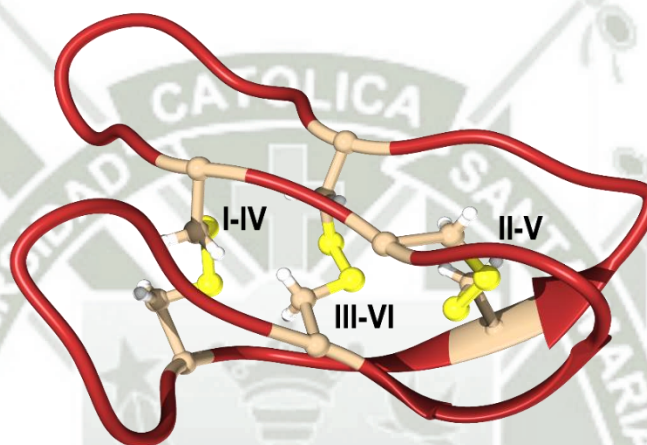


Figura 3.36. Enlaces disulfuro del Nudo Cíclico de Cisteínas del Palicourein finalizada la dinámica molecular.



Figura 3.37. Modelo optimizado del Ciclótido Palicourein, este modelo representa la forma circular característica de los ciclotidos.

La desviación cuadrática media de la dinámica molecular del Palicourein (Figura 3.38) muestra como esta proteína experimenta ligeros cambios conformacionales entre 3.5 nm a 3.7 nm siendo valores muy pequeños, determinados por el acomodamiento de los átomos en la dinámica.

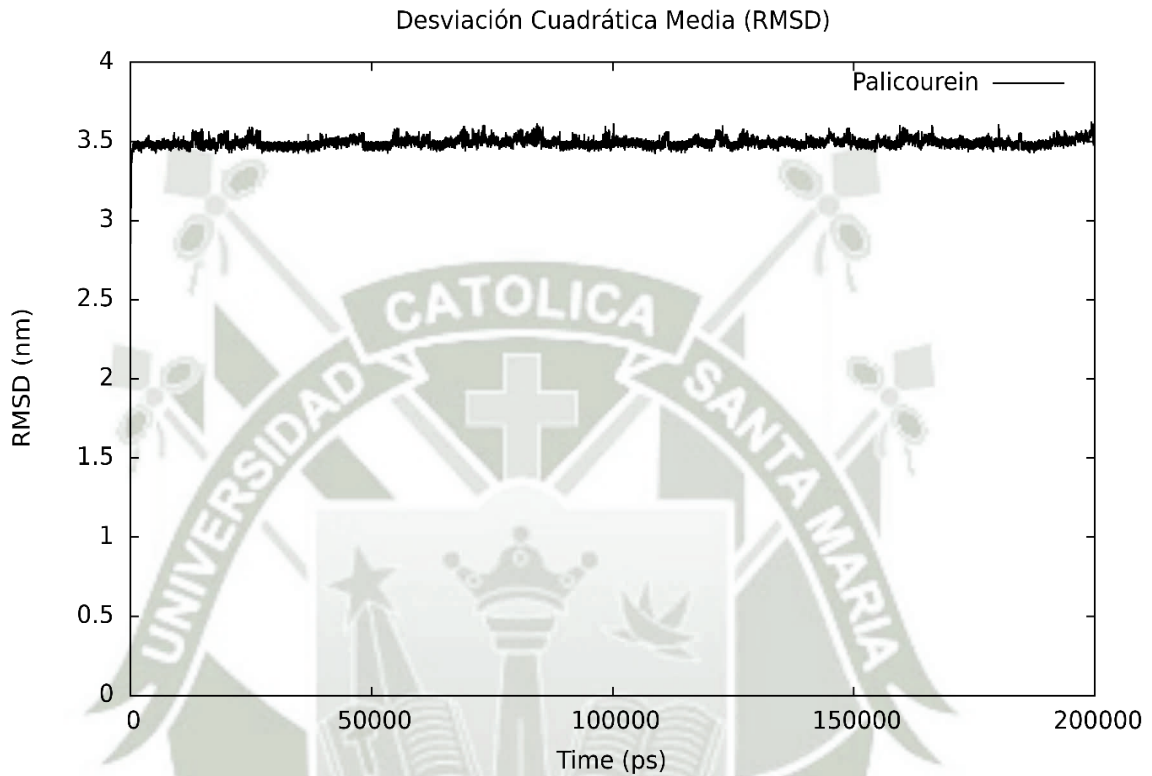


Figura 3.38. Desviación Cuadrática Media RMSD del ciclótido Palicourein.

Las fluctuaciones del ciclótido Palicourein (Figura 3.39), están en su mayoría en una región poco fluctuante, es así como los residuos de cisteínas CYS6, CYS 16, CYS34, los que menos fluctuaron, mientras que el aminoácido Tirosina18 fue el que más cambios sufrió, debido a la altura que experimenta su pico (0.4 nm) demostrando ser el aminoácido más fluctuante.

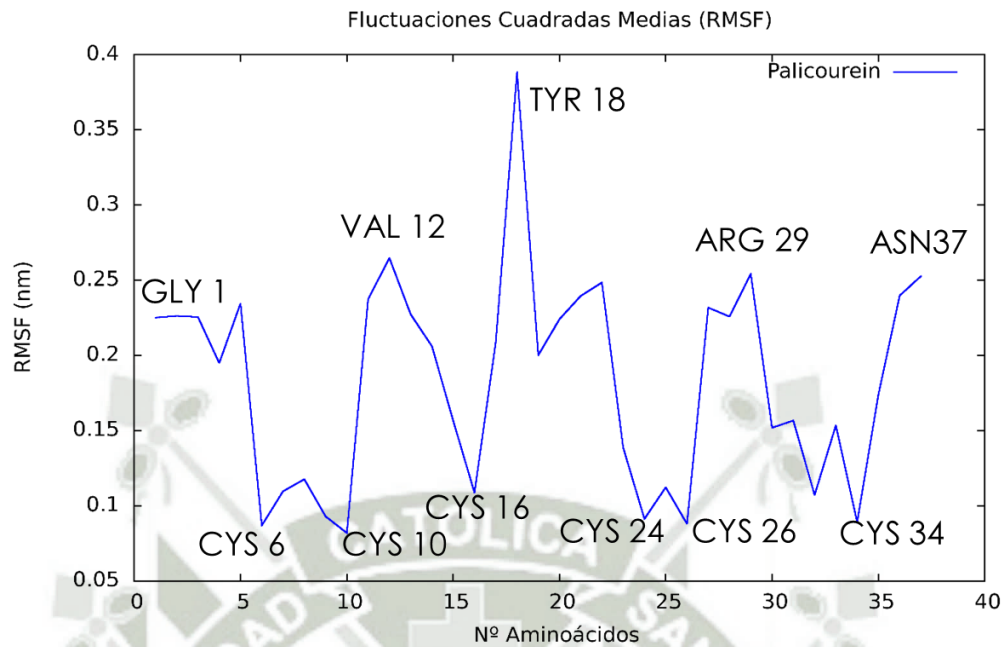
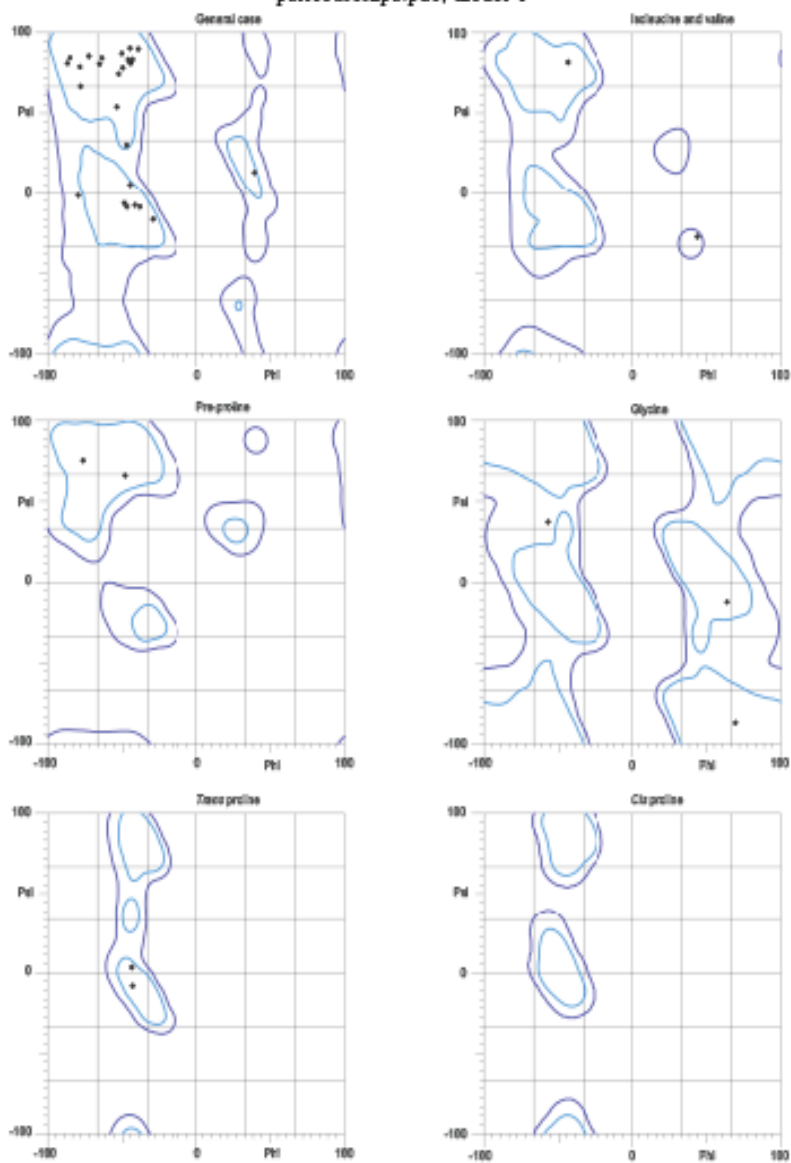


Figura 3.39. Fluctuaciones de los aminoácidos de la Palicourein.

El diagrama Ramachandran del Palicourein (Figura 3.40), expresa un porcentaje de 100% de residuos pertenecientes a regiones favorecidas, esto quiere decir que a pesar de tener a la Tirosina18 como residuo fluctuante, este no afecta directamente a la cadena principal de la proteína siendo, además la obtención de un porcentaje en el diagrama ramachandran de 100% está relacionado con las posiciones de los aminoácidos de cisteína en la gráfica RMSF, ya que en el caso del ciclótido Palicourein, este presenta los 6 residuos de CYS en las regiones poco fluctuantes, esto ayuda menormente en la conformación de la proteína, ya que estos 6 residuos de cisteína ayudan a la adecuada distribución y posicionamiento en el espacio de los aminoácidos conteniendo a la mayoría de estos en regiones poco fluctuantes y solo dejando a la TYR 18 como único aminoácido fluctuante pero que a pesar de poseer un pico alto en la Figura 3.39, no afecta en casi nada a la estructura del ciclótido Palicourein, obteniendo así un modelo optimizado que presente una elevada estabilidad y capacidad termoestable adecuado para realizar una simulación annealing.

MolProbity Ramachandran analysis

palicoureinpa.pdb, model 1



91.4% (32/35) of all residues were in favored (98%) regions.
100.0% (35/35) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

There were no outliers.

Figura 3.40. Diagrama Ramachandran de la Palicourein.

Finalizada la dinámica molecular, se calculó la energía total del sistema de los 78 ciclótidos, determinando la estabilidad estructural y confirmando la posición de las estructuras en la región mínima global energética, además que también se obtuvo la Energía potencial, Energía cinética y la Energía total de los sistemas simulados en Gromacs durante un periodo de 200 ns (Tabla 3.5), estas energías son un indicativo de los cambios que experimente el ciclótido durante la dinámica molecular, siendo los valores positivos señal de que las estructuras sufrieron un cambio en su conformación, esta cambio puede dar por la pérdida de un aminoácido o la ruptura de un enlace.

Tabla 3.5. Energías en mecánica molecular de los ciclótidos de la familia *Rubiaceae* a 309.65 K

#	Ciclótido	Energía Potencial (kJ/mol)	Energía Cinética (kJ/mol)	Energía Total (kJ/mol)
1	Kalata B1	-34.2123	-4.35461	-38.5696
2	Kalata B2	-21.0604	-10.231	-31.2913
3	Kalata B3	-90.7273	-1.21077	-91.9381
4	Kalata B4	-18.6452	-6.09697	-24.7423
5	Kalata B5	-53.2281	2.1308	-51.0974
6	Kalata B6	-44.3741	-5.08335	-49.4575
7	Kalata B7	-23.5315	-1.92851	-25.4599
8	Kalata B8	-4.01703	-5.54168	-9.5587
9	Kalata B9	-32.455	-6.46169	-38.9172
10	Kalata B10	-7.48033	-2.18491	-9.66517
11	Kalata B11	-9.63199	-3.96088	-13.5929

12	Kalata B12	-1.42317	-7.06605	-5.64292
13	Kalata B13	-38.6135	-6.39445	-45.0079
14	Kalata B14	-4.36063	-0.72829	-5.08892
15	Kalata B15	-23.8125	-4.42947	-28.2419
16	Kalata B16	-29.6079	-6.84498	-36.4529
17	Kalata B17	-57.2922	-3.04261	-60.3348
18	Kalata B18	-12.6845	-1.32104	-14.0055
19	Kalata B19	-17.8825	-2.7218	-20.6043
20	Kalata S	-24.688	-1.84086	-26.5288
21	Circulin A	-3.94458	-1.20257	-2.74201
22	Circulin B	-1.99269	-1.4434	-3.4361
23	Circulin C	-29.9247	-4.91161	-34.8362
24	Circulin D	-34.3843	-2.20932	-36.5936
25	Circulin E	-42.3626	-9.70168	-52.0643
26	Circulin F	-51.0117	-3.05689	-54.0686
27	Hcf-1	-1.32033	.8.57822	-9.89861
28	Hcf-1 variant	-10.8267	-6.477444	-17.304
29	Htf-1	-51.2898	-6.92663	-58.2165
30	Cycloviolacin-O22	-41.6088	-5.52337	-47.1322
31	Ps-1	-12.17	-2.15837	-14.3284

32	Cd-1	-9520.05	-5704.12	-15224.2
33	Vibi B	-63.183	-0.835009	-64.0174
34	Vibi G	-11.4263	-8.80717	-20.2334
35	Vibi H	-18.9526	-14.4303	-33.3829
36	Psyle A	-23.8026	-13.9627	-37.7653
37	Psyle B	-15.4062	-14.9546	-30.3608
38	Psyle C	-33.5529	-7.36059	-40.9136
39	Psyle D	-22.0032	-13.0606	-35.0638
40	Psyle E	-8.46279	-12.8875	-21.3502
41	Psyle F	-11.1998	-6.42942	-17.6292
42	Oak-6 ciclótido 1	-57.169	-2.7218	-59.9857
43	Oak-6 ciclótido 2	-99.33679	-19.4371	-118.805
44	Oak-7 ciclótido	-39.5292	-5.41139	-44.9407
45	Oak-8 ciclótido	-70.7219	-4.111559	-74.8375
46	Hedyotide B1	-5.45693	-2.18044	-7.63739
47	Hedyotide B2	-121.781	-5.02348	-126.804
48	Paragidin Br1	-9.15879	-17.6021	-26.7609
49	Caripe 1	-18.2531	-3.62431	-21.8774
50	Caripe 2	-9.12591	-4.54098	-13.6669
51	Caripe 4	0.461007	-15.4692	-15.0082

52	Caripe 6	-29.7613	-21.2388	-51.0003
53	Caripe 7	-5.69449	-11.4667	-17.1612
54	Caripe 8	-34.1949	-9.33877	-43.5336
55	Chacur 1	-30.7714	-3.81277	-34.5843
56	Psybra 1	-26.2107	-14.7852	-40.9959
57	Paltet 1	-21.1202	-0.528404	-21.6485
58	Chassatide C1	-41.2005	-3.97259	-45.1732
59	Chassatide C2	-5.97229	-0.256093	-6.22843
60	Chassatide C3	-98.936	-3.97259	-102.909
61	Chassatide C4	-12.8544	-0.664142	-13.5185
62	Chassatide C5	-22.4509	-0.578304	-23.0292
63	Chassatide C6	-31.701	-3.02486	-34.7259
64	Chassatide C7	-29.4132	-3.14378	-32.557
65	Chassatide C8	-14.3978	-1.38599	-15.7839
66	Chassatide C9	-44.8008	-4.27451	-49.0753
67	Chassatide C10	-63.5937	-3.62882	-67.2226
68	Chassatide C11	-42.1471	-3.50979	-45.6569
69	Chassatide C12	-3.06903	-1.1389	-4.20794
70	Chassatide C13	-32.8085	-3.23805	-36.0465
71	Chassatide C14	-54.6632	-0.74011	-55.4033

72	Chassatide C15	-72.4454	-7.2142	-79.6596
73	Chassatide C16	-81.4899	-9.1659	-90.6558
74	Chassatide C17	-13.7779	0.250134	-13.5278
75	Chassatide C18	-9.00907	-0.99861	-10.0076
76	Vitri A	-27.1148	-9.89266	-37.0077
77	Cyclopsychotride A	-12.1352	-4.94282	-17.078
78	Palicourein	-41.2605	-1.7274	-42.9879

En la tabla 3.5, el ciclótido CD-1 que se posiciona en el número 32, presenta una energía total de -15224.2 kJ/mol, en términos energéticos esta estructura no existe, esto se da por dos razones, la primera es que el ciclótido fue obtenido a partir de un modelamiento realizado por homología y a pesar de los modelos utilizados como el 4TTO o el 1R1F del Protein Data Bank, este no resultó en su adecuada predicción obteniendo un modelo malo, la segunda razón es que al momento de realizar la minimización de la energía, este ciclótido fue direccionado hacia el infinito, sin poder llegar a un mínimo global y disparándose a datos imaginarios.

3.3 Minimización a nivel de mecánica cuántica

La minimización a nivel mecánica cuántica se realizó utilizando el sistema total y no solo los enlace disulfuro, ya que la proteína cíclica posee ~30 aminoácidos siendo considerada una proteína pequeña (Figura 3.41), esta optimización a nivel cuántico nos permitió definir la adecuada distribución en el espacio de los átomos que conforman el ciclótido, siendo en su mayoría un aproximado de 279 a 349 átomos, además la obtención de las estructuras cuánticas permite obtener una carga más precisa durante el análisis del potencial electrostático .

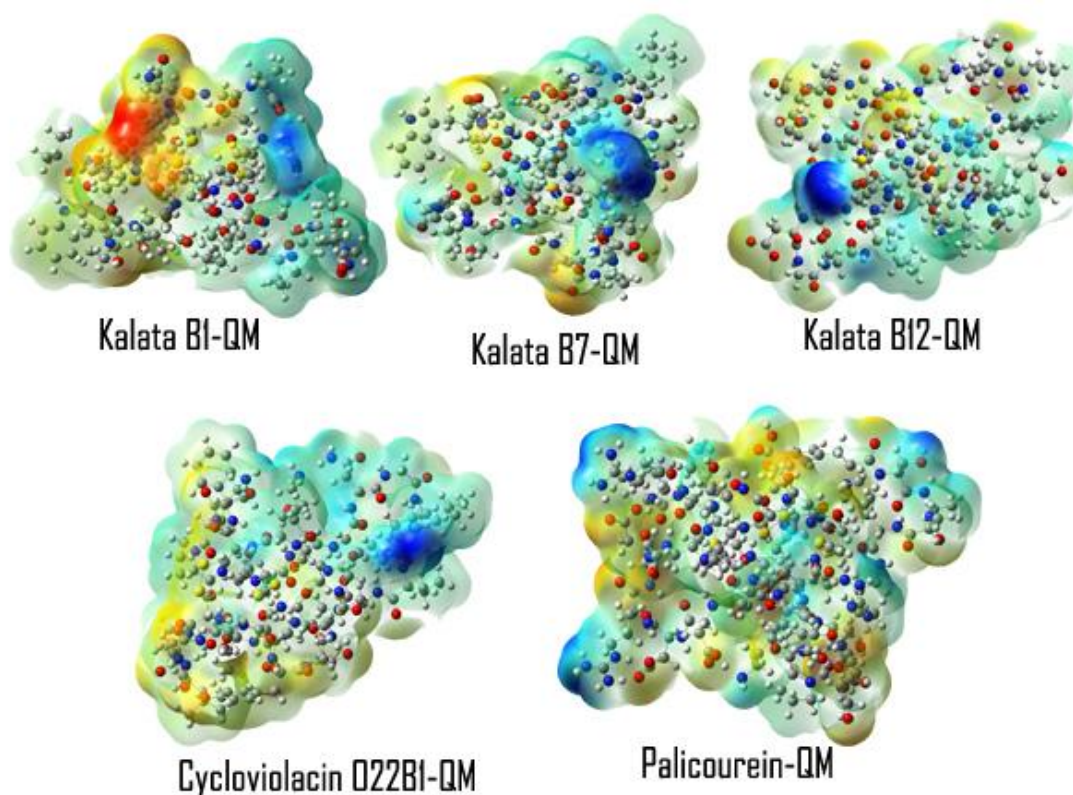


Figura 3.41. Estructuras minimizadas en QM utilizando el software deMon2k.

