

**Estudio de las interacciones entre terpenos y la enzima glucosiltransferasa del patógeno
oral streptococcus mutans**

Mario Andrés Jurado Herrera

Trabajo de grado para optar el título de Químico Ambiental

Director

Ciro Eduardo Rozo Correa

Magister en Química

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Química ambiental

2022

Dedicatoria

A mis papás gracias por tanto y perdón por tan poco.

Agradecimientos

Primeramente, doy gracias a mis padres Edgar y Sandra, sin su apoyo nunca hubiese culminado este libro. También quiero agradecer al profesor Ciro Eduardo Roza Correa director de esta tesis en su ayuda en la culminación de este trabajo.

Para finalizar agradezco a la Universidad Santo Tomás y al Grupo de Investigaciones Ambientales para el Desarrollo Sostenible por permitirme usar las maquinas LQTA3 y LQTA4 sin ellas sería imposible culminar este proceso.

Contenido

Introducción	13
1.Estudio de las interacciones entre terpenos y la enzima glucosiltransferasa del patógeno oral streptococcus mutans	16
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo general	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2.Marco referencial	17
2.1 Marco teórico	17
2.1.1 Caries dentales.....	17
2.1.2 Plantas medicinales	18
2.1.3. Generalidades acoplamiento molecular.....	20
2.1.4 Generalidades de mecánica molecular	24
2.1.5 Generalidades de la dinámica molecular	25
2.2 Estado del arte	26
2.2.1. Estructura cristalina de la enzima Glucosiltransferasa.....	26
2.2.2. Dominios de la enzima Glucosiltransferasa	28
2.2.3. Sitio activo de la enzima Glucosiltransferasa.....	30
2.2.4. Mecanismo de reacción	31
2.2.5. Estudios anteriores empleando la enzima Glucosiltransferasa y acoplamiento molecular	32
3. Metodología	35
3.1 Preparación de los ligandos.....	35

3.1.1 Construcción de las estructuras de terpenos	35
3.2 Preparación de la enzima	35
3.3 Acoplamiento molecular	36
3.4 Condiciones de acoplamiento	37
3.4.1 Programa de visualización de interacciones.....	38
3.5 Elección del programa de acoplamiento	38
3.6 Estabilidad del complejo formado	39
3.6.1 Creación de la topología de la proteína	40
3.6.2 Creación de las topologías de los ligandos.....	40
3.6.3 Construcción del complejo.....	40
3.6.4 Solvatación y adición de iones	41
3.6.5 Minimización del sistema.....	41
3.6.6 Equilibrio.....	41
3.6.7 Ejecución	42
3.6.8 Análisis.....	42
4. Resultados y discusión.....	42
4.1 Optimización de las estructuras empleadas.....	42
4.2 Selección del programa de acoplamiento.....	44
4.2.1 Vina	45
4.2.2 Smina.....	47
4.2.3 Autodock	49

4.3 Reproducción de las interacciones reportados por ligandos usados experimentalmente en la proteína glucosiltransferasa empleando los programas de acoplamiento molecular Vina, Smina y AutodockVina	50
4.4 Resultados de los acoplamientos moleculares entre los terpenos y la enzima glucosiltransferasa empleando Autodock	52
4.4.1 Resultados de las primeras tres poses- citronelal	53
4.4.2 Resultados de las primeras tres poses-Geraniol	55
4.4.3 Resultados de las primeras tres poses-Timol	57
4.5 Estructura de partida para las simulaciones de dinámica molecular	59
4.6 Solvatación de la proteína	60
4.7 Energía potencial.....	60
4.8 Equilibrado.....	61
4.9 Evaluación de la estabilidad de los complejos.....	62
4.9.1 Análisis RMSD del complejo 3AIE – Geraniol	62
4.9.2 Análisis RMSF del complejo 3AIE – Geraniol.....	64
4.9.3 Formación de enlaces de hidrógeno entre el geraniol y la enzima.....	65
5. Conclusiones.....	68
Referencias.....	70
Apéndices.....	77

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Procedimientos y parámetros seguidos para realizar el acoplamiento molecular con Autodock 4.2</i>	36
Tabla 2. <i>Procedimientos y parámetros seguidos para realizar el acoplamiento molecular con Vina y Smina</i>	37
Tabla 3. <i>Estructuras optimizadas</i>	43
Tabla 4. <i>Interacciones encontradas en los tres programas de acoplamiento</i>	45
Tabla 5. <i>Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y el ligando G-43 empleando los programas Vina, Smina y Autodock</i>	51
Tabla 6. <i>Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Citronelal</i>	53
Tabla 7. <i>Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Geraniol</i>	55
Tabla 8. <i>Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Timol</i>	57
Tabla 9. <i>Estructuras de partida empleadas para los cálculos de dinámica molecular</i>	59

Lista de figuras

Figura 1. <i>Cymbopogon martinii</i>	18
Figura 2. <i>Cymbopogon nardus</i>	19
Figura 3. <i>Thymus vulgaris</i>	20
Figura 4. Artículos de investigación empleando Autodock Vina	22
Figura 5. Artículos de investigación empleando Autodock.....	23
Figura 6. Artículos de investigación empleando Smina.....	24
Figura 7. Estructura cristalina del tetrámero de la enzima Glucosiltransferasa. Cadena A (rojo), Cadena B (Naranja), Cadena C (Azul) y Cadena D (Negro).....	27
Figura 8. Alineamiento entre las estructuras cristalinas 3AIE (rojo) y 3HZ3 (azul)	28
Figura 9. Dominios de la enzima glucosiltransferasa	29
Figura 10. Dominio A de enzima glucosiltransferasa.....	30
Figura 11. Sitio activo y aminoácidos importantes.....	31
Figura 12. Mecanismo de reacción de la síntesis de glucanos	32
Figura 13. Complejo formado por el candidato seleccionado	33
Figura 14. Complejo formado por G-43 y la enzima	34
Figura 15. Sitio de acoplamiento	38
Figura 16. Resultado del acoplamiento molecular de la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)	46
Figura 17. Interacciones encontradas entre la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR).....	46
Figura 18. Resultado del acoplamiento molecular de la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)	47