3.4. Estabilidad térmica de los ciclótidos en la simulación annealing

Los resultados de las simulaciones del “annealing a 309 K” de los ciclótidos KalataB1, KalataB7, KalataB12, CycloviolacinO22 y Palicourein nos muestra la fluctuación de las proteínas cíclicas que se mantuvo entre 3 y 4 nm indicando la estabilidad que poseen las estructura, además se puede observar que la proteína mantuvo el equilibrio a los 0.3 ns y permaneció constante sin presentar grandes cambios configuraciones hasta los 50 ns. (Figura 3.42)

Annealing 309 K

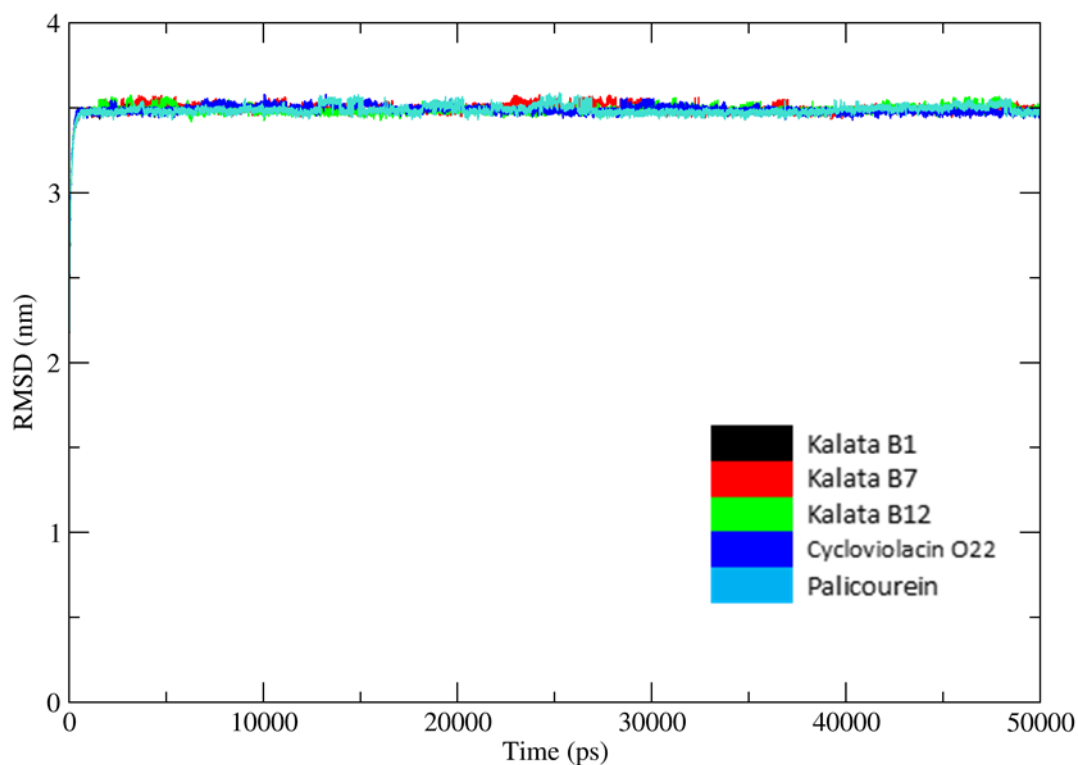


Figura 3.42. Annealing de los ciclótidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein a una temperatura de 309 K.

En la figura 3.43 se observan los cambios configuracionales de la proteína para alcanzar la estabilidad entre los ciclótidos, es así que en la región de 0 a 7 ns se observó como la Kalata b12 aumenta su fluctuación de 3.45 a 3.55 nm y manteniéndose en ese estado de 1.5 a 5 ns en la trayectoria, un patrón similar presenta el Ciclótido Kalata B7 de 2.5 a 5.4 ns mientras que el Cycloviolacin O22 solo presenta una leve fluctuación de 3.50 a 3.55 nm de 2 a 2.5 ns.

Annealing 309 K

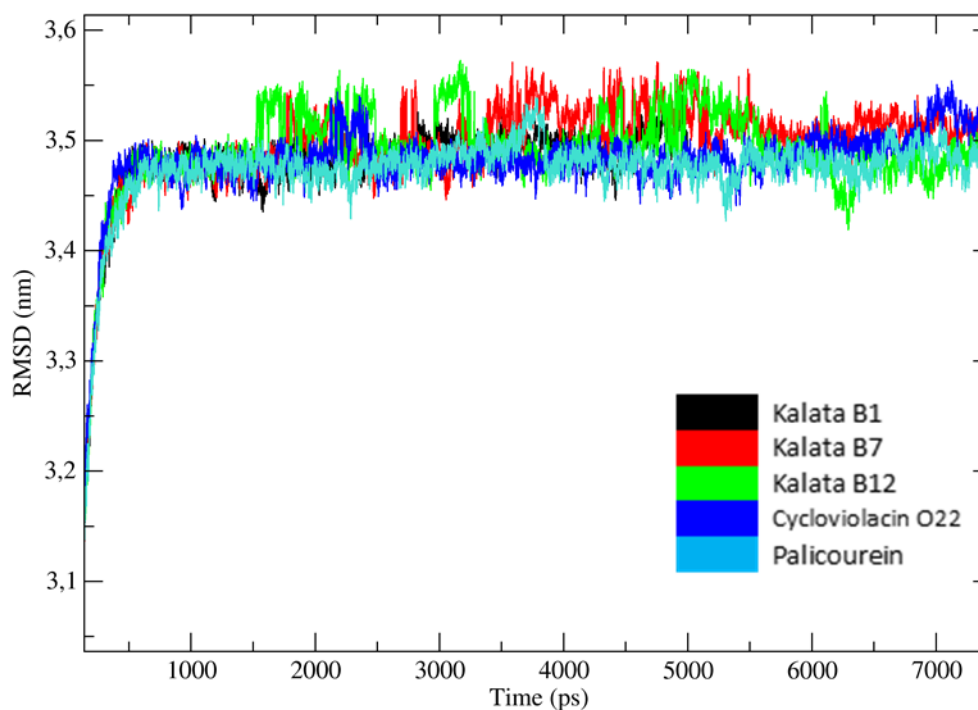


Figura 3.43. Annealing de los ciclótidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein de 0 a 7.5 ns.

La figura 3.44 nos muestra la obtención del RMSD de la dinámica Annealing a una temperatura de 399 K, manteniendo una fluctuación de las proteínas cíclicas de 3 a 4 nm y manteniendo una estabilidad desde los 0.6 ns, hasta presentar pequeñas fluctuaciones, estas variaciones se dan por la elevación de la temperatura y por el aumento de la entropía que experimenta la proteína, ocasionando la fluctuación o movimiento del residuo triptófano, provocado por su grupo indol ubicado en la región externa hidrofóbica, sin embargo los enlaces intermoleculares no presentaron cambios y se mantuvieron estables a pesar de la elevada temperatura confirmando la elevada estabilidad estructura y resistencia térmica que poseen las estructuras cíclicas.

Annealing Ciclotidos 399 K

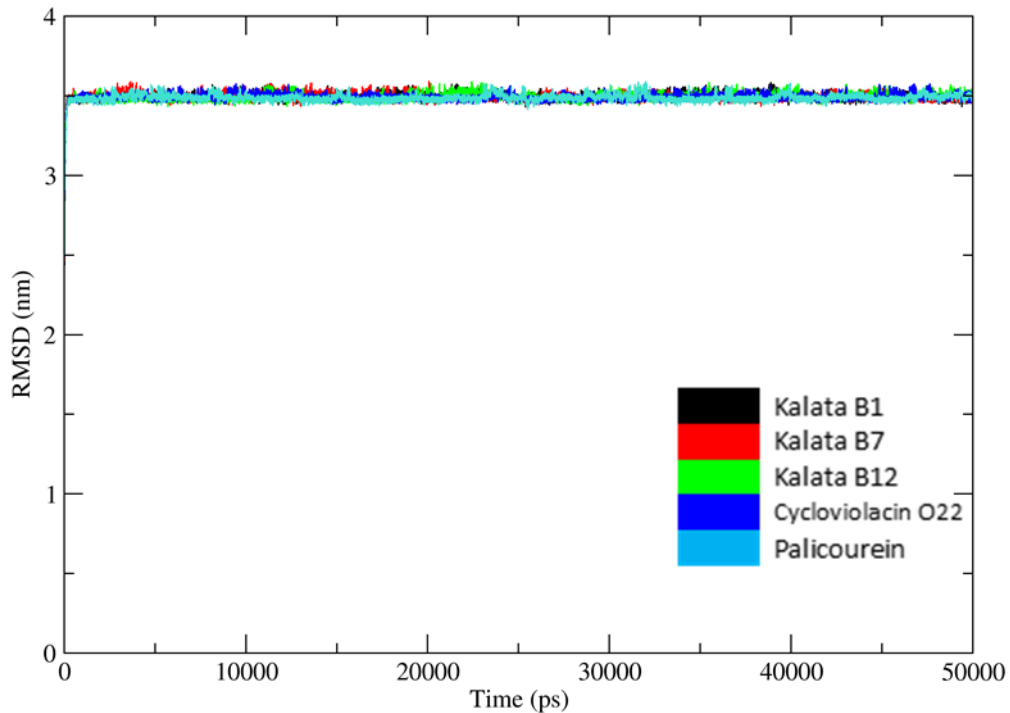


Figura 3.44. Annealing de los ciclotidos Kalata B1, Kalata B7, Kalata B12, Cycloviolacin O22 y Palicourein a una temperatura de 399 K.

La kalata B1 experimenta cambios a medida que va subiendo la temperatura (Figura 3.45), siendo la temperatura 399.65 K el valor donde la kalata b1 experimenta un salto de 0.4 nm a 0.6 nm en su conformación, pero sin afectar a la estructura, ya que no excede el 1.5 nm valor que indicaría la desnaturalización de la proteína.

La kalata B7 experimenta un salto en su dinámica annealing (Figura 3.46), este salto se produce a una temperatura de 399.65 K desde los 0.2 nm a 0.6 nm, evidenciando el efecto de la temperatura en la proteína, sin embargo, se encuentra en las distancias permitidas de fluctuación, pero claramente indica que la kalata B7 sufre cambios conformacionales en sus aminoácidos siendo los más afectados los de su cara externa.

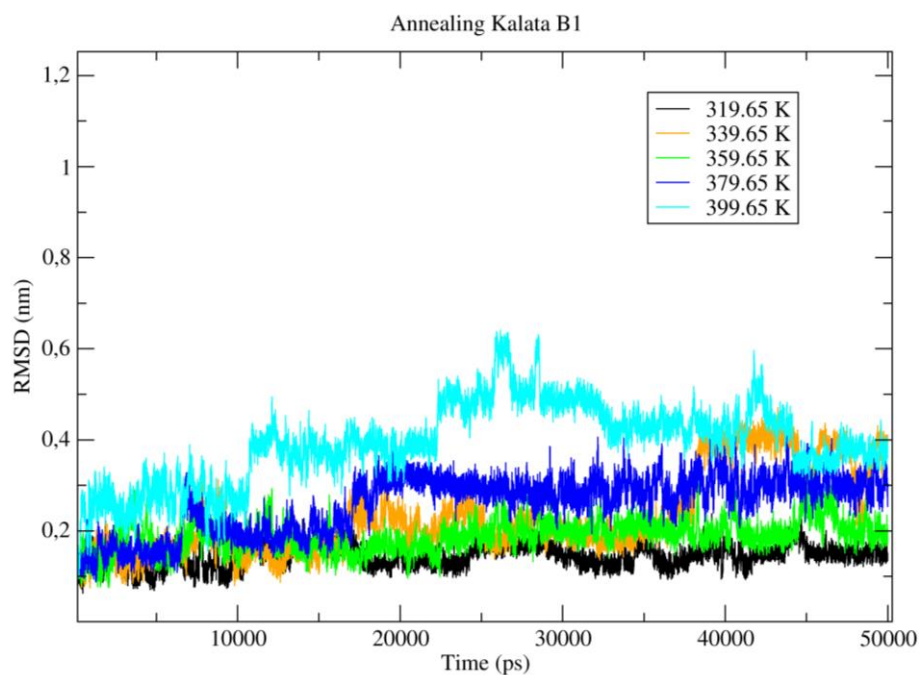


Figura 3.45. Annealing del Ciclótido Kalata B1.

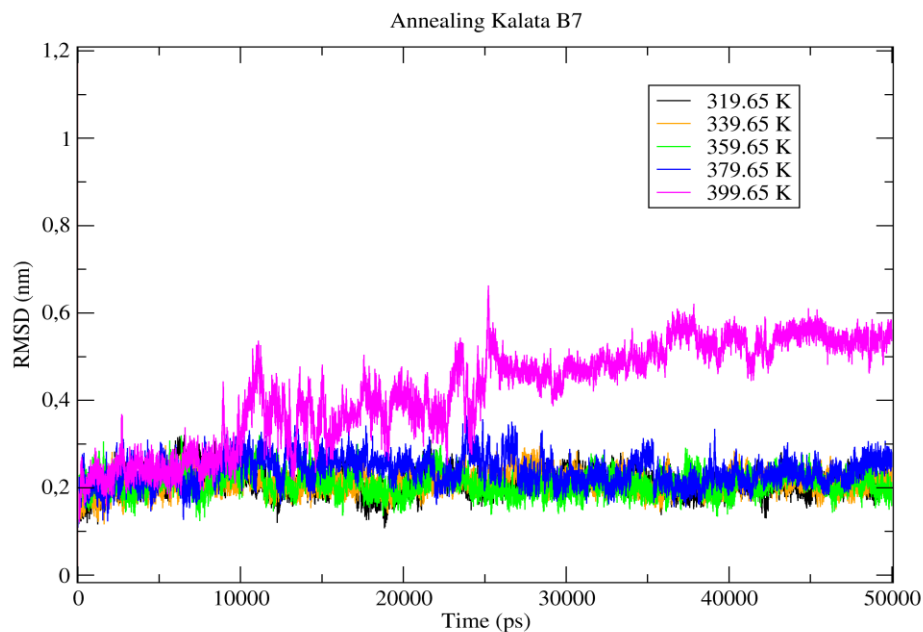


Figura 3.46. Annealing del Ciclótido Kalata B7.

El annealing en la Kalata B12 (Figura 3.47), muestra como la temperatura afecta a la proteína a los 20 ns de iniciada la dinámica molecular, remarcando que cada una de estas estructuras sufre un salto conformacional que van desde los 0.2 a 0.5 nm, indicando la influencia de la temperatura en una trayectoria de dinámica molecular.

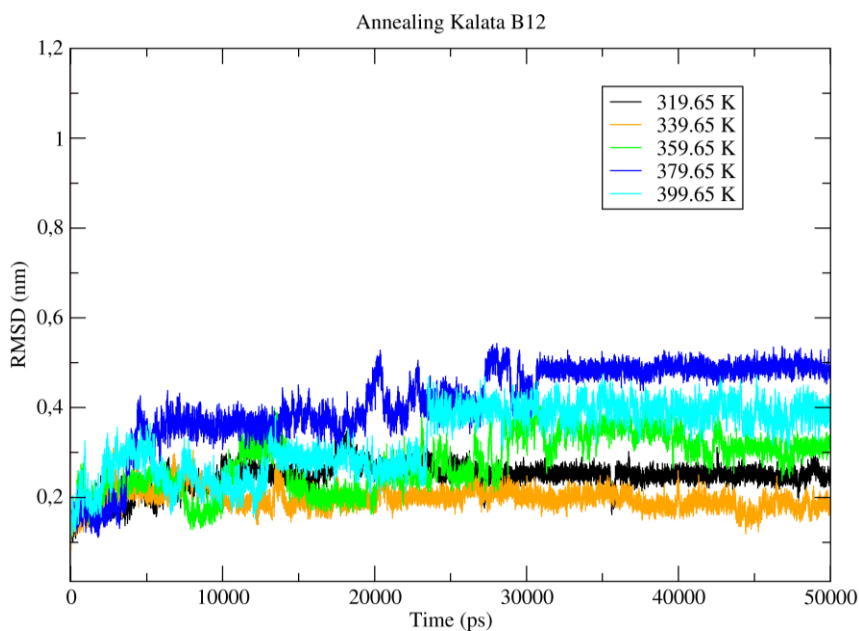


Figura 3.47. Annealing del Ciclótipo Kalata B12.

El annealing de ciclótido Cycloviolacin O22 (Figura 3.48), muestra los constantes saltos que sufre la proteína, estos saltos inician desde los 5 ns y son desde los 0.1 nm hasta 0.4 nm.

El annealing del ciclótido Palicourein (Figura 3.49), muestra el cambio de la proteína a los 10 ns de iniciada la dinámica molecular, este cambio se da a una temperatura de 399.65 K y presenta un salto de 0.2 a 0.4 nm.

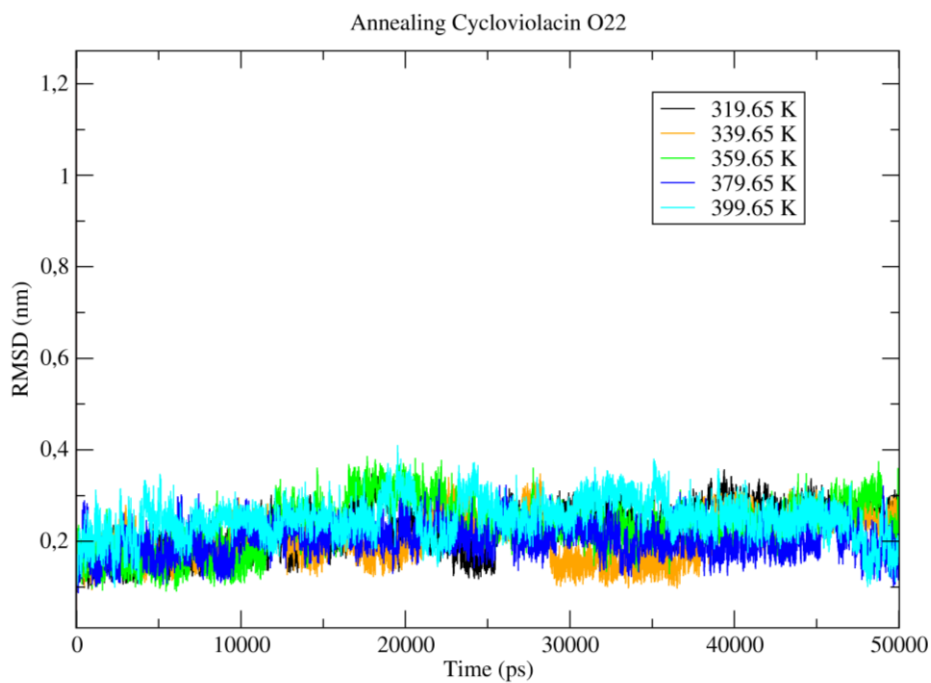


Figura 3.48. Annealing del Ciclótido Cycl violacin O22.

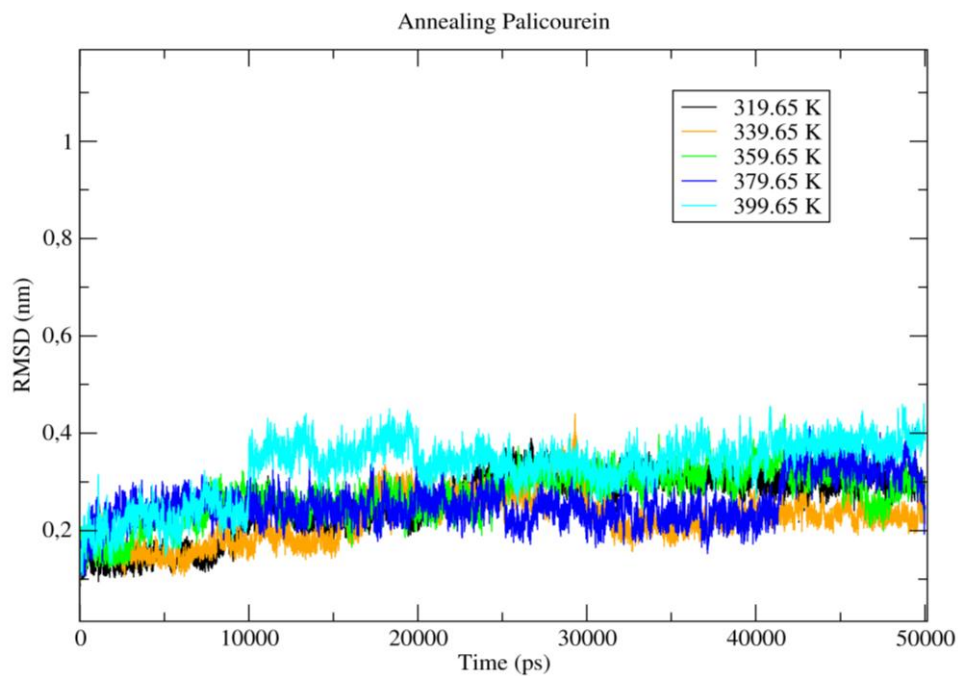


Figura 3.49. Annealing del Ciclótido Palicourein.