Figura 19. <i>Interacciones encontradas entre la proteína enzima (3AIE) y el ligando α-acarbosa (ACR)</i>	48
Figura 20. <i>Resultado del acoplamiento molecular de la enzima glucosiltransferasa (3AIE) y el ligando α-acarbosa (ACR)</i>	49
Figura 21. <i>Interacciones encontradas entre la enzima glucosiltransferasa (3AIE) y el ligando α-acarbosa (ACR)</i>	50
Figura 22. <i>Proteína solvatada</i>	60
Figura 23. <i>Resultado de energía de minimización de enzima y los ligandos</i>	61
Figura 24. <i>RMSD de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses de los terpenos geraniol (A), citronelal (B) y timol (C)</i>	63
Figura 25. <i>RMSF de la enzima sin ligando y de los complejos 3AIE-geraniol (A), 3AIE-Citronela (B) y 3AIE-Timol (C)</i>	65
Figura 26. <i>Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 477 pse-1</i>	66
Figura 27. <i>Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 477 pse-2</i>	67
Figura 28. <i>Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 588 pse-3</i>	67

Lista de apéndices

Apendice A. <i>Propiedades fisicoquímicas de las dinámicas moleculares</i>	77
Apendice B. <i>Componentes mayoritarios de los aceites esenciales Cymbopogon nardus, Cymbopogon martinii y Thymus vulgaris</i>	81
Apendice C. <i>Condiciones de acoplamiento</i>	82
Apendice D. <i>RMSD de los complejos formados</i>	83
Apendice E. <i>Apéndice E RMSF de los complejos formados</i>	84
Apendice F. <i>Formación de puentes de hidrógeno</i>	85
Apendice G. <i>Formación de enlaces de hidrógeno</i>	88
Apendice H. <i>Parámetros utilizados para realizar la simulación</i>	89

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron las interacciones no covalentes entre los terpenos citronelal geraniol y timol contra la enzima glucosiltransferasa(GTFS) de un patógeno oral conocido como *streptococcus mutans* uno de los responsables de las caries dentales.

La principal función de la enzima GTFS es sintetizar glucano a partir de la sacarosa desencadenando la desmineralización de los dientes lo que conlleva a la colonización de las caries.

Por esta razón esta enzima es de gran interés para control de las caries dentales.

Para evaluar las interacciones se utilizó técnicas computacionales como el acoplamiento molecular y dinámica molecular.

Con el fin de seleccionar el mejor programa de acoplamiento se evaluaron tres programas conocidos como Autodock, Vina y Smina, donde se encontró que el programa Autodock logró reproducir las interacciones del ligando original. Además, este mismo programa logró reproducir las interacciones de otro ligando que fue empleado en un estudio teórico práctico.

Después de seleccionar el programa se realizó la optimización de los terpenos y se ejecutó el acoplamiento con cada estructura. Se seleccionaron las tres primeras poses del resultado de cada acoplamiento y se encontró que esas poses presentaban en su mayoría las interacciones reportadas en la literatura.

Con las tres primeras poses de cada ligando se realizó la dinámica molecular durante diez nanosegundos donde se encontró que, al incorporar los terpenos dentro de la proteína, esta adquiría estabilidad.

Palabras Claves: acoplamiento molecular, *streptococcus mutans*, dinámica molecular, modo de unión, energía de interacción

Abstract

In the present work, the non-covalent interactions between the terpenes citronellal, geraniol and thymol against the enzyme glucosyltransferase (GTFS) of an oral pathogen known as streptococcus mutans, one of those responsible for dental caries.

The main function of the GTFS enzyme is to synthesize glucan from sucrose, triggering the demineralization of the teeth, which leads to the colonization of caries. For this reason, this enzyme is of great interest for the control of dental caries.

To evaluate the interactions, computational techniques such as molecular maintenance and molecular dynamics were modified.

In order to select the best activation program, three programs known as Autodock, Vina and Smina were evaluated, where it was found that the Autodock program will reproduce the interactions of the original ligand. In addition, this same program will reproduce the interactions of another ligand that was used in a practical theoretical study.

After selecting the program, the optimization of the terpenes was carried out and the protocol was executed with each structure. The first three poses of the result of each of them were selected and it was found that these poses presented mostly the interactions reported in the literature.

With the first three poses of each ligand, molecular dynamics was performed for ten nanoseconds where it was found that, by incorporating the terpenes into the protein, it would acquire stability.

Keywords: molecular coupling, streptococcus mutans, molecular dynamics, binding mode, interaction energy

Introducción

Las caries dentales son un problema de salud pública, ya que, según la organización mundial de la salud (OMS) afecta tanto a niños, jóvenes y adultos (Tofiño-Rivera et al, 2016). En Colombia un estudio de salud bucal muestra cómo afecta las caries dentales a la población. En este estudio se evidencia la problemática planteada por la OMS, incluso manifiesta que con el transcurrir de los años las caries dentales se vuelven una enfermedad de mayor cuidado. (Ministerio de salud (MINSALUD), 2012).

Las caries dentales es una enfermedad causada principalmente por un patógeno bacteriano conocido como *Streptococcus mutans*, el cual utiliza carbohidratos para producir ácido láctico, desencadenando la desmineralización del diente y permitiendo la adherencia de otros organismos (Pan et al, 2015; Selwitz et al, 2007). El mecanismo del patógeno consiste en secretar glucosiltransferasa, la cual es una proteína que sintetiza glucanos solubles a partir de sacarosa mediante la reacción de transglucosilación, permitiendo la adherencia al diente y la creación de placa dental. Por esta razón la glucosiltransferasa es una proteína de gran interés para el desarrollo de fármacos que prevengan las caries dentales (Ren et al, 2016).

Esta enfermedad es considerada un problema para el sistema de salud de los países, puesto que, su tratamiento es costoso. Además, en los países en vía de desarrollo el sistema de salud es ineficiente y no llega a todos los sectores que lo necesitan. Lo que conlleva al aumento de las caries dentales en sectores aislados de las zonas metropolitanas.

La OMS considera que los mejores tratamientos para prevenir las caries dentales son el cepillado frecuente y el uso de hilo dental. Además, para tratar esta enfermedad se utilizan sustancias fluoradas y enjuagues bucales con clorhexina (Tofiño-Rivera et al, 2016). Las

sustancias fluoradas y enjuagues bucales pueden generar efectos secundarios como hipersensibilidad y fluorosis dental (Ochoa et al, 2017).

De acuerdo con lo anterior, es necesario aumentar el número de tratamientos para contrarrestar al patógeno responsable de las caries dentales. Es debido a esto que, desde hace varios años las plantas y sus metabolitos secundarios entre ellos los aceites esenciales, son ampliamente estudiados. Entre las plantas se encuentran *Lippia alba*, *Cymbopogon nardus*, *Punica granatum*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Mikania genus* y *Cymbopogon Martini* entre otras (Carvalho et al, 2012).

Thymus vulgaris una planta de la familia de las labiadas, es usado principalmente como un ingrediente para cocinar y como planta medicinal. Estudios recientes mostraron como los componentes polifenólicos disminuyen la adherencia a la superficie del diente por parte del patógeno oral *streptococcus mutans* (Al-asmari et al., 2017).

Cymbopogon nardus y *Cymbopogon martini* llamadas popularmente como citronela y palmarosa pertenecen a la familia *Poacea* y comparten efectos antisépticos y antibacterianos, además de ser potenciales candidatos contra los microorganismos relacionados con las caries dentales (Cáceres et al., 2020).

Un estudio reciente mostró que el aceite esencial de *Lippia alba* presentó una inhibición del 95,8 % de la placa bacteriana, mientras que para un aceite esencial de *Cymbopogon citratus* a la misma concentración presenta una inhibición de 95,4 % (Tofiño-Rivera et al, 2016)

Una forma de aumentar el número de sustancias con potencial actividad de una manera más económica es empleando las técnicas de la química computacional. Dos de las técnicas computacionales más importantes en el diseño de fármacos asistido por computadora son el acoplamiento molecular y dinámica molecular (Santos et al, 2019). La primera herramienta busca

la mejor conformación de una molécula en el sitio catalítico de una proteína diana y la segunda herramienta, considera tanto la proteína como el ligando como estructuras flexibles y permite conocer las posibles interacciones que se generan entre la proteína y el ligando en un tiempo corto.

Por tanto, en el presente trabajo se estudió las interacciones que ocurren entre los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Cymbopogon martinii*, *Thymus vulgaris* y *Cymbopogon nardus* frente a la proteína glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans* empleando técnicas computacionales tales como acoplamiento y dinámica moleculares.

1. Estudio de las interacciones entre terpenos y la enzima glucosiltransferasa del patógeno oral streptococcus mutans

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Realizar un estudio de las interacciones entre los terpenos Geraniol, citronela y tymol de los aceites esenciales de *Cymbopogon marntinii*, *Cymbopogon nardus* y *Thymus vulgaris*, respectivamente y la enzima glucosiltransferasa del patógeno oral *Streptococcus mutans* empleando técnicas computacionales como acoplamiento y dinámica moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

Optimizar la metodología de acoplamiento molecular para el estudio de las interacciones de los terpenos Geraniol, citronela y timol y la enzima glucosiltransferasa del patógeno oral *Streptococcus mutans*.

Evaluar la estabilidad de los complejos terpeno-enzima mediante un análisis de dinámica molecular.

2. Marco referencial

2.1 Marco teórico

2.1.1 Caries dentales

Las caries dentales son una enfermedad multifactorial que afecta toda la superficie del diente. Ahora bien, la formación de caries dentales se ve afectada por factores como la educación, la clase social y la dieta, lo que desencadena en el rompimiento del equilibrio entre la placa dental y la ecología bucal. Existen lugares en la cavidad bucal con mayor protección de la actividad mecánica de la lengua y especialmente del cepillado. Dichos lugares permiten que la placa bacteriana se establezca por un tiempo más prolongado (Fejerskov, 2004).

Los lugares protegidos se conocen como fisuras, hoyos y superficies oclusales. En estos sitios se desarrolla y madura la placa dental, prerequisite para la formación de caries. Aunque la formación de placa dental es un proceso natural y secuencial de la cavidad bucal, es esencial para la formación de las lesiones cariosas (Kidd, 2005).

Las enzimas glucansucrasas (GTF) o glucosiltransferasa (GTFS) pertenece a la familia de las glucosidasas (GH) 70. Es secretada por el patógeno oral *Streptococcus mutans* y son enzimas extracelulares que catalizan la formación de glucanos a partir de sacarosa. De igual forma las GTF son clasificadas en cuatro tipos diferentes según la naturaleza del enlace glicosídico: mutansucrasas α (1-3), dextransucrasa α (1-6), alternansacarasa α (1-3 y 1-6) y reuterasacarasa α (1-4 y 1-6) (Hamada & Slade, 1980).

En la cavidad bucal la síntesis de glucano se desarrolla por tres glucosiltransferasas conocidas como: GTF-I, GTF-SI, que son mutansucrasas que sintetizan glucanos insolubles y la

GTF-S que es una dextransucrasa que sintetiza glucano soluble con enlace glucosídico α (1-6) (Leemhuis et al, 2013).

2.1.2 Plantas medicinales

Son consideradas plantas medicinales aquellas que curen, prevengan o combatan las dolencias generadas en alguna parte del cuerpo, sin embargo, no toda la planta posee propiedades medicinales, algunas veces solo es usado una pequeña parte de ella como por ejemplo el fruto, las hojas, la raíz entre otras (Santillán, 2015).

El conocimiento de las plantas medicinales se remonta a las generaciones pasadas que aprendieron a distinguir entre las plantas que servían para su alimento de las que realizaban algún efecto en su organismo. Este conocimiento se transmitió de generación en generación hasta llegar a la actualidad (Santillán, 2015).

2.1.2.1 Cymbopogon martinii. *Cymbopogon martinii* pertenece a la familia *Poacea* y género *Cymbopogon*. Es una planta ampliamente cultivada en el sur de Asia, especialmente en India donde son aprovechados sus metabolitos secundarios para la industria, especialmente los aceites esenciales presentes en el tallo y sus hojas (Cáceres et al, 2020).

Figura 1. *Cymbopogon martinii*



Adaptado de Cáceres et al (2020)

Esta planta es conocida popularmente como Palmarosa (figura 1) y es usada como agente antibacteriano, antioxidante, antiinflamatorio (Freires et al, 2015). Su principal componente en el aceite esencial es un monoterpeno acíclico llamado geraniol. Es muy abundante en gran variedad de plantas, pero en *Cymbopogon martinii* se encuentra en un porcentaje alto que oscila entre 38.7 y 40 % (Teles et al, 2014).