3.4.1 Análisis de los enlaces disulfuro, RMSD y RMSF

Tabla 3.6. Indicadores analizados. Los valores de los RMSDs, RMSFs se obtuvieron a lo largo de toda la simulación y están dadas en nanómetros. Las S-S Distance son el promedio de las distancias de los tres puentes disulfuro presentes en las estructuras (en Angstroms). Las estructuras superimpuestas son comparadas con la estructura a temperatura de 309.65K (RMSD_{supimp}). El RMSD de la superposición está dado en Angstroms

Descriptor	Cyclotide				
	Kalata B 1	Kalata B 7	Kalata B 12	Cycloviolacin	Palicourein
309.15 K					
RMSD	0.14±0.02	0.21±0.03	0.25±0.03	0.23±0.05	0.26±0.07
RMSF	1.39±0.12	1.51±0.16	1.38±0.10	1.38±0.08	1.58±0.16
S-S Distance	2.03±0.02	2.05±0.03	2.05±0.05	2.06±0.01	2.03±0.06
319.15 K					
RMSD	0.14±0.02	0.21±0.03	0.25±0.03	0.23±0.05	0.26±0.07
RMSF	1.39±0.12	1.51±0.16	1.38±0.10	1.38±0.08	1.58±0.16
S-S Distance	2.06±0.02	2.03±0.05	2.00±0.01	2.01±0.06	2.04±0.03
RMSD _{supimp}	0.935	0.940	1.109	1.307	1.267
339.15 K					
RMSD	0.23±0.09	0.21±0.02	0.20±0.02	0.21±0.05	0.22±0.05
RMSF	1.39±0.13	1.44±0.12	1.44±0.11	1.33±0.12	1.55±0.14
S-S Distance	2.03±0.02	2.04±0.04	2.00±0.04	2.02±0.05	2.04±0.05
RMSD _{supimp}	0.933	1.165	1.001	1.074	0.935
359.15 K					
RMSD	0.19±0.03	0.21±0.03	0.28±0.06	0.23±0.05	0.27±0.05
RMSF	1.60±0.10	1.50±0.11	1.55±0.09	1.41±0.10	1.75±0.10
S-S Distance	2.11±0.05	2.05±0.04	2.04±0.04	2.04±0.05	2.05±0.02
RMSD _{supimp}	0.974	1.092	1.003	0.871	1.102
379.15 K					
RMSD	0.26±0.06	0.24±0.03	0.41±0.09	0.20±0.03	0.25±0.04
RMSF	1.66±0.10	1.58±0.09	1.50±0.13	1.49±0.13	1.53±0.11
S-S Distance	2.05±0.04	2.06±0.02	2.03±0.04	2.06±0.10	2.06±0.04
RMSD _{supimp}	0.856	1.150	1.124	0.942	0.956
399.15 K					
RMSD	0.39±0.09	0.42±0.11	0.33±0.07	0.25±0.04	0.33±0.06
RMSF	1.70±0.09	1.56±0.13	1.48±0.11	1.55±0.09	1.31±0.13
S-S Distance	2.04±0.04	2.02±0.02	1.99±0.05	2.01±0.08	2.05±0.01
RMSD _{supimp}	1.005	1.051	0.924	0.964	1.049

Los ciclótidos Cycloviolacin O22 y Palicourein fueron los que presentaron una mayor estabilidad en el rango de temperaturas estudiado. En el caso del Cycloviolacin O22, la estructura a 399K fue la que presentó el RMSD promedio más alto con un valor de 0.25 ± 0.04 nm, siendo también la estructura con mayor fluctuación de sus residuos (1.55 ± 0.09). La elongación del enlace II-V fue la mayor a esta temperatura con un valor promedio de 2.10 Å. A 379K se presentó la distancia promedio más grande en este ciclótido con un valor de 2.06 ± 0.10 Å debido a que el enlace I-IV elongo hasta una distancia de 2.17 Å. Para el ciclótido Palicourein, las estructuras convergen a partir de los 10 ns. La estructura menos estable es a 399K presentando un RMSD promedio de 0.33 ± 0.06 nm. Con una distancia promedio de 2.05 Å en los enlaces disulfuro, es interesante notar que es la estructura que presentó la menor fluctuación por residuos a las temperaturas analizadas (1.31 ± 0.13 nm). La estructura que presenta la mayor fluctuación es a 359K con un valor de 1.75 ± 0.10 nm siendo la más alta de todas las estructuras analizadas.

3.4.2 Análisis del efecto de la temperatura en las estructuras de los ciclótidos

En este análisis, el efecto de la temperatura en la forma estructural de los ciclótidos es estudiada por medio de las superposiciones. El análisis se ha realizado tomando solo a los átomos C_{α} de los residuos que conforman las estructuras. En el ciclótido Kalata B1 (Figura 3.50 (a)), la estructura a 399K tiene el valor $RMSD_{supimp}$ más alto (1.005 nm), lo que corresponde al análisis previo. Este valor se debe al desplazamiento de los residuos que conforman la unión del ciclótido (Arg28 - Val4), los cuales pliegan hacia afuera de la estructura a 309K.

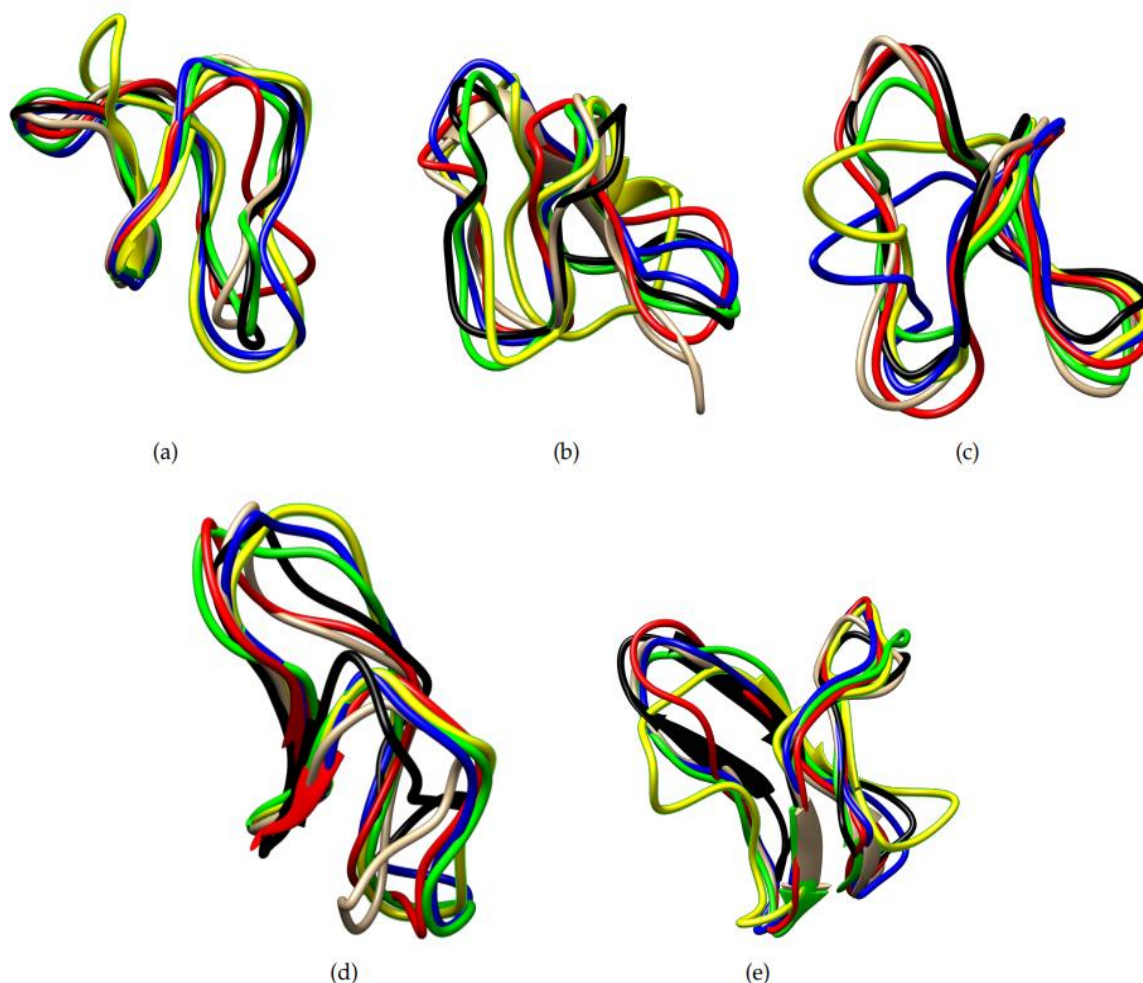


Figura 3.50. Estructuras superpuestas de los ciclótidos estudiados. (a) Kalata B1, (b) Kalata B7, (c) Kalata B12, (d) Cycloviolacin O22 y (e) Palicourein. Los colores corresponden a las temperaturas analizadas: café, 309.65K; negro, 319.65K; rojo, 339.65K; verde, 359.65K; azul, 379.65K y amarillo, 399.65K.

Para el Kalata B7, la superposición muestra que las hojas-beta presentes a 309K se pierden por efecto térmico, modificando el plegamiento de las estructuras. Como se mencionó previamente, a 399K se forma una α -helice. El valor más alto del $RMSD_{supimp}$ se presenta a 339K siendo de 1.165 Å, seguida de la estructura a 379K (1.150 Å). En el ciclótido Kalata B12, la estructura a 379K es la que presenta un mayor $RMSD_{supimp}$ como era esperado (1.124 Å). Esto es debido a que existe una gran cantidad de residuos que se despliegan hacia afuera de la estructura principal, estos residuos van del Asp6 hasta el

residuo Gly12. La estructura que presenta el menor valor del $RMSD_{supimp}$ es la estructura a 399K con un valor de 0.924 Å. En el Cycloviolacin O22, se presenta la estructura cuya estructura difiere en mayor valor en todos los ciclótidos estudiados. A 319K, el valor del $RMSD_{supimp}$ es de 1.307 Å, siendo los residuos Cys9 al Thr13 salen de la estructura principal. Además, se forma una hoja-beta entre los residuos Thr20 al Thr27. La formación de hojas-beta se observa también en la estructura a 339K ($RMSD_{supimp}$ 1.074 Å). En este caso, son dos las hojas-beta formadas y comprenden los residuos Thr20 al Ser22 y Val25 al Thr27. En el ciclótido Palicourein, la estructura a 309K presenta dos hojas-beta en su estructura (residuos Thr9 al Arg11 y Asp31 al Leu33). Las estructuras que presentaron los mayores valores de $RMSD_{supimp}$ fueron aquellos que conservaron ambas hojas. A 319K, el valor del $RMSD_{supimp}$ es de 1.267 Å, aunque la estructura conserva las dos hojas-beta, estas se desplazan a los residuos Val15-Ser19 y Leu22-Thr25. A 359K ($RMSD_{supimp}$ 1.102 Å) las hojas se encuentran en los mismos residuos que a 309K. Para la estructura a 399K ($RMSD_{supimp}$ 1.049 Å), la localización de las hojas se encuentra entre los residuos Cys24-Cys26 y Cys34-Arg36.

3.5 Variación de los puentes disulfuro de los ciclótidos de la familia *Rubiaceae*

Luego de la dinámica annealing se obtuvo las distancias de los puentes disulfuro de los ciclótidos de la familia *Rubiaceae*, esta distancia se encuentra en el margen de aceptación, ya que la distancia de un enlace disulfuro se encuentra $\sim 2.05 \text{ \AA}^{34}$ (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Distancias de los enlaces disulfuro a 399.65 K en mecánica molecular.

#	CICLÓTIDOS	N° AA	Enlaces disulfuro (Å)		
			I-IV	II-V	III-VI
1	kalata B1	29	2.02322	2.02633	2.05392
2	kalata B2	29	2.03718	2.03386	2.03777
3	kalata B3	30	2.02684	2.07521	1.96944
4	kalata B4	29	2.04105	2.06352	2.01544
5	kalata B5	30	2.11211	2.08981	2.00751

6	kalata B6	30	2.00255	2.03600	2.07203
7	kalata B7	29	2.05706	2.02062	2.07822
8	kalata B8	31	2.09468	2.07591	2.02487
9	kalata B9	31	2.05623	2.07012	2.08770
10	kalata B10	30	2.06192	1.99025	1.99454
11	kalata B11	29	2.02805	2.06158	2.07468
12	kalata B12	28	2.02832	2.11270	2.01559
13	kalata B13	30	2.05543	2.08641	2.03364
14	kalata B14	30	2.13253	1.98469	2.13265
15	kalata B15	29	2.12236	2.06092	2.04220
16	kalata B16	30	2.07781	2.06036	2.08264
17	kalata B17	30	2.03914	2.13160	2.01787
18	kalata B18	30	1.93585	2.05244	1.98207
19	kalata B19	30	2.05896	2.00420	2.04367
20	kalata S	29	2.00833	2.03485	2.06097
21	circulin A	30	2.07880	2.03005	2.01936
22	circulin B	31	2.12984	1.97682	1.97446
23	circulin C	30	2.02805	2.00340	1.98197
24	circulin D	30	2.02776	2.01489	1.98829
25	circulin E	30	2.01844	1.99231	2.10877
26	circulin F	29	2.02480	2.05083	1.99847
27	hcf-1	30	2.03931	2.02961	2.02783
28	htf-1	30	2.02549	2.01978	2.02901
29	cycloviolacin O22	29	2.04218	2.06012	2.06932
30	PS-1	31	1.95167	2.05441	2.08830
31	CD-1	34	2.03143	2.03148	2.02828
32	vibi B	29	2.02428	2.09764	2.03750
33	vibi G	31	2.03539	2.03499	2.03039

34	vibi H	31	2.03580	2.04123	2.02882
35	psyle A	28	2.03826	2.03049	2.03278
36	psyle B	28	2.03926	2.04375	2.03394
37	psyle C	25	2.03475	2.02233	2.02042
38	psyle D	31	2.03463	2.02973	2.03229
39	psyle E	31	2.04267	2.03590	2.03386
40	psyle F	31	2.03833	2.03091	2.03032
41	Oak6 cyclotide 1	30	1.95551	2.05088	2.09669
42	Oak6 cyclotide 2	30	2.04993	2.00721	1.95811
43	Oak7 cyclotide	29	2.02477	2.08156	2.04485
44	Oak8 cyclotide	30	2.06553	2.10129	2.03571
45	Parigidin-br1	32	2.02729	2.04012	2.02420
46	hedvotide B1	30	2.06364	2.02176	2.06739
47	hedvotide B2	29	1.99547	1.97436	2.05458
48	caripe 1	31	2.03988	2.03777	2.03541
49	caripe 2	31	2.03691	2.02736	2.03603
50	caripe 4	27	2.03521	2.03804	2.03345
51	caripe 6	28	2.03887	2.03968	2.02638
52	caripe 7	34	2.03563	2.03755	2.03482
53	caripe 8	31	2.03711	2.05266	2.03512
54	chacur 1	29	2.04269	2.03590	2.03354
55	psybra 1	29	2.03924	2.01794	2.04287

56	paltet 1	29	2.04966	2.01338	2.04051
57	chassatide C1	29	2.07543	2.02941	2.05061
58	chassatide C2	31	2.01172	2.05733	2.01906
59	chassatide C3	29	2.08945	2.05412	2.10526
60	chassatide C4	29	2.09583	2.06848	1.99404
61	chassatide C5	31	2.03512	2.04247	1.95987
62	chassatide C6	31	2.10281	2.09993	2.07282
63	chassatide C7	29	2.03580	2.01737	2.02183
64	chassatide C8	30	1.97955	2.05149	2.04438
65	chassatide C9	30	2.02657	2.10278	2.04724
66	chassatide C10	29	1.99570	1.98136	2.04697
67	chassatide C11	28	2.09067	2.01477	2.12061
68	chassatide C12	28	2.02717	2.08485	2.02670
69	chassatide C13	31	2.01678	2.11239	2.00422
70	chassatide C14	31	2.10744	2.00783	2.01328
71	chassatide C15	31	2.10148	2.03288	2.01537
72	chassatide C16	31	2.00562	1.96586	2.09146
73	chassatide C17	29	2.13518	1.98459	2.03148
74	chassatide C18	30	2.04367	2.05022	1.89222
75	palicourein	37	1.98990	1.99892	2.09411

76	cvclopsychotride A	31	2.04103	2.02062	2.03968
77	vitri A	30	2.03975	2.04885	2.04529
78	hcf-1 variant	29	2.03091	2.02161	2.03534

Para los 5 ciclótidos (Kalata B1, Kalatab7, KalataB12, Cycloviolacin O22 y Palicourein), se obtuvo la distancia a cada salto de temperatura (Tabla 3.8) obteniendo valores que oscilan entre 1.9 a 2.1 Å.

Tabla 3.8. Distancias de los enlaces disulfuro de los ciclótidos en la simulación annealing

Ciclótidos	CNK	Temperatura K									
		309.65	319.65	329.65	339.65	349.65	359.65	369.65	379.65	389.65	399.65
Kalata B1	I-IV	2.02322	2.0366	2.0397	2.0321	2.0776	2.1030	1.9387	2.0256	2.0917	2.0021
	II-V	2.05392	2.0782	1.9826	2.0114	1.9992	2.1707	2.0972	2.0200	2.0015	2.0729
	III-VI	2.02633	2.0673	2.0397	2.0603	2.0736	2.0629	2.0242	2.0941	1.9785	2.0446
Kalata B7	I-IV	2.05706	2.0518	1.9884	2.0913	2.0402	2.0141	1.9894	2.0671	2.0692	1.9939
	II-V	2.07822	2.0761	2.0042	2.0157	2.0213	2.0556	1.9969	2.0368	1.9858	2.0242
	III-VI	2.02062	1.9761	2.1347	2.0199	2.0316	2.0881	1.9880	2.0820	2.0246	2.0293
Kalata B12	I-IV	2.02832	2.0067	2.0520	1.9579	2.0815	2.0280	2.1073	1.9795	1.9617	2.0437
	II-V	2.01559	2.0073	2.0054	2.0253	2.0290	2.0202	2.1223	2.0597	1.9910	1.9429
	III-VI	2.11270	1.9894	2.0052	2.0145	2.0403	2.0850	1.9277	2.0383	2.1287	1.9840
Cycloviolacin O22	I-IV	2.04218	1.9475	2.0722	2.0477	1.9962	2.0512	1.9730	2.1698	2.0643	1.9832
	II-V	2.06932	2.0241	2.0387	1.9637	2.0556	2.0796	2.0846	1.9894	1.9752	2.1030
	III-VI	2.06012	2.0631	2.0847	2.0535	2.0298	1.9786	1.9576	2.0145	2.0337	1.9577
Palicourein	I-IV	1.98990	2.0146	2.0671	2.1039	2.0605	2.0734	2.0755	2.0870	2.0445	2.0534
	II-V	2.09411	2.0656	2.0634	2.0258	2.0646	2.0272	2.0696	2.0806	2.0112	2.0629
	III-VI	1.99892	2.0436	2.0492	2.0003	2.0064	2.0393	2.0525	2.0083	1.9959	2.0486

3.6. Evaluación del potencial electrostático de los ciclótidos

El potencial electrostático de los ciclótidos fue obtenido de las cargas de los aminoácidos y graficados dos por el visualizador Chimera, las regiones donde se experimentaron un cambio de carga desde la estructura inicial (Figura 3.50) a la estructura final (Figura 3.51), fueron en la región del enlace peptídico y en las regiones que contenían a la cisteína observando una variación de carga positiva (azul) a una carga negativa (rojo).

El análisis del potencial electrostático fue realizado a una carga de ± 2.5 , esto con el fin de poder determinar los cambios que pueden experimentar los ciclótidos ya que a cargas más elevadas como lo es ± 5 o ± 10 el cambio de cargas es muy pequeño impidiendo la identificación de estos.

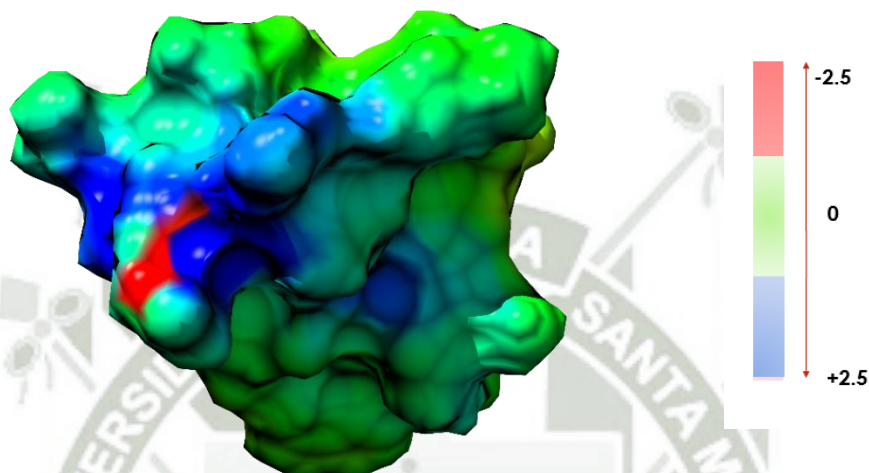


Figura 3.51. Potencial electrostático inicial del ciclótido Kalata B 1, se observa las regiones neutras en color verde y la región positiva en color azul y roja la región negativa, siendo esta última donde se encuentra el enlace peptídico terminal

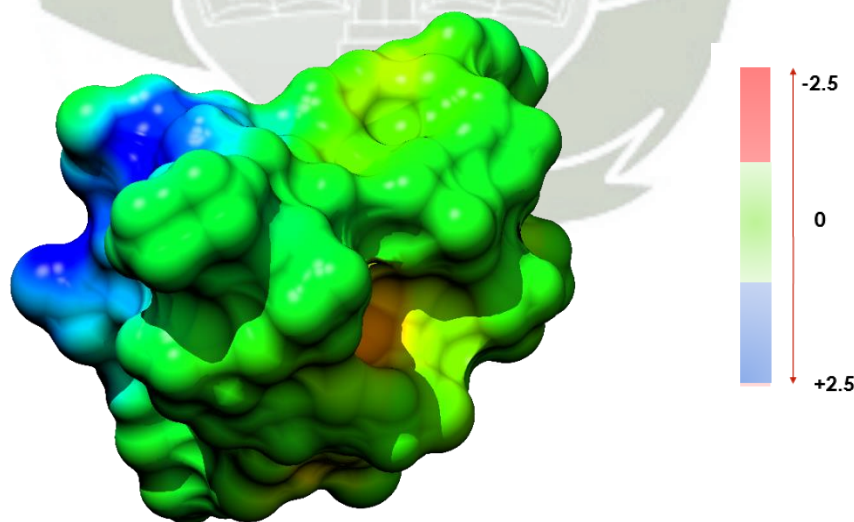


Figura 3.52. Potencial electrostático finalizada la dinámica molecular del ciclótido Kalata B1, se observa el cambio de la región rojo (negativo) a azul (positivo), este cambio se dio en la región del enlace peptídico terminal.

3.6.1 Comparación de los potenciales electrostáticos de los ciclótidos

Se realizó la comparación de las estructuras iniciales de los ciclótidos con la variación que experimenta los ciclótidos al ser sometidos a una simulación annealing.

Kalata B1

El potencial electrostático Inicial (Figura 3.52 A) presenta una carga de color positiva en el enlace peptídico terminal, esta carga de 2.0 es por la carga positiva que posee el aminoácido ARG28 de la estructura del ciclótido, sin embargo la carga de este aminoácido desaparece cuando se realizó el cálculo de la simulación annealing, las superficies electrostáticas se graficaron en Mecánica Cuántica (Figura 3.52 B), siendo esta superficie electrostática más uniforme, las cargas positivas en azul representa al aminoácido Arginina28 con una carga de 0.108122 y la porción roja corresponde a la Glutamina7 con una carga de -0.11841.

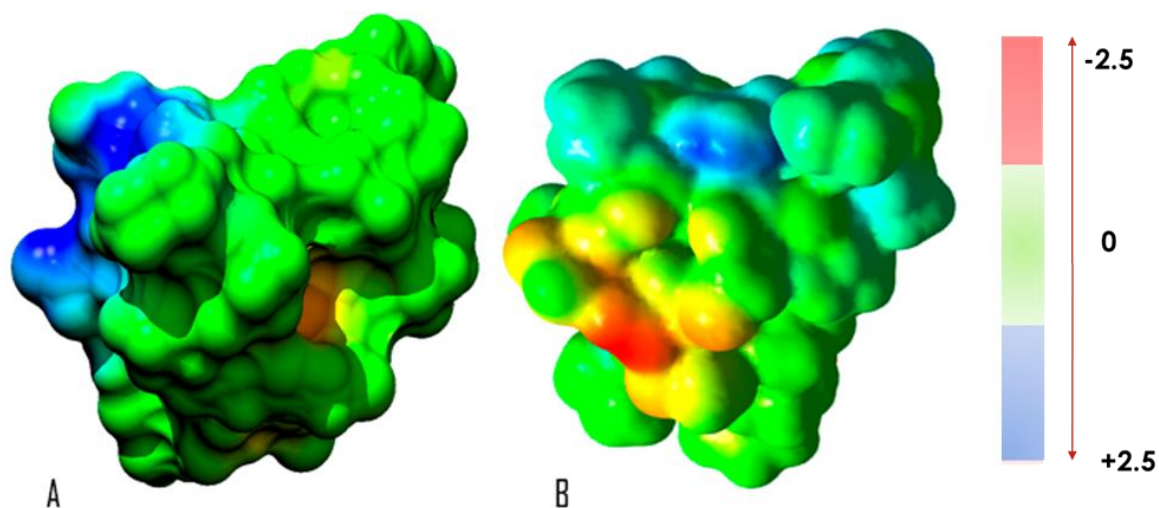


Figura 3.53. Comparación del Potencial electrostático de la Kalata B1 inicial y final respectivamente.

Kalata B7

El potencial electrostático de la Kalatab7 presenta una región positiva remarcada, esta se ubica en la unión de los aminoácidos Gly1-Asn29 (Figura 3.53 A), definiendo su carga de

2.5 en su estado inicial, mientras que el potencial electrostático final presenta la variación de cargas, además que la carga positiva del enlace peptídico pierde carga y solo la Arginina28 tiene una carga de 0.112695, mientras que la región amarilla representada por la Asparagina15 posee una carga -0.0829799 (Figura 3.53 B). La coloración verde representa una carga neutra y esta ronda entre 0.001 ~ 0.002.

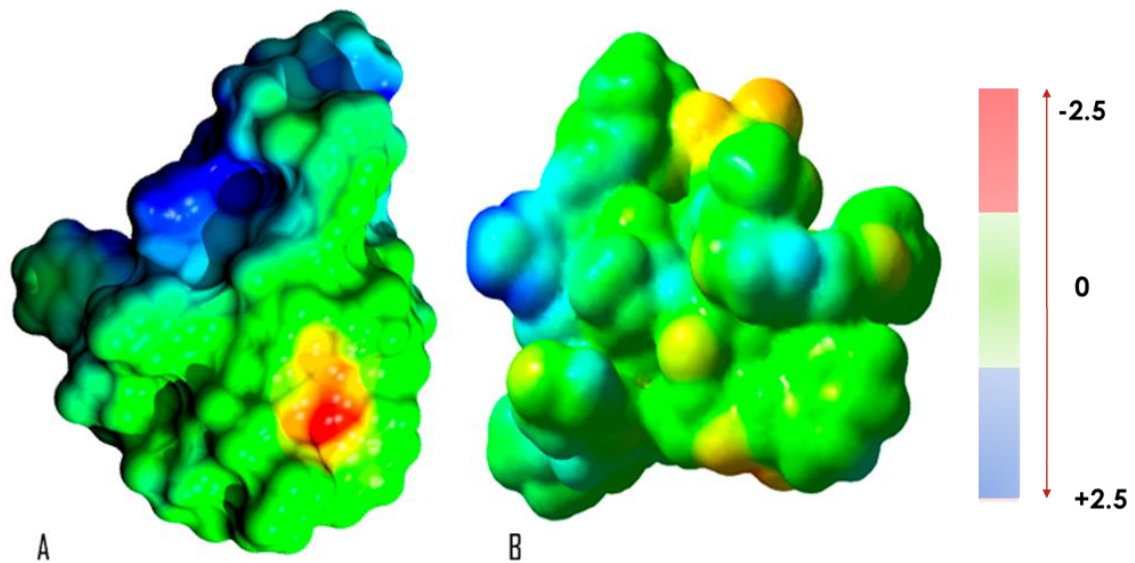


Figura 3.54. Comparación del Potencial electrostático de la Kalata B7 inicial y final respectivamente.

Kalata B12

El potencial electrostático inicial de la Kalata B12 muestra una región negativa coloreada en rojo, esta región está comprendida por las colas terminales y poseen una carga de -2.5 (Figura 3.54 A), el potencial electrostático final muestra una superficie de carga más uniforme y solo el aminoácido Lisina27 expresa una carga positiva de 0.106434 (Figura 3.54 B).

Cycloviolacin O22

La superficie de carga inicial muestra una región positiva en color rojo, esta proviene de la interacción de las colas terminales del ciclótido, la carga que posee es de -1.5 (Figura

3.55 A), la superficie de carga final muestra nuevamente una superficie de carga uniforme, solo la Arginina28 muestra una carga de color azul de 0.113612 (Figura 3.55 B).

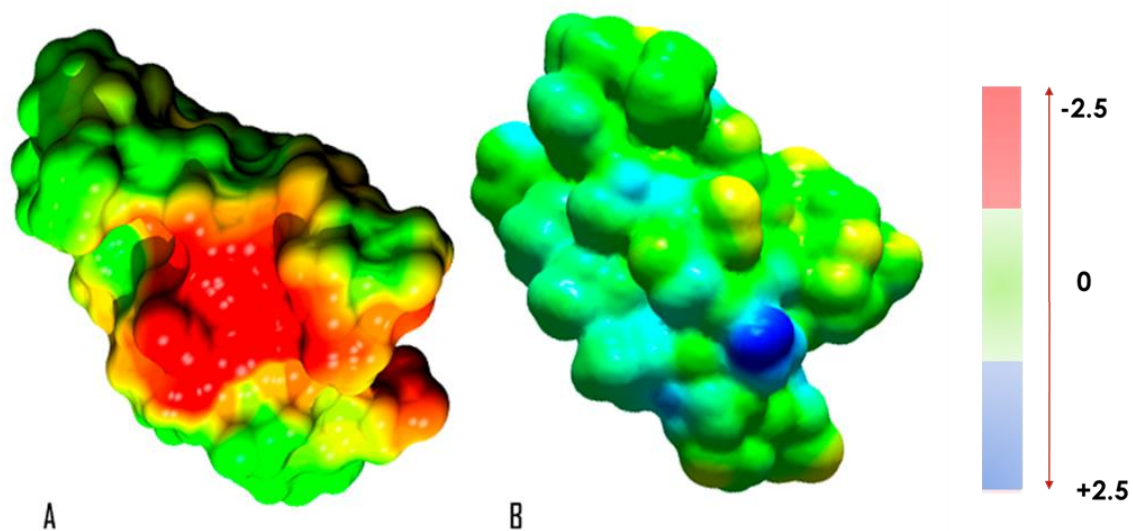


Figura 3.55. Comparación del Potencial electrostático de la Kalata B12 inicial y final respectivamente.

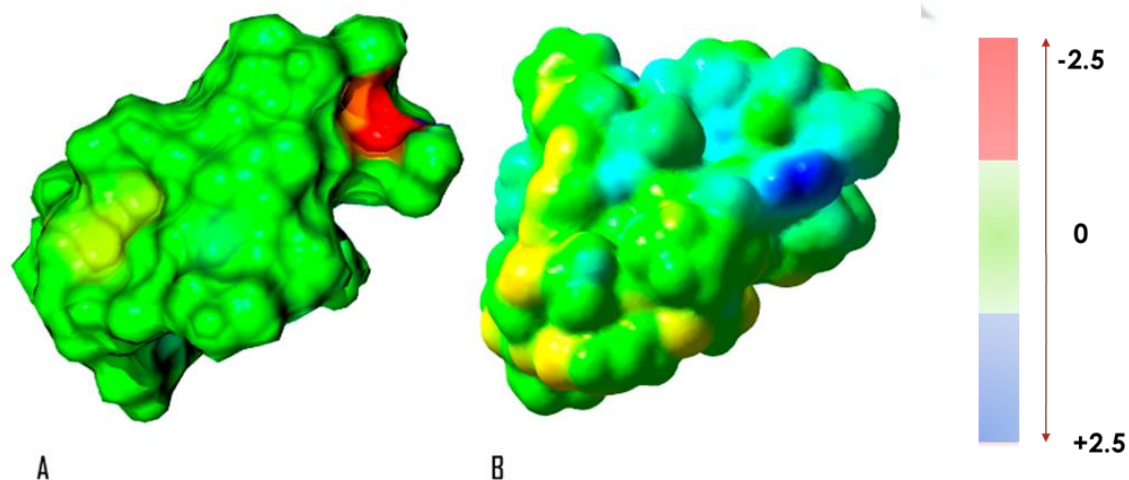


Figura 3.56. Comparación del Potencial electrostático del Cycloviolacin O22 inicial y final respectivamente.

Palicourein

El potencial electrostático del ciclótido Palicourein inicial muestra una región positiva en la interacción del enlace peptídico terminal, la carga de esta región es -1.5 (Figura 3.56 A), la superficie de carga final muestra un panorama diferente, ya que toda la proteína presenta una carga casi neutra, solo en algunas regiones se observa cargas positivas en color azul como lo es la Arginina 11 con carga 0.0746487, la Arginina29 con carga 0.0825813 y la Serina19 con carga 0.07292851, todas estas cargas bordean el 0 siendo considerada a la proteína como ligeramente positiva (Figura 3.56 B).

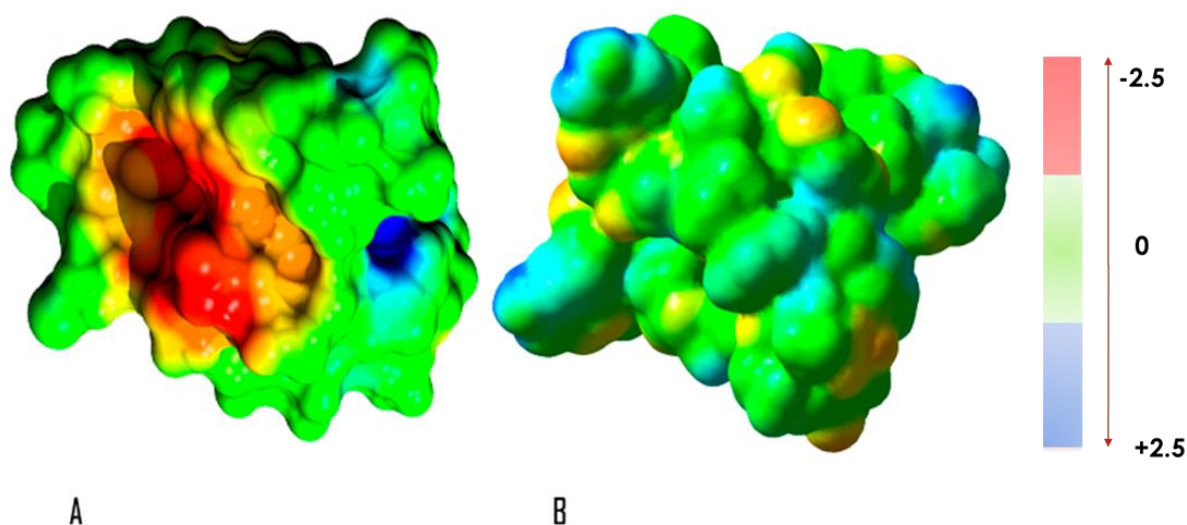


Figura 3.57. Comparación del Potencial electrostático del ciclótido Palicourein inicial y final.

3.7 Validación de las distancias de los enlaces disulfuro de las estructuras cuánticas respecto a sus modelos experimentales.

Los datos obtenidos se encuentran en la margen y se aproximan a los datos experimentales, siendo la variación de las distancias de los enlaces mínima, demostrando el acercamiento que tiene los estudios teóricos respecto a los experimentales. (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Tabla comparativa de la distancia S-S en Angstrom de enlaces disulfuro entre modelos cristalográficos del PDB, modelos en MM y modelos en MQ.

Cyclotide	Residues	Crystal (PDB)			MD			QM		
		I-IV	II-V	III-VI	I-IV	II-V	III-VI	I-IV	II-V	III-VI
Kalata B1 4TTM	29	2.037	2.025	2.045	2.023	2.026	2.054	2.085	2.097	2.077
Kalata B7 2M9O	29	2.028	2.033	2.029	2.057	2.021	2.078	2.093	2.090	2.089
Kalata B12 2KVX	28	2.028	2.033	2.029	2.028	2.113	2.016	2.094	2.078	2.089
Cicloviolacin O22 2GJ0	29	2.027	2.028	2.031	2.042	2.060	2.069	2.072	2.098	2.097
Palicourein 1R1F	37	2.027	2.029	2.028	1.990	1.999	2.094	2.082	2.081	2.080

Las distancias obtenidas a nivel de MM se acercan a los datos experimentales, siendo una variación mínima de 0.01 – 0.06 Angstrom, el mismo valor se repite en los datos obtenidos de la simulación MQ, donde todas las distancias oscilan entre 2.07 a 2.09 Angstrom, siendo la distancia real para un enlace disulfuro de 2.05 Angstrom, confirmando la capacidad de predicción del software de Mon2k y Gromacs al momento de calcular y predecir las distancias de los enlaces disulfuro.

Conclusiones

Primero. Se obtuvo las estructuras configuracionales de los ciclótidos presentes en la familia *Rubiaceae*, en formato lineal fasta y en formato PDB “Protein Data Bank”.

Segundo. Se determinó los estados fundamentales de los ciclótidos utilizando la dinámica molecular y los parámetros reportados en la guía de Gromacs, mejorando la matización de fuerzas. El modelamiento de ciclótidos es de forma particular debido a su enlace peptídico dificultando sus estudios a nivel computacional por la falta de integración en la identificación de proteínas cíclicas como lo es el visualizador VMD y el campo de fuerza Oplsaa – Gromacs.

Tercero. Gracias a la utilización del software de Mon2k se obtuvo la minimización cuántica de las estructuras de los ciclótidos, debido al tamaño de las proteínas, solo se obtuvo las estructuras cuánticas de 5 ciclótidos representativos, además de ser los más estables.

Cuarto. Se evaluó la estabilidad estructural de los ciclótidos en cada salto de temperatura de la simulación annealing 309.65 – 399.65 K.

Quinto. Se determinó la estabilidad térmica de los ciclótidos, determinadas por la variación de las distancias entre los enlaces disulfuro, estos enlaces no sufrieron variaciones en la conformación cíclica ni en el nudo cíclico de cisteínas garantizando su estabilidad térmica a 399.65 K sin sufrir ningún cambio conformacional ni estructural.

Sexto. Mediante la utilización de la herramienta de tipo APBS, se calculó el potencial electrostático de toda la estructura inicial comparándola con la estructura obtenida en la simulación annealing.

Séptimo. Se validó las estructuras mediante la utilización del visualizador GassView, comparando las distancias de los puentes disulfuros obtenidos en la MM, MQ y los Cristales Reportados del Protein Data Bank.

Bibliografías

- [1] Nascimento R, Pimenta A. New Alkaloids from *Margaritopsis carrascoana* (Rubiaceae). *J. Braz. Chem. Soc* 2015; 1152-1159.
- [2] Bremer B, Eriksson T. Time tree of rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 2009; 766-793.
- [3] Pino D, Taylor C. Rubiaceae endémicas del Perú. *Rev. Perú. Biol.* 2006; 586-599.
- [4] Perez D. Reseña de “Rubiaceae de México” de Borhidi A. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 2007; (81): 147-148.
- [5] Ireland DC, Clark RJ, Daly NL, Clark DJ. Isolation, sequencing, and structure-activity relationships of cyclotides. *Journal of natural products* 2010; 1610-1622.
- [6] Tam JP, Lu YA, Yang JL, Chiu KW. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 8913-8918.
- [7] Walton J, Hallen-Adams H, Luo H. Ribosomal biosynthesis of the cyclic peptide toxins of *Amanita* mushrooms. *Biopolymers* 2010; 94:659–664.
- [8] Contreras E, Díaz A, Dunoyer A. Cyclotides, circular proteins produced by plants with pharmacological potential. *Rev Cubana Farm* 2015; 49.
- [9] Craik D. Host-Defense Activities of Cyclotides. *Toxins (Basel)* 2012; 4: 139-156.
- [10] Park S, Strömstedt A, Göransson U. Cyclotide Structure–Activity Relationships: Qualitative and Quantitative Approaches Linking Cytotoxic and Anthelmintic Activity to the Clustering of Physicochemical Forces. *Journal Pone* 2014; 9:1430.
- [11] Wu X, Wu Y, Zhu F, Yang Q. Optimal Cleavage and Oxidative Folding of α -Conotoxin TxIB as a Therapeutic Candidate. *Marine Drugs* 2011; 14: 77-86.