2.1.2.2 Cymbopogon nardus. *Cymbopogon nardus* pertenece a la familia *Poacea* y el género *Cymbopogon*. Es cultivada en diferentes regiones del mundo entre ellas Sur América, África y Asia. En esos lugares su aceite esencial es extraído principalmente de sus hojas largas y anchas (Carvalho et al, 2012).

Figura 2. *Cymbopogon nardus*



Adaptado de Carvalho et al (2012)

Es conocida popularmente como citronela (figura 2) y posee propiedades antimicrobianas y es usado por la comunidad como repelente natural. Su principal componente se encuentra entre el 30 y 40% del aceite y recibe el nombre de citronelal (Carvalho et al, 2012).

2.1.2.3 Thymus vulgaris. *Thymus vulgaris* es un arbusto que pertenece a la familia *Labiata* y al género *Thymus*. Se cultiva en diferentes partes del mundo debido a su uso farmacéutico y culinario. Esta planta es conocida

Popular mente como tomillo y es implementada en la medicina popular como agente expectorante y antioxidante. El aceite esencial de tomillo presenta un componente mayoritario llamado timol que se encuentra entre 38 y 40 % (Al-asmari et al., 2017).

Figura 3. *Thymus vulgaris*



Adaptado de Al-asmari et al (2017)

2.1.3. Generalidades acoplamiento molecular

Acoplamiento molecular es una herramienta que ha llamado la atención de la comunidad científica, que vieron en ella aplicabilidad multidisciplinaria. Integra los avances en biología molecular, biotecnología, bioinformática y matemáticas para evaluar las interacciones que pueden generarse entre un receptor por ejemplo una proteína y una pequeña molécula con múltiples características y propiedades llamada ligando (Gupta et al, 2018 ; Lipinski et al, 2012).

El acoplamiento molecular es de tres tipos: acoplamiento rígido, acoplamiento flexible y acoplamiento híbrido. El primero es el acoplamiento rígido, como su nombre lo dice, tanto el receptor como el ligando se encuentran rígidos y los grados de libertad son nulos. El segundo es el acoplamiento flexible, en este tipo de acoplamiento tanto la proteína como el ligando no tienen

restringido el movimiento y son los más ampliamente usados en la actualidad, pero su costo computacional es elevado. El último tipo de acoplamiento es el híbrido, en esta ocasión la proteína se encuentra rígida y el ligando cuenta con un número restringido de grados de libertad, si se comparan los tres tipos de acoplamiento el más confiable y rápido es el acoplamiento híbrido (Trott & Olson, 2012).

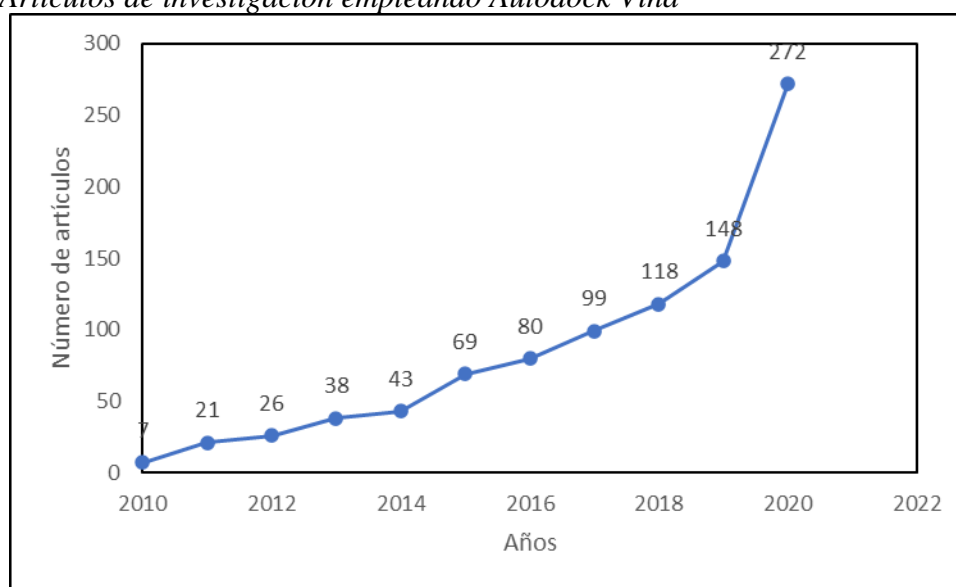
Los requisitos esenciales para realizar cualquier acoplamiento anterior dependen de varios aspectos como: Si se encuentra en la literatura la estructura cristalina de interés o si por el contrario no se encuentra resuelta o reportado en alguna base de datos. Si la estructura terciaria de la proteína no se encuentra reportada se debe realizar otro tratamiento más profundo conocido como modelamiento por homología. Por el contrario si la estructura se encuentra en la base de datos, se disminuye la complejidad del proceso y solo es necesario descargarla y realizar el refinamiento de la proteína (Kumar & Kumar, 2019).

La principal aplicación que tiene el acoplamiento molecular es el diseño de fármacos, gracias al acoplamiento se pueden analizar bibliotecas de moléculas que podrían tener actividad biológica. En la actualidad el acoplamiento molecular tiene un renacimiento, primero por el avance de técnicas experimentales que permitieron aislar proteínas y segundo por la sistematización de toda la información obtenida de las técnicas experimentales las cuales están condensadas en una gran cantidad de base de datos (Gupta et al, 2018 ; Amaro et al, 2018).

Para realizar el acoplamiento molecular se emplean los softwares de acoplamiento, los cuales tienen un algoritmo que se encarga de encontrar el sitio de unión y la conformación más probable del ligando. Los softwares más citados son GOLD y AutoDock pero esto no implica que sean los más precisos, posiblemente lo que hace que estos programas sean los más citados es que son gratuitos, amigables y de fácil acceso (Chen, 2015).

2.1.3.1 Autodock Vina. Autodock Vina es un programa de acoplamiento molecular desarrollado por (Trott, O., & Olson, 2012) en el Instituto de Investigación Scripps en California. Es un programa de código abierto que cualquier investigador puede usar y modificar, por esta razón y otras ventajas que serán mencionadas en brevedad es un programa muy usado para realizar acoplamiento molecular, lo anterior se puede observar en la siguiente figura.