- [12] Mylne J, Colgrave M, Daly N, Chanson A, Elliott A, McCallum J, Jones A, Craik D. Nat. Albumins and their processing machinery are hijacked for cyclic peptides in sunflower. *Chem. Biol.* 2011; 7: 257–259.
- [13] Sando L, Henriques ST, Foley F. A Synthetic mirror image of kalata B1 reveals that cyclotide activity is independent of a protein receptor. *Chembiochem.* 2011; 11: 2456-2462.
- [14] Mariamawit Y. Cyclotides from an Extreme Habitat: Characterization of Cyclic Peptides from *Viola abyssinica* of the Ethiopian Highlands. *J. Nat. Prod.* 2011; 11: 727-731.
- [15] Craik D. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agricultura. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010; 67: 9-16.
- [16] Alcamí M, Mó O, Yáñez M. Computational chemistry: a useful (sometimes mandatory) tool in mass spectrometry studies. *Mass Spectrom Rev.* 2001; 20: 195-245.
- [17] Burman R, Gunasekera S, Strömstedt AA, Göransson U. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. *J Nat Prod.* 2014; 77: 724-736.
- [18] Garcia A, Camarero J. Biological Activities of Natural and Engineered Cyclotides, a Novel Molecular Scaffold for Peptide-Based Therapeutics. *Current Molecular Pharmacology* 2010; 3: 153-163.
- [19] Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant* Vol 53 Gillon AD, Saska I, Jennings CV, Guarino RF, Craik DJ, Anderson MA. – *Plant J.* 505–515. 2008
- [20] Sancheti H, Camarero JA. “Splicing up” drug discovery. Cell-based expression and screening of genetically-encoded libraries of backbone-cyclized polypeptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61: 908–917.
- [21] Heidi R. Bokesch J. A Novel Anti-HIV Macrocyclic Peptide from *Palicourea condensata*. *Nat. Prod.* 2001; 64: 249-250.
- [22] Gould A, Ji Y, Aboye T, Camarero J. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug Discovery. *Curr Pharm Des* 2011; 17(38): 4294-4307.

- [23] Korsinczky M, Clark R, Craik D. 36) Disulfide bond mutagenesis and the structure and function of the head-to-tail macrocyclic trypsin inhibitor SFTI-1. *Biochemistry* 2005; 44: 1145-1153.
- [24] Burman R, Gunasekera S, Strömstedt AA, Göransson U. Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. *J Nat Prod.* 2014; 77: 724-736.
- [25] Gruber CW. Global cyclotide adventure: a journey dedicated to the discovery of circular peptides from flowering plants. *Biopolymers* 2010; 94: 565-572.
- [26] Troeira S, Huang Y. Decoding the Membrane Activity of the Cyclotide Kalata B1. *The journal of biological chemistry* 2011; 286: 24231-24241.
- [27] Wang C, Clark R, Harvey P, Rosengren K, Cemazar M, Craik D. The Role of Conserved Glu Residue on Cyclotide Stability and Activity: A Structural and Functional Study of Kalata B12, a Naturally Occurring Glu to Asp Mutant. *Biochemistry* 2011; 50: 4077-4086.
- [28] Uddin K, Warburton P, Poirier R. 85) Comparisons of Computational and Experimental Thermochemical Properties of α -Amino Acids. *J. Phys. Chem. B.* 2012; 116: 3220-3234.
- [29] Gratten, Jacob, et al. "La genómica a gran escala revela la arquitectura genética de los trastornos psiquiátricos". *Nature Neuroscience* 17.6 (2014): 782-790.
- [30] Bokesch H. 51) A Novel Anti-HIV Macrocyclic Peptide from *Palicourea condensata*. *J. Nat. Prod.* 2001; 64: 249-250.
- [31] Dornshuld E, Vergenz R, Tshumper G. Peptide bond formation via Glycine condensation in the gas phase. *J. Phys. Chem.* 2014; 118: 8583-8590.
- [32] Chemistry Libretexts, Peptidos. <https://chem.libretexts.org/>. California 2018. Disponible en: [https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Eastern_Mennonite_University/EMU%3A_Chemistry_for_the_Life_Sciences_\(Cessna\)/18%3A_Amino_Acids%2C_Proteins%2C_and_Enzymes/18.03_Peptides](https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Eastern_Mennonite_University/EMU%3A_Chemistry_for_the_Life_Sciences_(Cessna)/18%3A_Amino_Acids%2C_Proteins%2C_and_Enzymes/18.03_Peptides)
- [33] He H, Gursuy R, Kupczyk-Subotkowska L, Tian J, Williams T, Siahann T. Synthesis and chemical stability of a disulfide bond in a model cyclic pentapeptide: cyclo(1,4)-Cys-Gly-Phe-Cys-Gly-OH. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 2222-2234.

- [34] Bulleid N, Ellgaard L. Multiple ways to make disulfides. *Trends in Biochemical Sciences* 2011; 485-492.
- [35] Wedemeyer W, Welker E. Disulfide Bonds and Protein Folding. *Biochemistry* 2000; 39.
- [36] Contreras E, Díaz A, Taron A. Cyclotides, circular proteins produced by plants with pharmacological potential. *Rev Cubana Farm* 2015; 49.
- [37] Park S, Stromstedt A, Goransson U. Cyclotide Structure-Activity Relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces. *Journal Chem* 2014; 914
- [38] Clark R, Burman R, Bajona M. Interlocking disulfides in circular proteins: toward efficient oxidative folding of cyclotides. *Antioxidants & Redox signaling* 2010; 14: 77-86.
- [39] Alcamí M, Mó O, Yáñez M. Computational chemistry: a useful tool in mass spectrometry studies. *Mass spectrum Rev.* 2001; 20: 195-245.
- [40] Huang, S. Y., & Zou, X. Ensemble docking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (2007) ,66(2): 399-421
- [41] Trott, O., & Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, (2010), 31(2): 455-461.
- [42] Mach J. Cyclotides: Cyclical Miniproteins with a Cystine Knot Configuration. *The Plant Cell* 2008; 2285.
- [43] Phuong Q, Thuy T. Allotides: Proline-Rich cystine knot α -Amylase Inhibitors from *Allamanda cathartica*. *J. Nat. Prod.* 2015; 689-704.
- [44] Hanumae K, Yarotsky V. 67) Site-Specific Effects of Diselenide Bridges on the Oxidative Folding of a Cystine Knot Peptide, ω -Selenoconotoxin GVIA. *Biochemistry* 2010; 2741-2752.
- [45] Frith, Chris D., Sarah-Jayne Blakemore, and Daniel M. Wolpert. "Explaining the symptoms of schizophrenia: abnormalities in the awareness of action." *Braun Research Reviews* 31.2 (2000): 357-363.

- [46] Colgrave M, Craik D. Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot. *Biochemistry* 2004; 5965-5975.
- [47] Iozzi M, Helgaker T, Uggerud E. 65) Influence of External Force on Properties and Reactivity of Disulfide Bonds. *J. Phys Chem.* 2011; 115:2308-2315.
- [48] Karjiban R, Rahman M, Basri A, Salleh B, and Wahab H. Molecular dynamics study of the structure, flexibility and dynamics of thermostable 11 lipase at high temperatures. *The Protein Journal* 2009; 28:14-23.
- [49] Dill K, Chan H. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 1997; 10-19.
- [50] Kovacs JA, Chacón P, Abagyan R. Predictions of protein flexibility: first-order measures. *Proteins* 2004; 56:661-668.
- [51] Orozco M. 75) A theoretical view of protein dynamics. *Chemical Society Reviews* 2014; 49.
- [52] Perez A, Yang Z, Bahar I, Dill K, Maccallum J. FlexE: Using Elastic Network Models to Compare Models of Protein Structure. *Journal of chemical theory and computation* 2012; 48.
- [53] Voutilainen S, Boer H, Alapuranen M, Janis J, Vehmaanpera. 77) Improving the thermostability and activity of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase cel7b. *Applied microbiology and biotechnology* 2009; 261-272.
- [54] Missimer M, Steinmetz R, Baron F, Winkler R, Kammerer X, and van Gunsteren W. Configurational entropy elucidates the role of salt-bridge networks in protein thermostability. *Prot Sci* 2007; 1349-1359.
- [55] Veronese F, Boccu E, Schiavon O, Grandi G, and Nakajima A. 81) General stability of thermophilic enzymes: studies on 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* and yeast. *J Appl Biochem* 1984; 39-47.
- [56] Papaleo E, Riccardi L, Villa C, Fantucci P, De Gioia L. 71) Flexibility and enzymatic cold-adaptation: a comparative molecular dynamics investigation of the elastase family. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764(8):1397-406.
- [57] Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, Nishino T, and Esaki N. Improvement of thermostability of cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium

- shewanella sp. strain ac10 by rational mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis* 2003; 113-117.
- [58] Gillon AD, Saska I, Jennings CV, Guarino RF, Craik DJ, Anderson MA. Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant J* 2008; 505-515.
- [59] Sancheti H, Camarero JA. 34) “Splicing up” drug discovery. Cell-based expression and screening of genetically-encoded libraries of backbone-cyclized polypeptides. *Adv Drug Deily Rev* 2009; 908-917.
- [60] Cheneval O, Schroeder C, Durek T, Walsh P, Huang Y, Liras S, Price D. Fmoc-Based Synthesis of Disulfide-Rich Cyclic Peptides. *J Org Chem* 2014; 5538-5544.
- [61] Simonsen SM, Sando L, Rosengren KJ, Wang CK, Colgrave ML, Daly NL, Craik DJ. Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity. *J Biol Chem* 2008; 9805-9813.
- [62] Wu, Yong X, Furong W, Qiuyuan Z. Optimal Cleavage and Oxidative Folding of α -Conotoxin TxIB as a Therapeutic Candidate Peptide. *Marine drugs* 2001; 77-86.
- [63] Craik DJ, Conibear A. The Chemistry of Cyclotides. *J Org Chem* 2011; 4805-4817.
- [64] Ji Y, Majumder S, Millard M, Borra R. In vivo activation of the p53 tumor suppressor pathway by an engineered cyclotide. *J Am Chem Soc* 2013; 11623-11633.
- [65] Gerlach SL, Burman R, Bohlin L, Mondal D, Goransson U. Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*. *Journal of natural products* 2010; 1207-1213.
- [66] Nawae W, Hannongbua S, Ruengjitchatchawalya M. 47) Defining the membrane disruption mechanism of kalata B1 via coarse-grained molecular dynamics simulations. *Scientific reports* 2014; 4:3933.
- [67] Gran L., Sandberg F., Sletten K. 48) *Oldenlandia affinis* (R&S) DC. A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 2000; 197-203.
- [68] Huang Y. 45) The Biological Activity of the Prototypic Cyclotide Kalata B1 Is Modulated by the Formation of Multimeric Pores. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 20699-20707.

- [69] Nascimento R, Pimenta A, Neto P. New Alkaloids from *Margaritopsis carrascoana* (Rubiaceae). *J. Braz. Chem. Soc* 2015; 1152-1159.
- [70] Craik DJ. Host-Defense Activities of Cyclotides. *Toxins (Basel)* 2012; 139-156.
- [71] Walton J, Hallen-Adams H, Luo H. Ribosomal Biosynthesis of the Cyclic Peptide Toxins of *Amanita* Mushrooms. *Biopolymers* 2010; 659-664.
- [72] Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 551-557.
- [73] Wang W, Owen SM, Rudolph DL, Cole AM, Hong T, Waring AJ. Activity of alpha and theta defensins against primary isolates of HIV. *J Immunol* 2004; 505-520.
- [74] Sun L, Finnegan CM, Kish-Catalone T, Blumenthal R, Garzino-Demo P. Human p-defensins suppress Human Immunodeficiency Virus Infection: potential role in mucosal protection. *J Virol* 2005; 14318-14329.
- [75] Prado E. Human defensin: prophylaxis and therapy against HIV?. *Gac. Méd. Méx* 2006; 142.
- [76] Góngora-Benítez M, Tulla-Puche J, Albericio F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. *Peptides as Therapeutics. Chem Rev* 2014; 901-926.
- [77] Gründemann C, Koehbach J, Huber R. Do Plant Cyclotides Have Potential As Immunosuppressant Peptides?. *J Nat Prod* 2012; 167-174.
- [78] Allen, Michael P. "Introduction to molecular dynamics simulation." *Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins*, 23 (2004): 1-28.
- [79] Johnson C, Ivanisevic J, Benton P, Siuzdak G. *Bioinformatics: The Next Frontier of Metabolomics. American Chemical Society* 2014; 147-156.
- [80] Arnold K, Kopp L, Schwede T. The swiss-model workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006, 195-201.
- [81] Weiner S, Kollman P. An All-Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J Comput Chem* 1986; 7:230.
- [82] Anfinsen C. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem J.* 1972; 737-749.
- [83] Chou P, Fasman G. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 1974; 22-245.

- [84] Chou P, Fasman G. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 1974; 13:211-222.
- [85] Chen M, Huang W. A branch and bound algorithm for the protein folding problem in the HP lattice model. *Bioinformatics* 2005; 225-230.
- [86] Asencio G. Minería de datos aplicada a la predicción de estructuras de proteínas mediante vecinos más cercanos. Master's thesis, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informatica 2009.
- [87] Leach A. *Molecular modelling: principles and applications*. Prentice Hall, 2001:2
- [88] Iwaoka M, Juminaga D, Scheraga HA. Regeneration of three-disulfide mutants of bovine pancreatic ribonuclease A missing the 65-72 disulfide bond: characterization of a minor folding pathway of ribonuclease A and kinetic roles of Cys65 and Cys7. *Biochemistry* 1998; 37:4490-4501.
- [89] Shin H, Narayan M, Song M, Scheraga H. Role of the [65-72] disulfide bond in oxidative folding of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 2003; 11514-11519.
- [90] Iozzi M, Helgaker T, Uggeraud E. Influence of External Force on Properties and Reactivity of Disulfide Bonds. *J Phys Chem* 2011; 115:2308-2315.
- [91] Ramachandran G, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 1963; 7:95-99.
- [92] Espinoza-García J. *Superficies de Energía potencial y reactividad química* 2da edición Septem ediciones, 2004.
- [93] Weiner, P. K., Langridge, R., Blaney, J. M., Schaefer, R., & Kollman, P. A. (1982). Electrostatic potential molecular surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982; 79(12): 3754-3758.
- [94] Tomasi J. In *Chemical Applications of Atomic and Molecular Electrostatic Potentials*. Eds. Politzer, P. & Truhlar, D. (Plenum, New York). 1981; 257-294
- [95] Hill, T. L. *An introduction to statistical thermodynamics*. Courier Corporation. 1960
- [96] Feit, M. D., Fleck, J. A., & Steiger, A. Solution of the Schrödinger equation by a spectral method. *Journal of Computational Physics*. 1982; 47(3): 412-433.
- [97] Wong, M. W. Vibrational frequency prediction using density functional theory. *Chemical Physics Letters*. 1996; 256(4): 391-399.

- [98] Schäfer, A., Huber, C., & Ahlrichs, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *The Journal of Chemical Physics*, 1994; 100(8): 5829-5835.
- [99] Rapaport, D. C., Blumberg, R. L., McKay, S. R., & Christian, W. The art of molecular dynamics simulation. *Computers in Physics*, 1996;10(5):456-456.
- [100] Lovell S, Davis I, Arendal III W, Bakker P, Word J et al. Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 2003; (3):437-450.



Apéndice A

El método utilizado para el modelamiento de proteínas (figura 3.57) es eficaz para proteínas cíclicas y no cíclicas, obteniendo un modelo suficientemente apto para los análisis de estabilidad e identificación de centros activos de la proteína. Este proceso es general y se puede emplear cualquier software especializado, ya que solo se trabaja únicamente con modelos reportados en el Protein Data Bank.

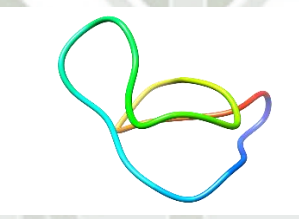
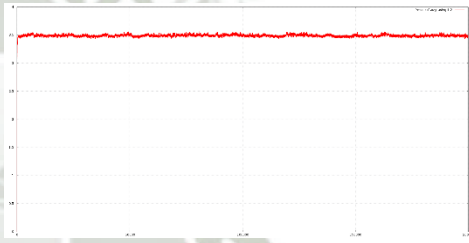

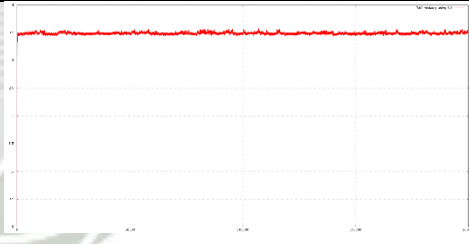
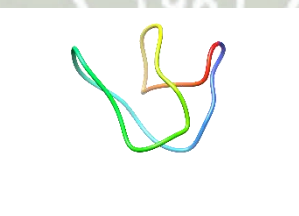
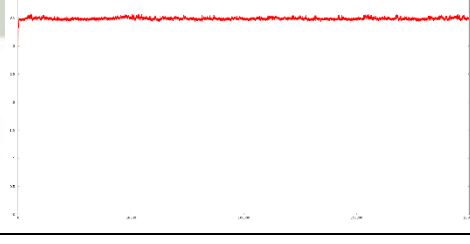



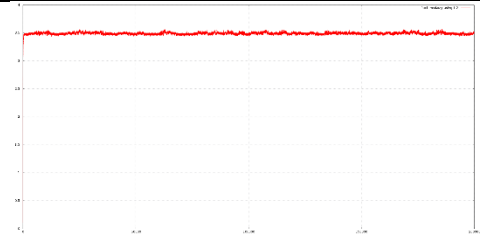

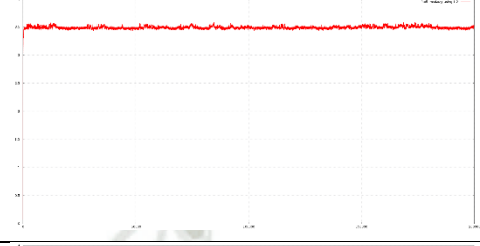

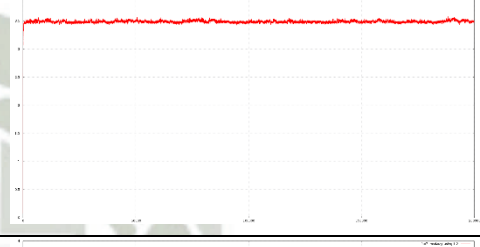

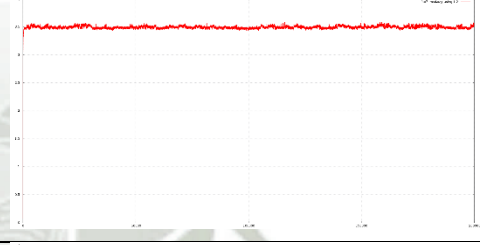

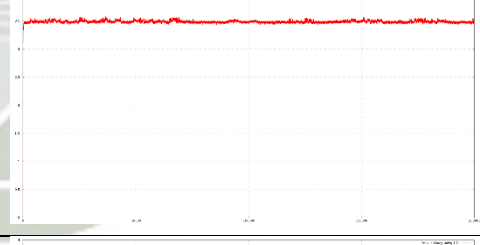
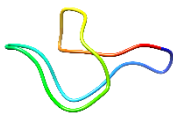
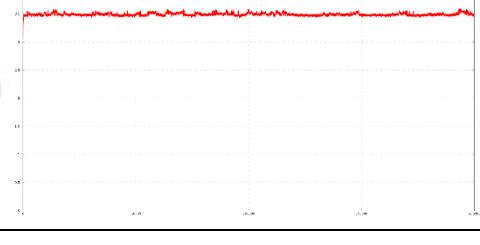
Figura 3.58. Proceso para el modelamiento de proteínas.

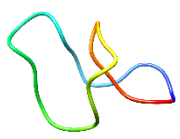


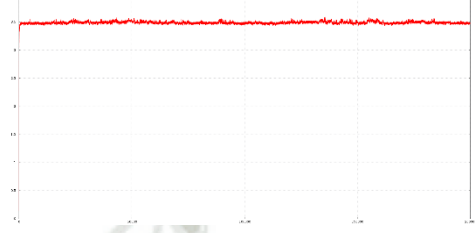
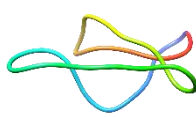
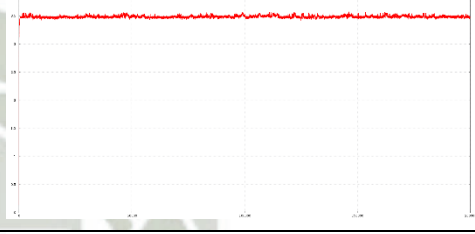
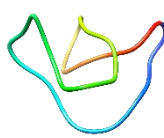


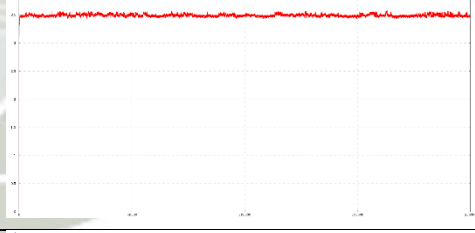

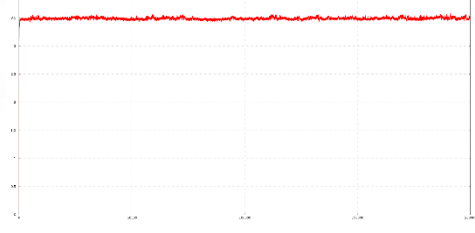
Apéndice B

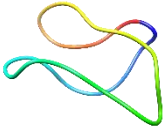
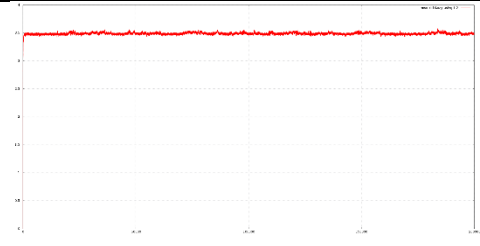

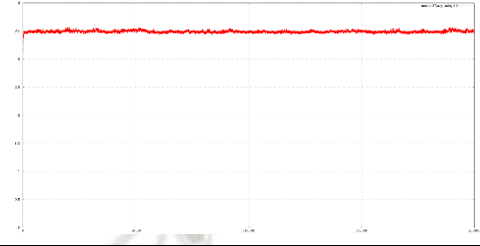
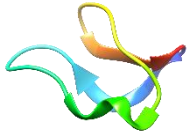
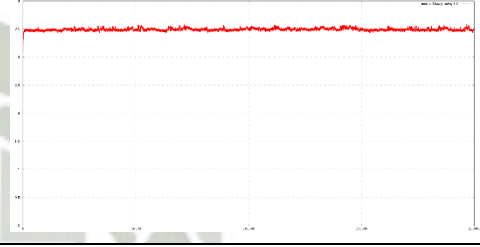
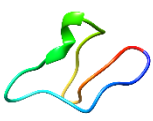
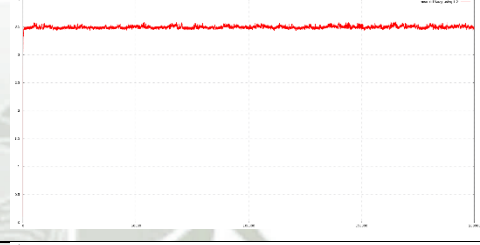
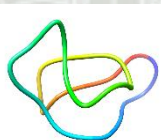
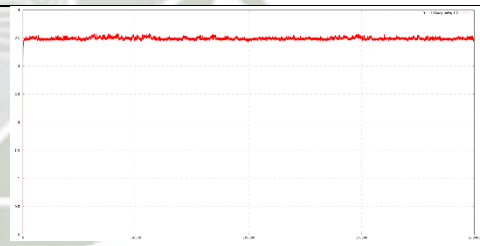
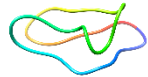
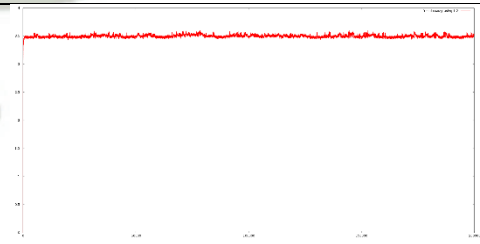
Los ciclótidos obtenidos en la dinámica molecular se muestran en la tabla N, se obtuvieron las estructuras terciarias y se realizó un análisis de validación determinado por su estabilidad estructural en la dinámica molecular (RMSD).




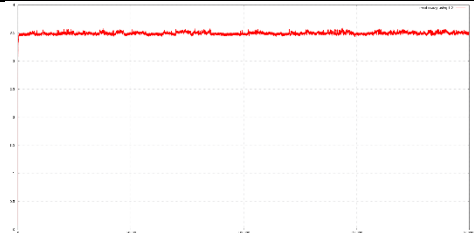
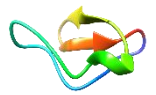



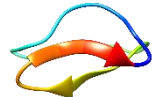
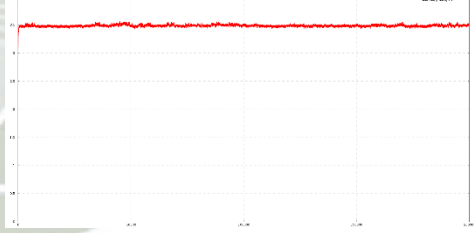

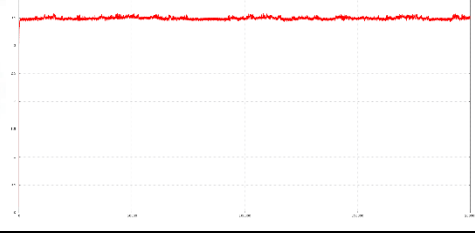
Tabla 3.10. Modelos y rmsd de ciclótidos en mecánica molecular.

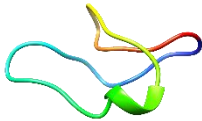
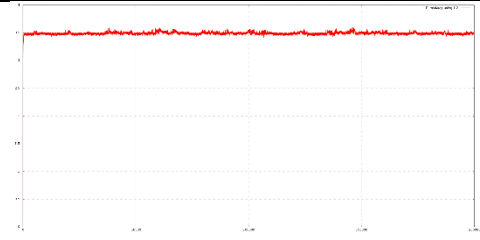

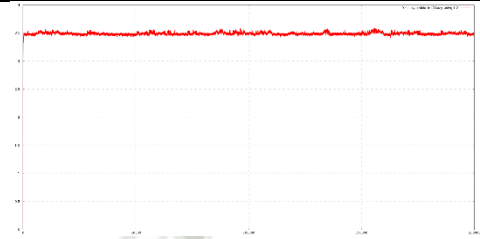

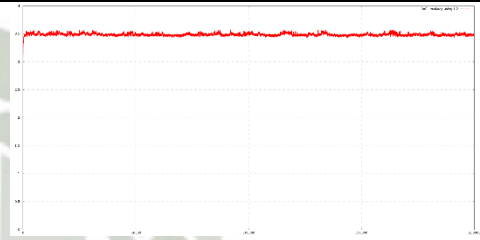

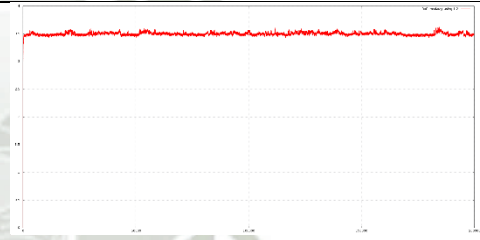

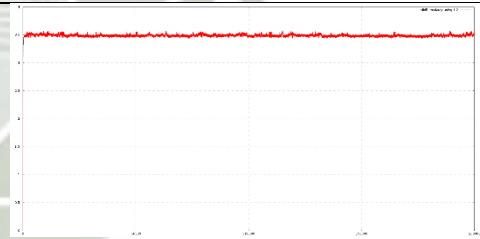


#	CICLÓTIDOS	N° AA	Enlaces disulfuro (Å)	
			ESTRUCTURA	RMSD
1	kalata B1	29		
2	kalata B2	29		
3	kalata B3	30		

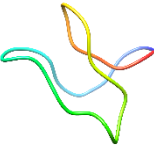
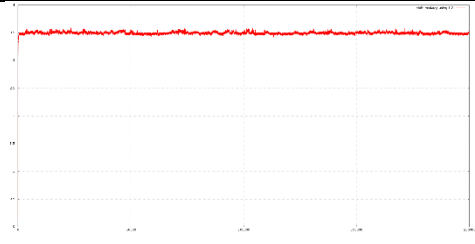
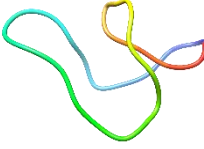
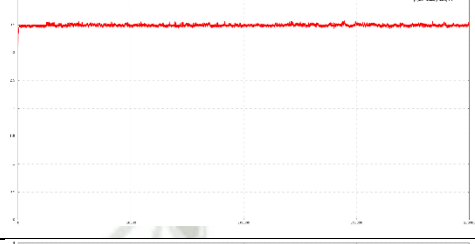

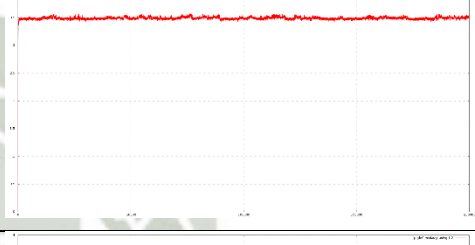

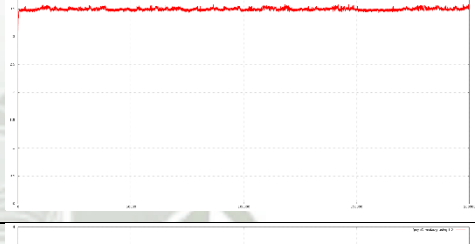
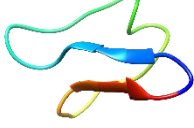
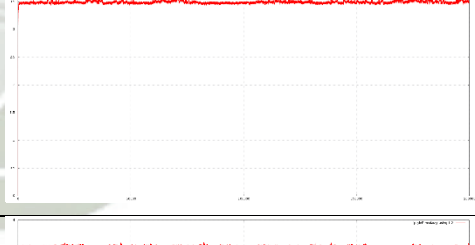
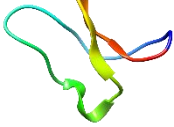
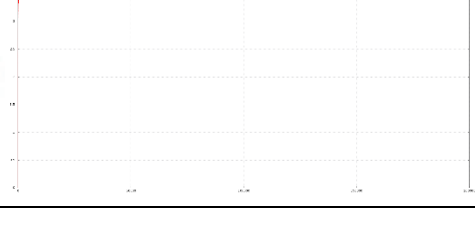
4	kalata B4	29		
5	kalata B5	30		
6	kalata B6	30		
7	kalata B7	29		
8	kalata B8	31		
9	kalata B9	31		


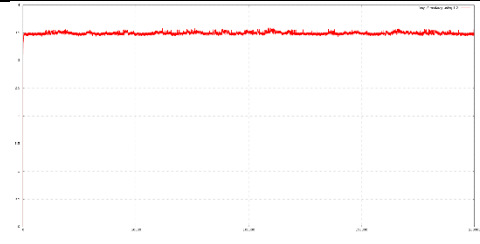

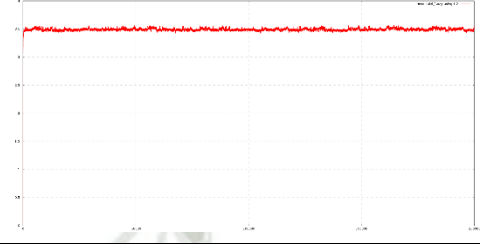

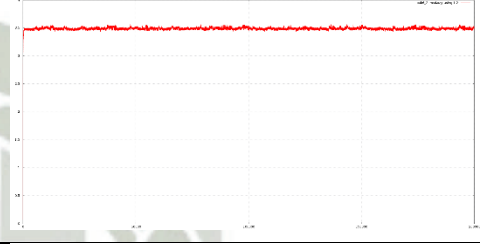
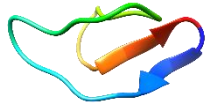
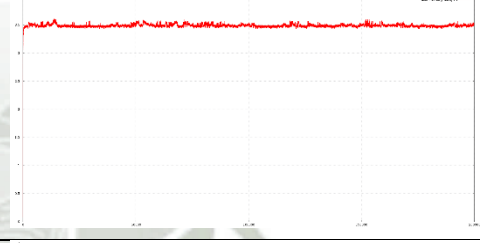
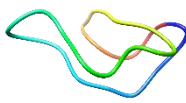
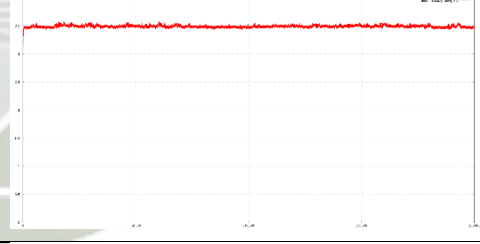
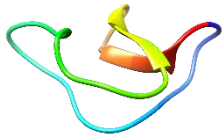
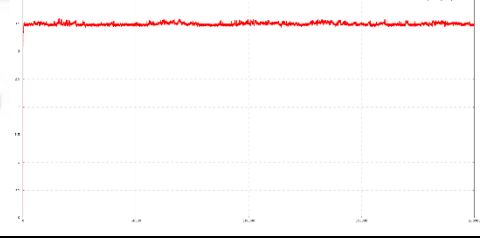
10	kalata B10	30		
11	kalata B11	29		
12	kalata B12	28		
13	kalata B13	30		
14	kalata B14	30		
15	kalata B15	29		

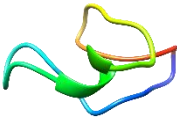
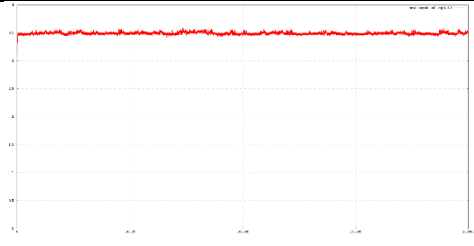

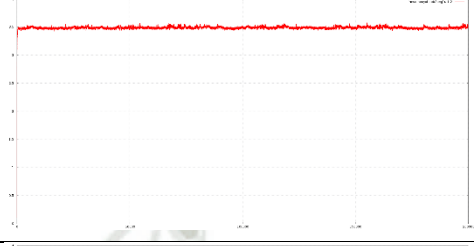
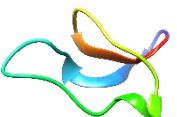
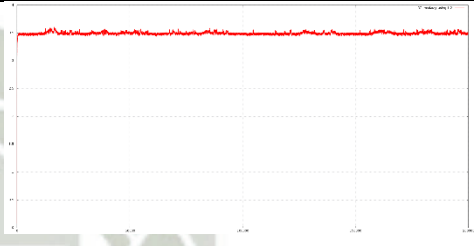
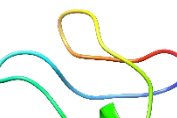
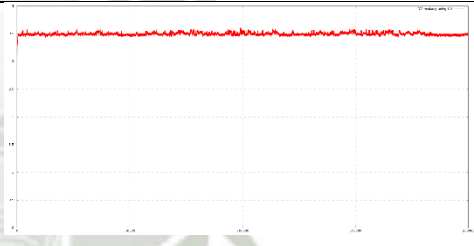

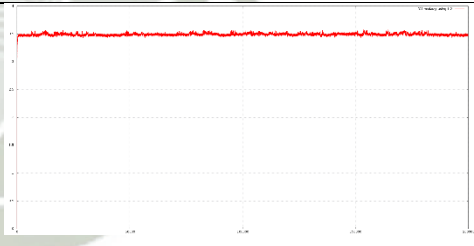
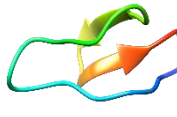
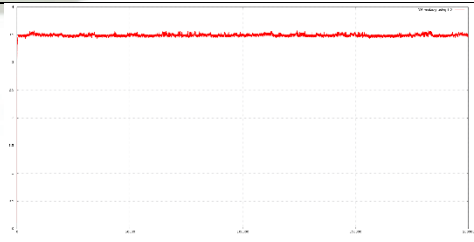
16	kalata B16	30		
17	kalata B17	30		
18	kalata B18	30		
19	kalata B19	30		
20	kalata S	29		
21	circulin A	30		


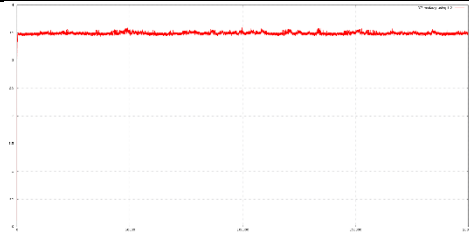

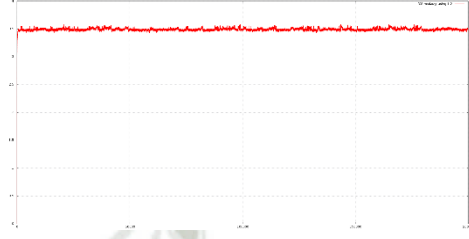
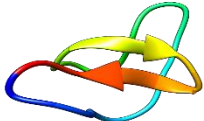
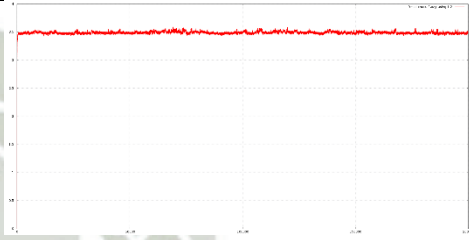
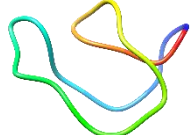
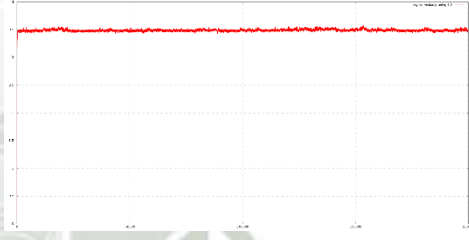

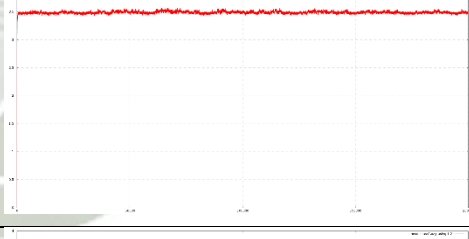
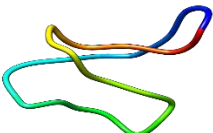
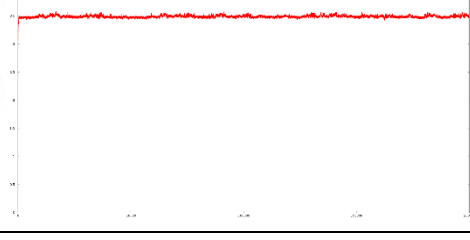
22	circulin B	31		
23	circulin C	30		
24	circulin D	30		
25	circulin E	30		
26	circulin F	29		
27	hcf-1	30		

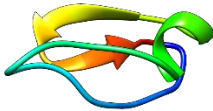
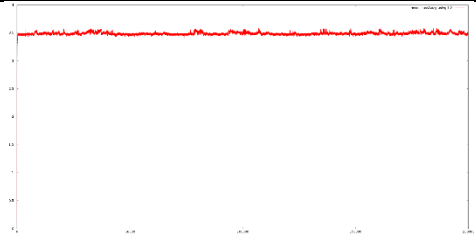