Figura 4. *Artículos de investigación empleando Autodock Vina*



Como se mencionó anteriormente Vina tiene ventajas considerables sobre algunos programas de acoplamiento algunas de estas ventajas se mencionan a continuación.

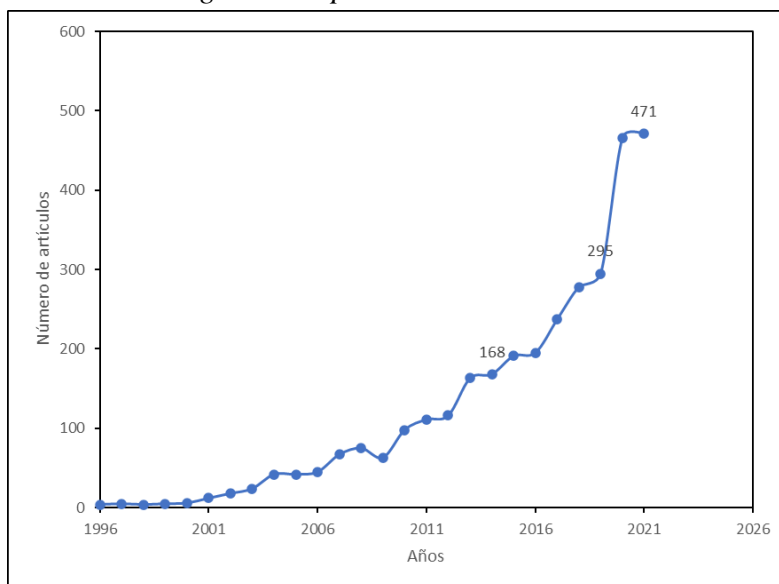
- Genera automáticamente los mapas de cuadrícula del receptor y del ligando
- Agrupa los resultados de los acoplamientos de manera que su tratamiento es mucho más agradable, comparado con Smina y Autodock donde el archivo de salida muestra todas las conformaciones desde la de mayor energía hasta la de menor energía
- La función de puntuación combina potenciales basados en conocimiento que aumentan la velocidad y la robustez del programa.

2.1.3.2 Autodock. Autodock 4 es un programa de acoplamiento desarrollado por (Morris y Olson, 2009) en el instituto de Investigación Scripps, al igual que Vina es de código libre y usado como primera opción por investigadores gracias a su precisión, gran versatilidad y la opción de realizar algunos procesos como generar los mapas de cuadrícula de la proteína mediante la interfaz gráfica llamada AutodockTools.

La primera versión que fue desarrollada de Autodock fue en 1996 desde entonces y con la aparición de la interfaz gráfica empleada para facilitar la formación de los archivos de entrada para el acoplamiento han incrementado de gran manera el número de publicaciones en las revistas académicas.

Lo anterior se evidencia en la siguiente gráfica que muestra el número de publicaciones que se hacen por año en las revistas académicas usando el programa Autodock

Figura 5. *Artículos de investigación empleando Autodock*

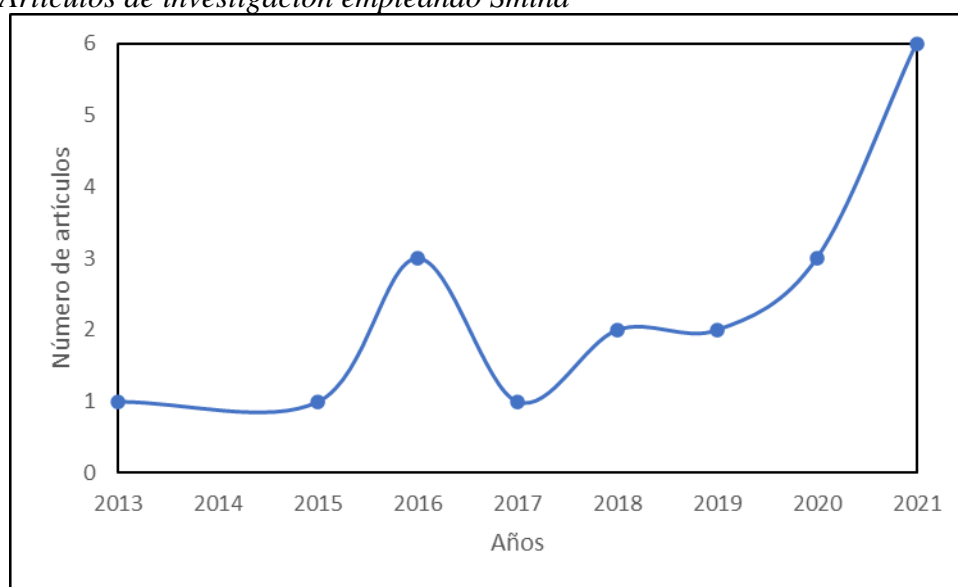


2.1.3.3 Smina. es un programa desarrollado por (Koes et al., 2013), este programa es una variación de Autodock Vina que busca mejorar la minimización y la puntuación de los

acoplamientos. Para lograr lo anterior. La variación buscaba mejorar la minimización y la puntuación de los acoplamientos.

En la siguiente grafica se muestra el número de publicaciones que se han realizado usando Smina. Comparado con los otros dos programas anteriormente mencionados Smina es el programa que ha sido menos citado por la comunidad científica.

Figura 6. *Artículos de investigación empleando Smina*



2.1.4 Generalidades de mecánica molecular

En el estudio de sistemas químicos existen en la actualidad diferentes métodos de cálculo que me permiten abordar estos fenómenos. Un gran método que posee algunas ventajas, pero también desventajas como cualquier otra técnica es la mecánica molecular. Una principal ventaja es la rapidez con la que realiza los cálculos comparada con los métodos cuánticos, además la capacidad de estudiar sistemas grandes que serían imposibles con los métodos cuánticos. La principal desventaja que posee la mecánica molecular es que al ser un método clásico no resuelve

la ecuación de Schödinger por este motivo procesos que impliquen rompimiento y formación de enlaces no se pueden estudiar.

La mecánica molecular al ser un método clásico considera a los átomos como bolas y los enlaces como resortes. Tanto los átomos como los enlaces se resisten a las variaciones, por ejemplo, los enlaces se resisten a ser deformados y los átomos se resisten a estar todos juntos por esta razón la geometría de este sistema está relacionada con la energía de las moléculas, ya que una variación en la distancia entre las moléculas aumentaría o disminuiría la energía.