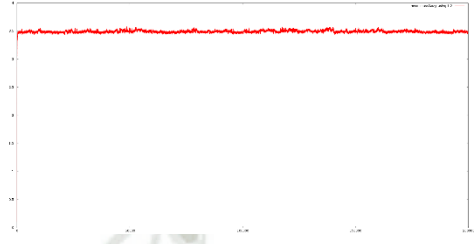

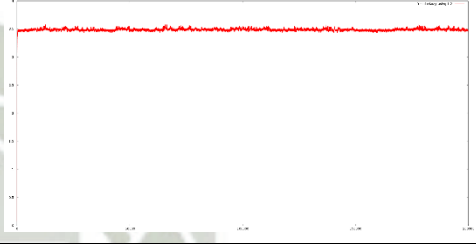

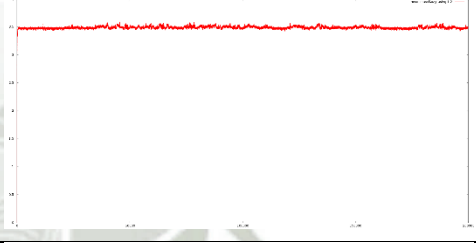

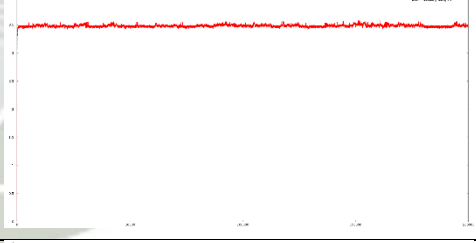

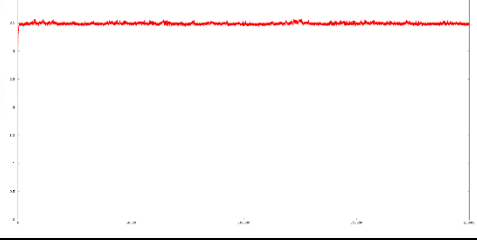
28	hvf-1	30		
29	cycloviolacin O22	29		
30	PS-1	31		
31	CD-1	34		
32	vibi B	29		
33	vibi G	31		


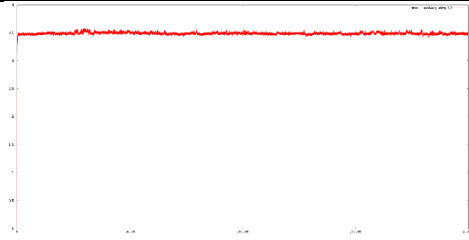
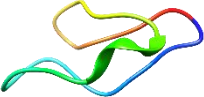
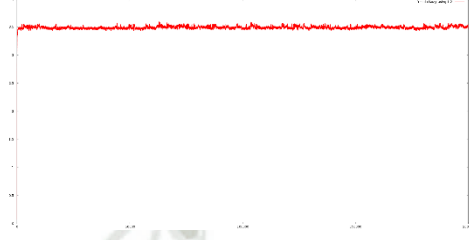

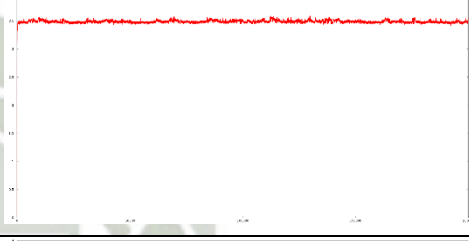

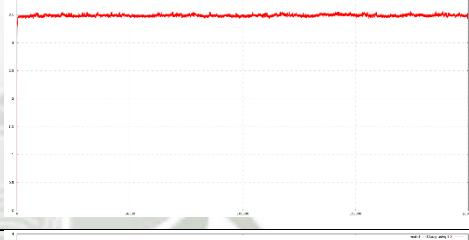

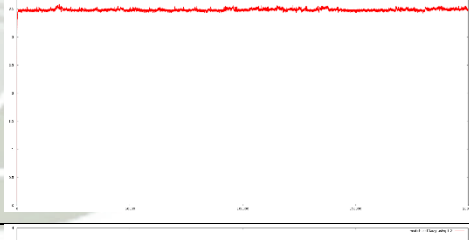

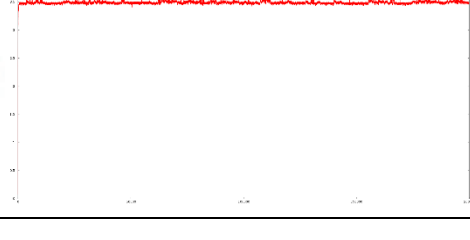
34	vibi H	31		
35	psvle A	28		
36	psvle B	28		
37	psvle C	25		
38	psvle D	31		
39	psvle E	31		

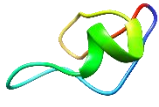
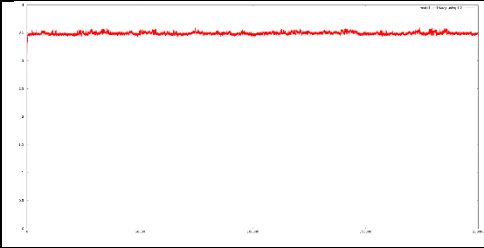

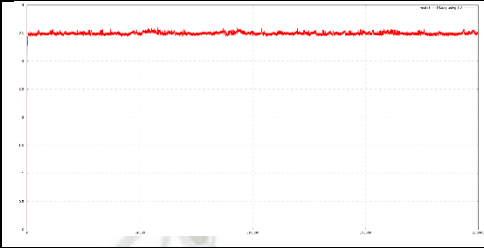
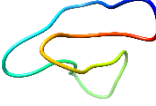
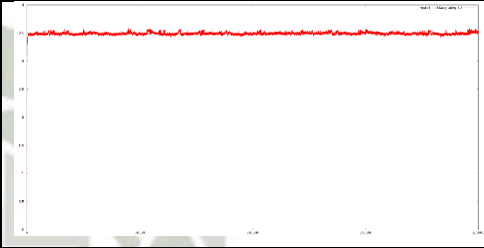

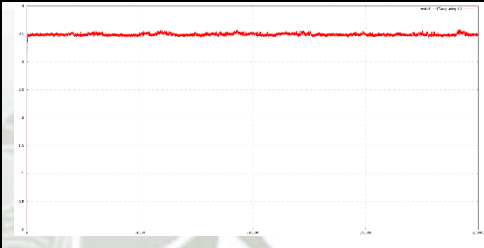
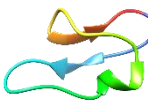
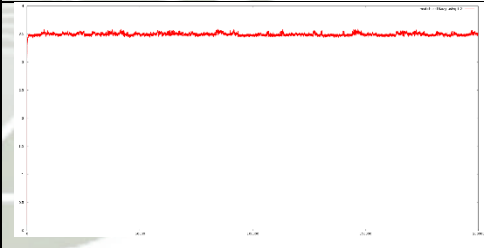

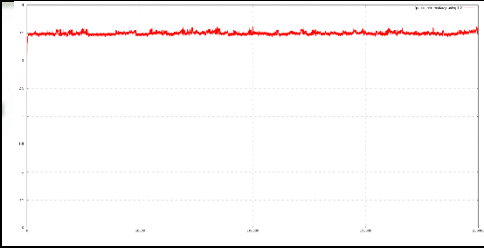
40	psyle F	31		
41	Oak6 cyclotide 1	30		
42	Oak6 cyclotide 2	30		
43	Oak7 cyclotide	29		
44	Oak8 cyclotide	30		
45	Parigidin-br1	32		

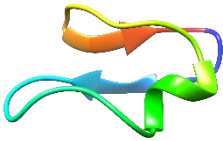
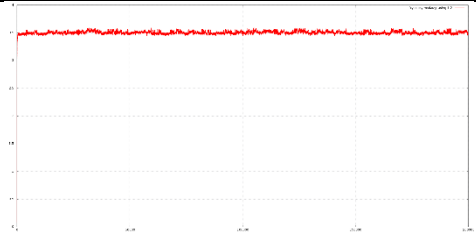

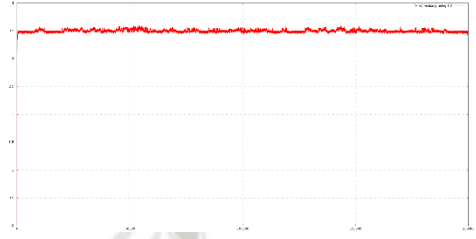
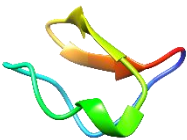

46	hedyotide B1	30		
47	hedyotide B2	29		
48	caripe 1	31		
49	caripe 2	31		
50	caripe 4	27		
51	caripe 6	28		

52	caripe 7	34		
53	caripe 8	31		
54	chacur 1	29		
55	psybra 1	29		
56	paltet 1	29		
57	chassatide C1	29		

58	chassatide C2	31		
59	chassatide C3	29		
60	chassatide C4	29		
61	chassatide C5	31		
62	chassatide C6	31		
63	chassatide C7	29		

64	chassatide C8	30		
65	chassatide C9	30		
66	chassatide C10	29		
67	chassatide C11	28		
68	chassatide C12	28		
69	chassatide C13	31		

70	chassatide C14	31		
71	chassatide C15	31		
72	chassatide C16	31		
73	chassatide C17	29		
74	chassatide C18	30		
75	palicourein	37		

76	cyclopsychotrid e A	31		
77	vitri A	30		
78	hcf-1 variant	29		

Apéndice C

Los ciclótidos fueron sometidos a la simulación annealing, obteniendo la distancia de los enlaces disulfuro a diferentes temperaturas, obteniendo valores en el rango permitido (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Distancia clásica de los enlaces disulfuro de los ciclótidos en la simulación annealing.

Ciclótidos	CNK	Temperatura K									
		309.65	319.65	329.65	339.65	349.65	359.65	369.65	379.65	389.65	399.65
Kalata B1	I-IV	2.02322	2.0366	2.0397	2.0321	2.0776	2.103	1.9387	2.0256	2.0917	2.0021
	II-V	2.05392	2.0782	1.9826	2.0114	1.9992	2.1707	2.0972	2.02	2.0015	2.0729
	III-VI	2.02633	2.0673	2.0397	2.0603	2.0736	2.0629	2.0242	2.0941	1.9785	2.0446
Kalata B7	I-IV	2.05706	2.0518	1.9884	2.0913	2.0402	2.0141	1.9894	2.0671	2.0692	1.9939
	II-V	2.07822	2.0761	2.0042	2.0157	2.0213	2.0556	1.9969	2.0368	1.9858	2.0242
	III-VI	2.02062	1.9761	2.1347	2.0199	2.0316	2.0881	1.988	2.082	2.0246	2.0293
Kalata B12	I-IV	2.02832	2.0067	2.052	1.9579	2.0815	2.028	2.1073	1.9795	1.9617	2.0437
	II-V	2.01559	2.0073	2.0054	2.0253	2.029	2.0202	2.1223	2.0597	1.991	1.9429
	III-VI	2.1127	1.9894	2.0052	2.0145	2.0403	2.085	1.9277	2.0383	2.1287	1.984
Cycloviolacin O22	I-IV	2.04218	1.9475	2.0722	2.0477	1.9962	2.0512	1.973	2.1698	2.0643	1.9832
	II-V	2.06932	2.0241	2.0387	1.9637	2.0556	2.0796	2.0846	1.9894	1.9752	2.103
	III-VI	2.06012	2.0631	2.0847	2.0535	2.0298	1.9786	1.9576	2.0145	2.0337	1.9577
Palicourein	I-IV	1.9899	2.0146	2.0671	2.1039	2.0605	2.0734	2.0755	2.087	2.0445	2.0534
	II-V	2.09411	2.0656	2.0634	2.0258	2.0646	2.0272	2.0696	2.0806	2.0112	2.0629
	III-VI	1.99892	2.0436	2.0492	2.0003	2.0064	2.0393	2.0525	2.0083	1.9959	2.0486
Kalata B2	I-IV	2.078515	2.038090	2.005638	2.091410	2.071217	2.075211	2.041332	2.077617	2.095448	2.017644
	II-V	2.099538	2.085888	2.042059	2.058546	2.034108	2.027837	2.023589	2.077837	2.095453	2.006931
	III-VI	2.078406	2.035765	2.043886	2.062988	2.058395	2.005953	2.041689	2.094632	2.026705	2.052688
Kalata B3	I-IV	2.039671	2.075086	2.062942	2.013331	2.017760	2.016223	2.037560	2.075500	2.004197	2.095004
	II-V	2.030035	2.043708	2.020597	2.080752	2.068974	2.082278	2.080744	2.038611	2.081391	2.026962
	III-VI	2.043365	2.078576	2.024030	2.017964	2.079121	2.068156	2.017038	2.023407	2.026273	2.075785
Kalata B4	I-IV	2.020975	2.030207	2.062285	2.056526	2.042045	2.055508	2.087100	2.032134	2.096796	2.087198
	II-V	2.051315	2.051967	2.089886	2.010416	2.012720	2.044986	2.027189	2.038007	2.040852	2.011997

	III-VI	2.090028	2.001893	2.067791	2.037316	2.003292	2.043813	2.091735	2.081773	2.091900	2.035304
Kalata B5	I-IV	2.026324	2.032577	2.039300	2.017739	2.092383	2.002776	2.099792	2.073321	2.030599	2.003880
	II-V	2.058567	2.025096	2.036788	2.050985	2.067211	2.034961	2.070112	2.055637	2.052841	2.051473
	III-VI	2.044017	2.041141	2.016703	2.069296	2.012324	2.009753	2.047764	2.031847	2.046525	2.078753
Kalata B6	I-IV	2.013030	2.069210	2.040321	2.041013	2.019548	2.041712	2.089265	2.011047	2.077152	2.018301
	II-V	2.034021	2.009083	2.071954	2.029281	2.016108	2.040680	2.070717	2.073634	2.086654	2.018221
	III-VI	2.069472	2.098648	2.074173	2.044827	2.001516	2.094646	2.090672	2.053707	2.026144	2.014094
Kalata B8	I-IV	2.014009	2.050897	2.056710	2.059557	2.031475	2.076238	2.092309	2.008815	2.005391	2.033974
	II-V	2.041922	2.006014	2.035037	2.058094	2.076229	2.026439	2.050426	2.038697	2.002588	2.059791
	III-VI	2.014563	2.032420	2.068716	2.031422	2.004560	2.052268	2.047020	2.044136	2.060334	2.011229
Kalata B9	I-IV	2.099644	2.017116	2.056612	2.046437	2.005620	2.071133	2.075246	2.046550	2.011390	2.081314
	II-V	2.076840	2.022778	2.080262	2.048326	2.095941	2.016231	2.042110	2.035929	2.087140	2.020265
	III-VI	2.046025	2.043425	2.044691	2.035018	2.027366	2.076350	2.055430	2.043182	2.009398	2.073595
Kalata B10	I-IV	2.012322	2.088493	2.031101	2.086437	2.048364	2.070596	2.059106	2.004535	2.080601	2.045128
	II-V	2.070433	2.067794	2.085700	2.032006	2.018501	2.035591	2.018858	2.083043	2.093966	2.085086
	III-VI	2.014789	2.039550	2.087873	2.097248	2.084542	2.076977	2.009145	2.077691	2.080503	2.098275
Kalata B11	I-IV	2.072406	2.083541	2.081810	2.081422	2.059509	2.039858	2.050754	2.016374	2.091972	2.097501
	II-V	2.012552	2.025490	2.054152	2.039422	2.044099	2.033073	2.065485	2.091021	2.037729	2.005720
	III-VI	2.034441	2.058145	2.080109	2.027414	2.056709	2.095855	2.015070	2.038176	2.077251	2.065242
Kalata B13	I-IV	2.030992	2.087303	2.015327	2.041554	2.023980	2.079323	2.010109	2.086830	2.007886	2.080513
	II-V	2.055389	2.006883	2.010375	2.088673	2.087942	2.095517	2.083980	2.060170	2.065196	2.072131
	III-VI	2.062134	2.016687	2.086136	2.002694	2.039384	2.089876	2.033147	2.040990	2.044660	2.012547
kalata B 14	I-IV	2.032061	2.055009	2.024253	2.021479	2.063545	2.034237	2.086653	2.065307	2.035404	2.040393
	II-V	2.053923	2.091081	2.017548	2.014851	2.010921	2.056572	2.031759	2.058869	2.006299	2.060167
	III-VI	2.081294	2.037005	2.096382	2.093754	2.016621	2.013384	2.006243	2.018658	2.050944	2.012639
Kalata B15	I-IV	2.060034	2.010861	2.063870	2.076556	2.026166	2.000717	2.011164	2.016699	2.050071	2.075464
	II-V	2.076512	2.003323	2.047497	2.057178	2.093606	2.094789	2.080117	2.050469	2.044687	2.019366
	III-VI	2.052922	2.099110	2.036002	2.002807	2.026682	2.035066	2.017425	2.013758	2.039027	2.048044
Klata B16	I-IV	2.081488	2.055017	2.089055	2.002151	2.011393	2.077886	2.088810	2.052221	2.045427	2.054847
	II-V	2.061451	2.015325	2.061030	2.011667	2.035343	2.021034	2.019186	2.005894	2.012996	2.087549
	III-VI	2.078104	2.046391	2.043544	2.008148	2.051995	2.041955	2.095503	2.095513	2.017381	2.070708
Kalata B17	I-IV	2.042594	2.036897	2.050694	2.084465	2.064554	2.093969	2.055664	2.041766	2.087894	2.040500
	II-V	2.034262	2.069621	2.032231	2.084567	2.007638	2.040346	2.088233	2.067287	2.042377	2.009253
	III-VI	2.072518	2.032573	2.008145	2.014214	2.017068	2.037800	2.039956	2.082662	2.096706	2.036017
Kalata B18	I-IV	2.080450	2.098346	2.044869	2.060608	2.054613	2.004410	2.022745	2.039467	2.096809	2.000480
	II-V	2.026422	2.013824	2.037581	2.031570	2.096239	2.078196	2.031392	2.020757	2.028870	2.081666
	III-VI	2.071488	2.066342	2.017766	2.094614	2.045350	2.034473	2.056044	2.066904	2.062772	2.012579
Kalata B19	I-IV	2.099089	2.043781	2.098967	2.024572	2.064926	2.037372	2.078765	2.044802	2.016832	2.017750
	II-V	2.079810	2.004317	2.001270	2.040499	2.036649	2.045629	2.076583	2.057054	2.084558	2.009831
	III-VI	2.045919	2.042231	2.048712	2.076526	2.035103	2.052963	2.080834	2.075774	2.034599	2.047092
Kalata S	I-IV	2.062925	2.040690	2.067931	2.079837	2.082261	2.086604	2.075019	2.032996	2.027597	2.080310
	II-V	2.081415	2.008835	2.021886	2.024608	2.062513	2.075662	2.099940	2.023939	2.007568	2.027420
	III-VI	2.084425	2.052757	2.061843	2.079582	2.082891	2.079599	2.085581	2.081488	2.018439	2.090178

Circulin A	I-IV	2.073165	2.062918	2.058523	2.036929	2.079609	2.027381	2.032676	2.011842	2.009600	2.096733
	II-V	2.015213	2.008339	2.043219	2.022036	2.088515	2.082140	2.056137	2.031976	2.084141	2.068392
	III-VI	2.071867	2.064576	2.034747	2.088062	2.093950	2.074324	2.093406	2.020180	2.060431	2.083896
Circulin B	I-IV	2.077894	2.066330	2.077540	2.047898	2.026143	2.070695	2.058049	2.090902	2.058248	2.065309
	II-V	2.052846	2.090687	2.068506	2.069860	2.080913	2.049903	2.035501	2.097722	2.091194	2.052634
	III-VI	2.063651	2.087163	2.018161	2.003151	2.097177	2.051046	2.095047	2.020827	2.084897	2.022512
Circulin C	I-IV	2.033074	2.040984	2.022920	2.096603	2.010770	2.026584	2.066618	2.019844	2.062799	2.009979
	II-V	2.089499	2.032013	2.077781	2.049874	2.010946	2.059051	2.069406	2.007128	2.005839	2.093956
	III-VI	2.021290	2.032170	2.067928	2.083304	2.048955	2.094769	2.001597	2.090867	2.005865	2.036149
Circulin D	I-IV	2.041746	2.074159	2.097608	2.029211	2.076092	2.057510	2.047580	2.017153	2.049614	2.020071
	II-V	2.028080	2.000956	2.012002	2.096591	2.054863	2.018554	2.083615	2.063887	2.030694	2.017456
	III-VI	2.087747	2.084699	2.011091	2.037825	2.030733	2.030140	2.002199	2.028625	2.071044	2.001255
Circulin E	I-IV	2.058733	2.091440	2.015076	2.005625	2.045836	2.047437	2.076696	2.010841	2.057306	2.095418
	II-V	2.049807	2.065304	2.016889	2.082727	2.009392	2.082621	2.027748	2.089281	2.009020	2.055827
	III-VI	2.087555	2.007744	2.069775	2.093777	2.024841	2.064941	2.012226	2.035508	2.002232	2.027061
Circulin F	I-IV	2.031495	2.082840	2.039725	2.042027	2.028889	2.066616	2.041809	2.040412	2.095764	2.012616
	II-V	2.041875	2.043709	2.003729	2.037535	2.055937	2.037438	2.087130	2.041558	2.081955	2.091723
	III-VI	2.087258	2.061040	2.078601	2.043668	2.081462	2.060686	2.007524	2.010475	2.042520	2.025708
hcf-1	I-IV	2.092037	2.020278	2.099405	2.046920	2.007364	2.047809	2.088682	2.030971	2.031328	2.068292
	II-V	2.057998	2.069458	2.069186	2.091536	2.024286	2.011765	2.057924	2.068540	2.057983	2.053187
	III-VI	2.059910	2.099272	2.002259	2.066413	2.014814	2.082104	2.004165	2.067414	2.048905	2.003395
htf-1	I-IV	2.008838	2.023400	2.006314	2.071394	2.078886	2.061436	2.067447	2.073883	2.011769	2.082365
	II-V	2.081364	2.013745	2.072427	2.004057	2.093641	2.034558	2.023374	2.035791	2.006653	2.041361
	III-VI	2.037421	2.003061	2.098554	2.064326	2.000430	2.075927	2.027808	2.013361	2.049410	2.092558
Ps-1	I-IV	2.026851	2.002109	2.089461	2.062578	2.039417	2.023155	2.011669	2.038410	2.026897	2.011514
	II-V	2.084379	2.018999	2.083256	2.089290	2.072739	2.054444	2.054555	2.092158	2.005528	2.022835
	III-VI	2.060959	2.058650	2.026878	2.032455	2.068312	2.004626	2.041656	2.021140	2.046039	2.015825
Cd-1	I-IV	2.090738	2.032607	2.069355	2.031231	2.087127	2.053911	2.049357	2.060846	2.013501	2.061843
	II-V	2.069616	2.005630	2.072364	2.012294	2.076338	2.096833	2.041494	2.073488	2.033948	2.046143
	III-VI	2.047320	2.064782	2.062349	2.020420	2.068001	2.048078	2.058267	2.092653	2.094124	2.051547
Vibi G	I-IV	2.051708	2.080468	2.082754	2.074888	2.005455	2.063391	2.070689	2.083305	2.049771	2.010066
	II-V	2.036528	2.029389	2.062967	2.043399	2.075960	2.032974	2.085944	2.050545	2.037889	2.059097
	III-VI	2.060965	2.094252	2.025323	2.027236	2.050395	2.005859	2.012708	2.020116	2.061421	2.038092
Vibi B	I-IV	2.060379	2.012681	2.016581	2.070478	2.017688	2.053085	2.009250	2.083891	2.030730	2.005917
	II-V	2.092419	2.036486	2.070300	2.020293	2.049346	2.067928	2.043097	2.000926	2.081265	2.079350
	III-VI	2.085220	2.005749	2.031438	2.009098	2.047541	2.011381	2.015606	2.085786	2.091072	2.070184
Vibi H	I-IV	2.087529	2.041642	2.018687	2.075105	2.033325	2.017631	2.038509	2.083758	2.000771	2.034231
	II-V	2.077540	2.061041	2.009020	2.016860	2.066161	2.086070	2.087053	2.023142	2.054114	2.021977
	III-VI	2.079281	2.061751	2.040126	2.062760	2.003630	2.067739	2.029889	2.043992	2.050518	2.048355
Psyle A	I-IV	2.082546	2.079862	2.095631	2.057864	2.072154	2.033481	2.011708	2.027870	2.078035	2.066766

	II-V	2.060922	2.024474	2.087557	2.097561	2.006507	2.095475	2.007465	2.025567	2.071557	2.039783
	III-VI	2.089195	2.021931	2.092671	2.067119	2.040438	2.030097	2.071729	2.057487	2.097522	2.039224
Psyle B	I-IV	2.094758	2.050012	2.035003	2.085659	2.045064	2.074734	2.066343	2.064030	2.058978	2.054084
	II-V	2.086529	2.075485	2.092416	2.025496	2.066171	2.000459	2.090094	2.038487	2.079936	2.088998
	III-VI	2.064967	2.055368	2.037293	2.052104	2.077348	2.059493	2.050884	2.010375	2.071355	2.037656
Psyle C	I-IV	2.009529	2.037417	2.016931	2.057960	2.030937	2.010734	2.096768	2.033554	2.075863	2.070460
	II-V	2.083218	2.002117	2.003211	2.040431	2.065289	2.022240	2.061612	2.066711	2.013533	2.089794
	III-VI	2.032276	2.073291	2.000265	2.063112	2.063876	2.083557	2.002222	2.084107	2.077184	2.076201
Psyle D	I-IV	2.005458	2.050998	2.074036	2.084974	2.045635	2.051971	2.050692	2.092064	2.000732	2.083102
	II-V	2.099371	2.065218	2.024759	2.083487	2.065088	2.099794	2.040600	2.059752	2.008607	2.084404
	III-VI	2.050954	2.057910	2.050496	2.022828	2.001325	2.032629	2.086725	2.017786	2.025079	2.087638
Psyle E	I-IV	2.022165	2.045722	2.093676	2.067147	2.039242	2.073038	2.005616	2.075487	2.030187	2.005562
	II-V	2.019437	2.002110	2.094794	2.062778	2.074818	2.024772	2.084332	2.025083	2.047361	2.054191
	III-VI	2.049693	2.050369	2.020138	2.082088	2.013386	2.041598	2.098934	2.048604	2.099007	2.017884
Psyle F	I-IV	2.056825	2.064685	2.033617	2.011039	2.015687	2.081144	2.006782	2.014452	2.062320	2.081768
	II-V	2.017400	2.068871	2.066981	2.011173	2.010031	2.047655	2.093406	2.098710	2.054055	2.079161
	III-VI	2.054968	2.026501	2.001954	2.095072	2.002843	2.038834	2.096114	2.077561	2.096356	2.005457
Oak-6-1	I-IV	2.022116	2.003086	2.018871	2.017326	2.047552	2.075864	2.016038	2.063167	2.006418	2.090423
	II-V	2.055950	2.009142	2.036922	2.080657	2.048171	2.063389	2.009221	2.096627	2.063063	2.082738
	III-VI	2.020208	2.066192	2.007403	2.004565	2.008836	2.049314	2.015651	2.032192	2.064917	2.072559
Oak-6-2	I-IV	2.085224	2.065340	2.026658	2.029379	2.026188	2.061997	2.019523	2.042530	2.021225	2.057185
	II-V	2.090235	2.066694	2.064649	2.059682	2.048102	2.084751	2.038600	2.073686	2.079437	2.030262
	III-VI	2.000565	2.020200	2.092177	2.001834	2.080023	2.032123	2.064729	2.047120	2.033390	2.090292
Oak-7	I-IV	2.016055	2.011078	2.000901	2.081494	2.015674	2.074546	2.008804	2.064116	2.076006	2.070047
	II-V	2.078130	2.065113	2.025762	2.018003	2.016246	2.054747	2.037522	2.061573	2.019591	2.030317
	III-VI	2.019712	2.022174	2.038453	2.016238	2.052289	2.003689	2.062771	2.048157	2.042316	2.001224
Oak 8	I-IV	2.057205	2.089274	2.082642	2.069698	2.006442	2.042532	2.034609	2.074777	2.057230	2.034639
	II-V	2.061057	2.094841	2.046738	2.046148	2.087002	2.097635	2.052595	2.071161	2.031077	2.048219
	III-VI	2.078033	2.065930	2.076140	2.070303	2.040714	2.071116	2.075123	2.054857	2.096432	2.006698
Parigidin br-1	I-IV	2.040249	2.030777	2.027305	2.059925	2.075604	2.019844	2.043509	2.031219	2.054296	2.048839
	II-V	2.033112	2.050913	2.013880	2.086432	2.064188	2.015245	2.091896	2.085167	2.049228	2.056572
	III-VI	2.063786	2.053977	2.019233	2.042523	2.084802	2.049697	2.092197	2.036564	2.053393	2.001431
Hedyotide B1	I-IV	2.023189	2.041542	2.036952	2.040393	2.035553	2.030955	2.036453	2.051452	2.083786	2.055630
	II-V	2.006199	2.000650	2.048101	2.085762	2.009426	2.015730	2.022986	2.077696	2.091104	2.035475
	III-VI	2.080909	2.069036	2.006749	2.028953	2.057211	2.084804	2.026748	2.042707	2.066768	2.026847
Hedyotide B2	I-IV	2.079442	2.059413	2.081539	2.002727	2.072549	2.062551	2.024703	2.013569	2.089224	2.023404
	II-V	2.032333	2.002101	2.074759	2.068525	2.005540	2.074429	2.096023	2.092769	2.078657	2.027452

	III-VI	2.065447	2.025085	2.003603	2.042721	2.088678	2.030192	2.047939	2.031861	2.067774	2.031674
Caripe 1	I-IV	2.078921	2.038195	2.037186	2.061993	2.069961	2.068105	2.096933	2.038787	2.074929	2.051922
	II-V	2.052660	2.072649	2.090504	2.069719	2.095592	2.077777	2.043434	2.045361	2.044382	2.067721
	III-VI	2.037929	2.064695	2.028447	2.094514	2.099429	2.008807	2.050487	2.024949	2.086932	2.051983
Caripe 2	I-IV	2.068081	2.002136	2.072716	2.037676	2.018644	2.006022	2.068819	2.083714	2.064021	2.083569
	II-V	2.021441	2.020798	2.020041	2.060801	2.047930	2.013892	2.027959	2.048994	2.096963	2.038855
	III-VI	2.099118	2.034819	2.024356	2.055217	2.093248	2.026911	2.052251	2.098189	2.033021	2.058751
Caripe 4	I-IV	2.062940	2.023399	2.089074	2.022035	2.091676	2.035916	2.038182	2.002891	2.058371	2.048613
	II-V	2.062106	2.083973	2.071971	2.042162	2.022005	2.005970	2.074506	2.003791	2.045476	2.018915
	III-VI	2.019338	2.011704	2.000540	2.096897	2.043571	2.095243	2.084750	2.099547	2.037431	2.045485
Caripe 6	I-IV	2.048093	2.087753	2.000742	2.014512	2.035168	2.032630	2.092413	2.056738	2.048260	2.009801
	II-V	2.004488	2.062851	2.092912	2.057292	2.057569	2.042535	2.096141	2.023371	2.093010	2.056466
	III-VI	2.010211	2.030966	2.017827	2.014684	2.042907	2.058747	2.018086	2.018989	2.051474	2.099869
Caripe 7	I-IV	2.043943	2.072373	2.055380	2.033272	2.051572	2.025170	2.016201	2.023444	2.084347	2.033928
	II-V	2.047660	2.051881	2.051444	2.086779	2.067634	2.025823	2.099001	2.021054	2.069980	2.081553
	III-VI	2.053562	2.058017	2.011442	2.033131	2.081301	2.099318	2.022103	2.030504	2.006420	2.055587
Caripe 8	I-IV	2.086281	2.065918	2.052532	2.074155	2.074324	2.023189	2.077245	2.010053	2.051589	2.094306
	II-V	2.032753	2.021859	2.013719	2.048367	2.062672	2.047985	2.027010	2.087163	2.009156	2.022670
	III-VI	2.084991	2.066007	2.069983	2.041067	2.007431	2.054685	2.036576	2.023333	2.070858	2.045064
Chacur 1	I-IV	2.010953	2.072551	2.078080	2.083056	2.077662	2.076291	2.085600	2.066707	2.083093	2.079502
	II-V	2.058538	2.091531	2.018522	2.095594	2.049424	2.008531	2.049861	2.029087	2.053797	2.064126
	III-VI	2.023341	2.039539	2.028207	2.076178	2.016483	2.012936	2.018731	2.058717	2.020332	2.042655
Psybra 1	I-IV	2.083879	2.001724	2.051362	2.026699	2.098776	2.028357	2.071433	2.042176	2.043331	2.092225
	II-V	2.060052	2.003207	2.084865	2.034749	2.058161	2.002301	2.017080	2.084232	2.018520	2.062044
	III-VI	2.030553	2.025670	2.083189	2.049931	2.037573	2.018985	2.034061	2.008620	2.042341	2.041208
Paltet 1	I-IV	2.087712	2.033564	2.073956	2.031825	2.017292	2.087634	2.096476	2.010247	2.051993	2.070091
	II-V	2.028890	2.048109	2.035431	2.054507	2.003211	2.092740	2.075998	2.063048	2.008898	2.078280
	III-VI	2.016577	2.079582	2.005472	2.042578	2.009590	2.057678	2.071425	2.088550	2.078940	2.040500
Chassatide C1	I-IV	2.074248	2.056811	2.053409	2.009438	2.053559	2.049090	2.069652	2.021535	2.013901	2.002957
	II-V	2.011731	2.018382	2.074271	2.010748	2.090290	2.061891	2.023310	2.002173	2.031947	2.038322
	III-VI	2.049250	2.098125	2.038509	2.045437	2.049011	2.011993	2.076388	2.092304	2.055259	2.011886
Chassatide C2	I-IV	2.080261	2.075726	2.092397	2.060469	2.010902	2.062355	2.037794	2.029960	2.051521	2.016798
	II-V	2.029009	2.089148	2.069227	2.014533	2.089652	2.060337	2.015395	2.079977	2.050553	2.038631
	III-VI	2.008191	2.097324	2.063054	2.076827	2.074303	2.050892	2.022819	2.078017	2.014599	2.068175
Chassatide C3	I-IV	2.097021	2.087337	2.034233	2.075615	2.043126	2.064699	2.079742	2.096641	2.046205	2.049926
	II-V	2.091397	2.095881	2.011862	2.099092	2.068926	2.026322	2.059857	2.092511	2.056082	2.080821
	III-VI	2.042365	2.032325	2.012271	2.084115	2.054941	2.098018	2.086201	2.028745	2.052074	2.043494

Chassatide C4	I-IV	2.070995	2.052552	2.015278	2.044550	2.016603	2.018926	2.020941	2.027676	2.068866	2.051699
	II-V	2.010858	2.071989	2.075068	2.098414	2.012122	2.037379	2.098831	2.049691	2.081514	2.008636
	III-VI	2.024657	2.090970	2.081241	2.002577	2.049485	2.072228	2.007568	2.075079	2.065106	2.063488
Chassatide C5	I-IV	2.097828	2.092079	2.099578	2.033261	2.019760	2.097194	2.077084	2.024815	2.087908	2.051003
	II-V	2.087009	2.048428	2.081741	2.065930	2.079935	2.046230	2.091134	2.017893	2.017048	2.071249
	III-VI	2.037798	2.070840	2.096700	2.010358	2.040216	2.051458	2.053486	2.085327	2.037486	2.048578
Chassatide C6	I-IV	2.083734	2.079016	2.026425	2.048979	2.035185	2.011838	2.085315	2.084746	2.006994	2.042457
	II-V	2.067118	2.060788	2.015421	2.081645	2.071015	2.030782	2.057843	2.091190	2.059780	2.030721
	III-VI	2.065301	2.000221	2.036742	2.016022	2.096805	2.044808	2.085889	2.063024	2.010059	2.052846
Chassatide C7	I-IV	2.072448	2.073256	2.015392	2.093088	2.030560	2.095429	2.078206	2.053941	2.061105	2.029714
	II-V	2.075960	2.057200	2.093262	2.056631	2.036116	2.021098	2.000098	2.046787	2.018355	2.073259
	III-VI	2.001022	2.080306	2.021529	2.034569	2.005458	2.021681	2.089878	2.090270	2.033046	2.016706
Chassatide C8	I-IV	2.087525	2.006618	2.081705	2.007886	2.034970	2.097599	2.022729	2.054383	2.064426	2.092304
	II-V	2.018169	2.083293	2.099926	2.020058	2.084260	2.094100	2.075031	2.098484	2.077773	2.068810
	III-VI	2.016269	2.046344	2.000256	2.022560	2.026358	2.011351	2.029869	2.014269	2.084274	2.039190
Chassatide C9	I-IV	2.032871	2.000102	2.013023	2.001250	2.092404	2.061505	2.051529	2.013503	2.000269	2.012086
	II-V	2.080622	2.067615	2.003247	2.034729	2.095096	2.097455	2.002353	2.028945	2.085915	2.077510
	III-VI	2.057378	2.082688	2.012045	2.073640	2.072972	2.039731	2.059201	2.004041	2.043736	2.084202
Chassatide C10	I-IV	2.010160	2.042790	2.023593	2.050553	2.051596	2.018679	2.066759	2.075182	2.041610	2.087060
	II-V	2.055168	2.002440	2.051815	2.097265	2.003710	2.059818	2.087592	2.091769	2.052137	2.048565
	III-VI	2.073286	2.078238	2.064870	2.008751	2.031565	2.002415	2.054098	2.038170	2.093270	2.085683
Chassatide C11	I-IV	2.022627	2.042773	2.033907	2.046308	2.044308	2.000499	2.070853	2.068227	2.095592	2.018799
	II-V	2.091397	2.044309	2.050439	2.033276	2.019447	2.015818	2.041852	2.033019	2.055703	2.016029
	III-VI	2.078654	2.078000	2.017009	2.073026	2.014753	2.083830	2.029131	2.056944	2.076825	2.082867
Chassatide C12	I-IV	2.013954	2.069231	2.019915	2.040719	2.097459	2.028129	2.093593	2.035404	2.028221	2.038423
	II-V	2.054796	2.036813	2.042317	2.009664	2.045947	2.032019	2.061373	2.008251	2.072416	2.040903
	III-VI	2.095336	2.004527	2.051166	2.017819	2.007325	2.099287	2.009638	2.089878	2.066246	2.057373
Chassatide C13	I-IV	2.083100	2.021919	2.042563	2.015249	2.034855	2.015142	2.091203	2.051526	2.021521	2.006454
	II-V	2.065550	2.027050	2.089389	2.061863	2.025628	2.098365	2.030351	2.099667	2.040236	2.018505
	III-VI	2.050239	2.044406	2.029963	2.051597	2.094100	2.012510	2.039746	2.043490	2.025383	2.097318
Chassatide C14	I-IV	2.079285	2.035731	2.074166	2.081038	2.010935	2.022362	2.026087	2.048423	2.081222	2.047537
	II-V	2.067644	2.022367	2.041351	2.082674	2.058340	2.074862	2.009138	2.061048	2.000285	2.083950
	III-VI	2.078894	2.003658	2.012176	2.005332	2.094230	2.015919	2.010401	2.009829	2.004054	2.088573
Chassatide C15	I-IV	2.063520	2.092831	2.002124	2.055048	2.051090	2.086649	2.010291	2.098011	2.059980	2.091860
	II-V	2.076748	2.097895	2.030535	2.043959	2.071061	2.075739	2.018324	2.017286	2.033259	2.027971
	III-VI	2.006174	2.077675	2.005468	2.071045	2.002825	2.041287	2.029278	2.027610	2.069246	2.034038
Chassatide C16	I-IV	2.074303	2.074059	2.084723	2.096342	2.046304	2.021497	2.080665	2.080666	2.047992	2.025635

	II-V	2.047649	2.099509	2.099753	2.060032	2.068830	2.055900	2.034222	2.012266	2.037800	2.030737
	III-VI	2.038705	2.054660	2.013769	2.092326	2.003604	2.064348	2.095068	2.033631	2.055201	2.013452
Chassatide C17	I-IV	2.092262	2.079974	2.008265	2.019860	2.006625	2.087491	2.040399	2.008964	2.042020	2.013060
	II-V	2.030673	2.078540	2.068254	2.001300	2.090238	2.021219	2.007726	2.086523	2.083442	2.021719
	III-VI	2.029716	2.056155	2.070449	2.000299	2.068602	2.086212	2.017683	2.035661	2.037482	2.078342
Chassatide C18	I-IV	2.012205	2.034268	2.066061	2.013383	2.043217	2.029111	2.065118	2.030992	2.027188	2.072664
	II-V	2.078669	2.083664	2.002059	2.096813	2.073887	2.059005	2.010650	2.057623	2.098273	2.058672
	III-VI	2.043192	2.069892	2.084327	2.079839	2.072589	2.072507	2.049316	2.088240	2.095579	2.061955
Cyclopsychotride A	I-IV	2.001466	2.046774	2.055149	2.074760	2.028740	2.073463	2.044726	2.039798	2.077656	2.064777
	II-V	2.005296	2.045987	2.099641	2.086257	2.070106	2.064546	2.093635	2.074367	2.044259	2.042011
	III-VI	2.093376	2.092990	2.056739	2.098597	2.043919	2.073699	2.005547	2.076465	2.014538	2.028237
Vitria A	I-IV	2.098441	2.067914	2.055687	2.073689	2.018362	2.017282	2.011480	2.019841	2.062981	2.058968
	II-V	2.085028	2.057675	2.078150	2.040244	2.022523	2.044033	2.084984	2.074701	2.022699	2.042704
	III-VI	2.090529	2.049402	2.026179	2.053640	2.033198	2.018077	2.003515	2.052787	2.088841	2.087174
hcf-1-variant	I-IV	2.038277	2.011966	2.016161	2.082480	2.088800	2.089268	2.064971	2.098727	2.015332	2.017405
	II-V	2.090677	2.014550	2.076464	2.040980	2.066318	2.004316	2.009773	2.042192	2.094905	2.062493
	III-VI	2.065233	2.001370	2.010618	2.035617	2.079854	2.052370	2.090002	2.045282	2.049147	2.004300