2.1.5 Generalidades de la dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular tienen aspectos muy parecidos a los experimentos reales. Cuando se desarrolla un experimento en el laboratorio se selecciona una muestra que se quiera estudiar, esa muestra se pasa por un instrumento de medida (Termómetro, manómetro, entre otros) y se realiza la medición durante un periodo de tiempo (Schwartz et al, 2012).

El mismo enfoque sigue la dinámica molecular, primero se selecciona un sistema de estudio que tiene N partículas y para cada partícula se resuelve las ecuaciones del movimiento de Newton hasta lograr que las propiedades del sistema no cambien con el tiempo ósea lograr el equilibrio.

La dinámica molecular (DM) es una herramienta ampliamente utilizada en los procesos dinámicos de sistemas biológicos complejos como lo son: estabilidad de proteínas, cambios conformacionales, entre otros (Aceves, 2018 ; Botan et al, 2015).

Los primeros en emplear la DM fueron Alder and Wainwright en la década de los 50, pero fue en la década de los 80 con los avances de las computadoras y las técnicas experimentales que la DM fue más empleada (Leach, 2001 ; Jiménez, 2002).

A diferencia de los métodos experimentales que muestran información estructural promedio, la simulación de dinámica molecular permite explorar la evolución en el tiempo de esos sistemas. Para realizar lo anterior, la DM se basa en principios de la mecánica clásica, la cual permite separar los movimientos del núcleo y el electrón. Teniendo en cuenta que la masa del núcleo es muy superior a la del electrón y éstos se adaptan a los cambios de posición de los núcleos. Además, sigue la segunda ley del movimiento de Newton; por esto la DM es considerado un método determinístico (Valderrama, 2009).

El objetivo que busca cumplir la dinámica molecular es hacer una trayectoria de puntos que evolucionan en el tiempo, cada punto puede predecir el siguiente estado, de esta forma se obtienen una gran cantidad de detalles que explican el sistema biológico (Bueren-Calabuig, 2014).

2.2 Estado del arte

2.2.1. Estructura cristalina de la enzima Glucosiltransferasa

La estructura cristalina de la enzima glucosiltransferasa fue resuelta por un grupo japonés en el año 2011 (Ito et al, 2011). La estructura de la enzima forma un tetrámero en el cristal (ver figura 7), pero según los análisis realizados de cromatografía de exclusión de tamaño por este mismo grupo asiático, en solución la enzima es un monómero (Ito et al, 2011).

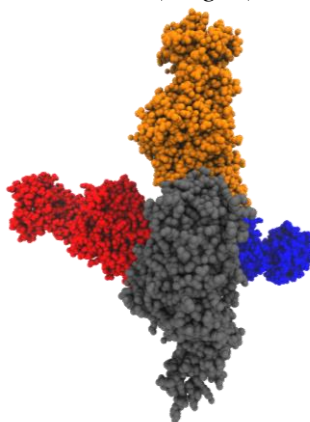
Además de resolver la enzima silvestre, obtuvieron el complejo con α -acarboza y maltosa. Las estructuras de la glucosiltransferasa se encuentran almacenada en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con los códigos 3AIC, 3AIB y 3AIE.

2.2.1.1 3AIC. La enzima 3AIC está compuesta por cuatro cadenas, cada una con aproximadamente 844 aminoácidos, forma un complejo con α -acarbosa con cada cadena. Según lo reportado por (Ito et al, 2011), esta proteína tiene una resolución de 3.11 Å y la calidad de las cadenas varían entre 57 a 66 % (Ito et al, 2011).

2.2.1.2 3AIB. La enzima 3AIC está compuesta por cuatro cadenas, cada una con aproximadamente 844 aminoácidos, forma un complejo con maltosa con cada cadena. Según lo reportado en el artículo del grupo japonés, esta proteína tiene una resolución de 3.09 Å y la calidad de las cadenas varían entre 52 a 71 % (Ito et al, 2011).

2.2.1.3 3AIE. La enzima 3AIC está compuesta por cuatro cadenas, cada una con aproximadamente 844 aminoácidos, no forma complejo, es considerada por el autor como la proteína salvaje. Según lo reportado en el artículo del grupo japonés, esta proteína tiene una resolución de 2.10 Å y la calidad de las cadenas varían entre 81 a 84 % (Ito et al, 2011).

Figura 7. Estructura cristalina del tetrámero de la enzima Glucosiltransferasa. Cadena A (rojo), Cadena B (Naranja), Cadena C (Azul) y Cadena D (Negro)



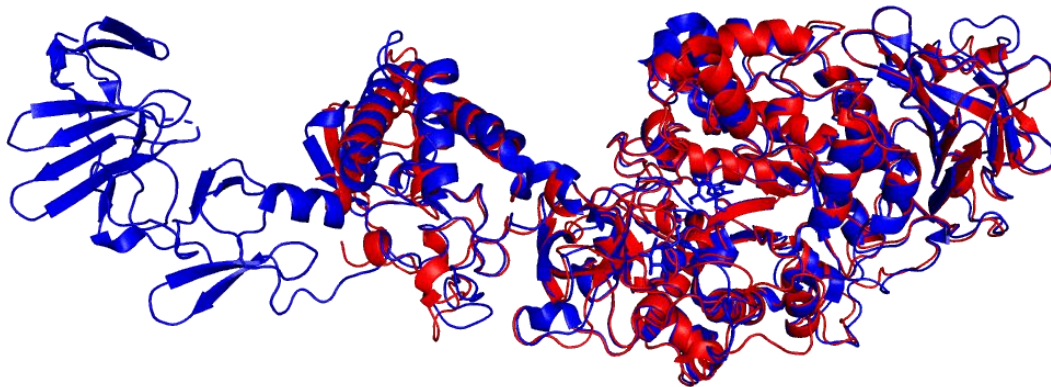
Adaptada de Ito et al (2011)

2.2.2. Dominios de la enzima Glucosiltransferasa

Como se mencionó anteriormente la enzima glucosiltransferasa pertenece a la familia de las glucosidasas (GH) 70. Este grupo de enzimas tienen en común la presencia de cinco dominios denotados como dominio A, dominio B, dominio C, dominio IV y dominio V (Ito et al, 2011) (Jaña, 2018).

En la enzima glucosiltransferasa no lograron resolver la estructura del dominio V. Tal dominio no es importante para que la enzima realice la actividad sin embargo un grupo de Chile (Jaña, 2018) logró simular el dominio V empleando modelamiento por homología, usando como modelo la estructura cristalina de *L. reuteri* reportada en la base de datos como 3HZ3 (Osorio et al, 2018).

Figura 8. Alineamiento entre las estructuras cristalinas 3AIE (rojo) y 3HZ3 (azul)

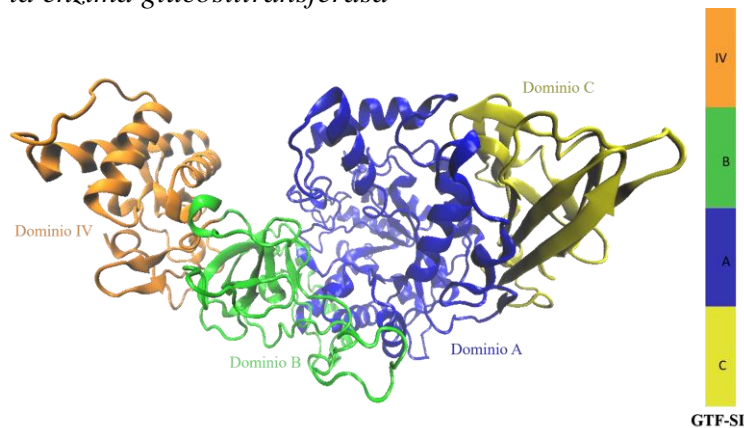


Adaptado de Osorio et al (2018)

En la figura 8 se observan dos cosas, primero el dominio V, faltante en la estructura cristalina de la enzima glucosiltransferasa y segundo la gran similitud entre las dos estructuras, sin embargo, el porcentaje de identidad es de 20 % (Osorio et al, 2018).

2.2.2.1 Dominio A. El dominio A está compuesto por dos regiones de cadenas polipeptídicas. La primera cadena contiene los aminoácidos que van desde (443 – 692) y la segunda cadena va desde (829 - 961), (Leemhuis et al., 2013) ver figura 9.

Figura 9. *Dominios de la enzima glucosiltransferasa*



Adaptado de Leemhuis et al (2013)

2.2.2.2 Dominio B. Está compuesto por dos regiones de cadenas polipeptídicas. La primera cadena contiene los aminoácidos que van desde (373 – 442) y la segunda cadena va desde (962 - 1056), (Leemhuis et al., 2013) ver figura 9.

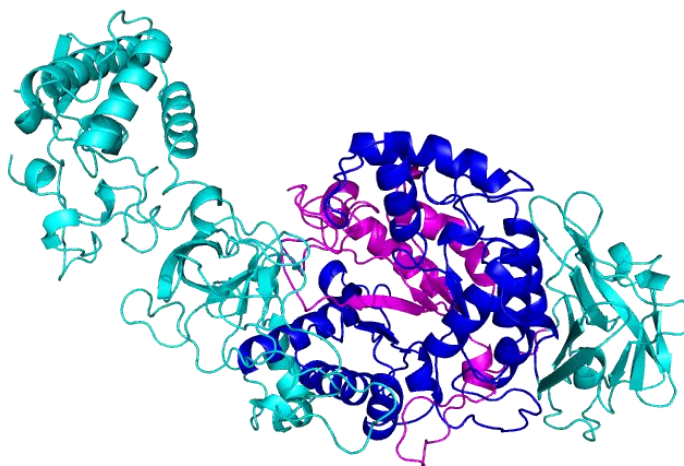
2.2.2.3 Dominio IV. Está compuesto por dos regiones de cadenas polipeptídicas. La primera cadena contiene los aminoácidos que van desde (244 – 372) y la segunda cadena va desde (1057 - 1087), (Leemhuis et al., 2013) ver figura 9.

2.2.2.4 Dominio C. Es diferente a los otros tres dominios, ya que, está compuesto por una sola cadena polipeptídica que contiene los aminoácidos que van (693 – 828) (Leemhuis et al., 2013) ver figura 9.

2.2.3. Sitio activo de la enzima Glucosiltransferasa

El sitio activo de la enzima glucosiltransferasa está ubicado en el dominio A. Está compuesto por un $(\frac{\beta}{\alpha})_8$, donde se encuentran los aminoácidos del sitio catalítico. Estos aminoácidos son aspartato 477 (D), glutamato 515 (E) y aspartato 588 (D) (Leemhuis et al., 2013; Ito et al, 2011).

Figura 10. Dominio A de enzima glucosiltransferasa



Adaptada de Leemhuis et al (2013)

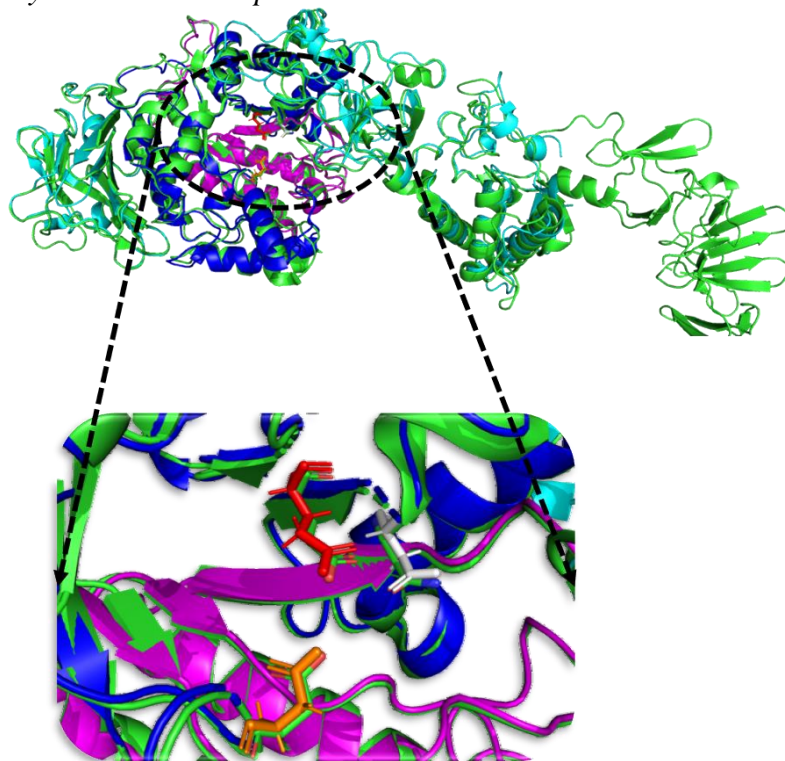
En la figura 10 se muestra la estructura de la enzima glucosiltransferasa y se resalta en colores azul y magenta el dominio A. En la mitad de esas dos cadenas polipeptídicas se encuentra el barril $(\frac{\beta}{\alpha})_8$ (Leemhuis et al., 2013).

En un estudio anterior de la Universidad Andrés Bello de Chile compararon las estructuras cristalinas glucosiltransferasa y *Bacillus licheniformis* α -amylasa. Encontraron que el dominio catalítico de estas dos proteínas se conserva (Leemhuis et al., 2013).

En la figura 11 se representa el sitio catalítico de las proteínas mencionadas anteriormente, en color blanco se representa el aspartato 477, en color rojo se encuentra el glutamato 515 y en

color naranja el aspartato 588. En color verde se representan los aminoácidos responsables de la catálisis de la enzima *Bacillus licheniformis* α -amilasa (Osorio et al, 2018).

Figura 11. *Sitio activo y aminoácidos importantes*



Adaptado de Osorio et al (2018)

2.2.4. Mecanismo de reacción

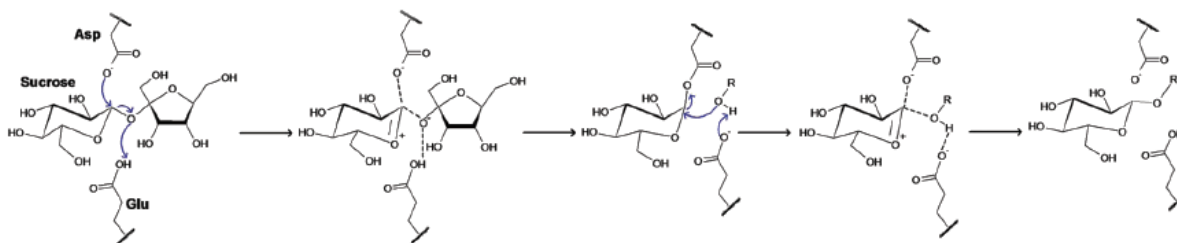
La enzima glucosiltransferasa pertenece al clan de las GH-H que lo conforman las familias GH77 y GH13. Los miembros de este clan comparten un mecanismo similar que es conocido como doble desplazamiento. Tal mecanismo necesita tres aminoácidos específicos, dos de estos son aspartatos y un glutamato (Jaña, 2018; Osorio et al., 2018).

2.2.4.1 Etapas del mecanismo de reacción. La primera etapa del mecanismo consiste en la unión del sustrato de sacarosa y la ruptura del enlace glicosídico α (1 \rightarrow 2) entre los restos glucosil y fructosil (TS) (Ito et al., 2011; Jaña, 2018; Sánchez et al., 2019).

La ruptura del enlace glucosídico se da por el ataque nucleofílico del residuo aspartato en el carbono anomérico de la sacarosa. Simultáneamente se produce la protonación del oxígeno por un ácido glutámico (Ito et al., 2011; Jaña, 2018; Sánchez et al., 2019).

En la segunda parte del mecanismo ocurre la transglucosilación, donde se desprende el grupo fructosil y llega un nuevo aceptor de glucosa que es desprotonado por el ácido glutámico actuando como base. El aceptor ataca el estado covalente formado por el residuo aspartato y la glucosa, desplazando el aspartato. En este momento se repetiría el paso 1 y se formaría el producto α -glucosilado (Ito et al., 2011; Jaña, 2018; Sánchez et al., 2019).

Figura 12. *Mecanismo de reacción de la síntesis de glucanos*



Adaptado de Jaña (2018)

2.2.5. Estudios anteriores empleando la enzima Glucosiltransferasa y acoplamiento molecular

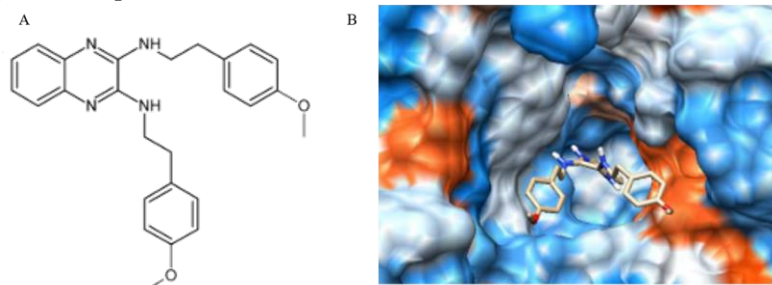
Después de determinar la estructura cristalina por - (Ito et al., 2011), se han realizado algunos estudios empleando esta enzima.

Uno de esos estudios es el realizado por el laboratorio de enfermedades orales del oeste de China. Ellos evaluaron una biblioteca de aproximadamente 150,000 compuestos de la base de datos ZINC (Ren et al., 2016).

El procesamiento de esa biblioteca lo realizaron usando cribado virtual, empleando el programa UCSF Dock (versión 6.4) el cual es de código libre. Para realizar los acoplamientos

moleculares emplearon la estructura cristalina encontrada en la PDB como 3AIC, esta estructura es la de menor resolución (3.11 Å) y la de menor calidad en sus cadenas (57 a 67 %) (Ren et al., 2016).

Figura 13. Complejo formado por el candidato seleccionado



Adaptado de Ren et al (2016)

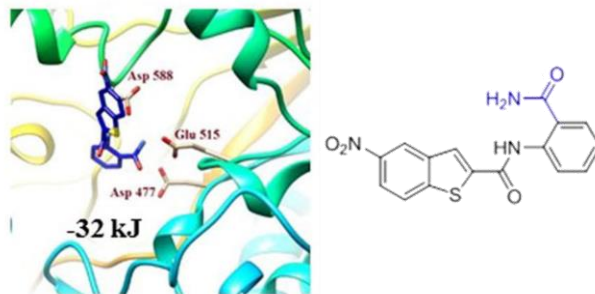
Los resultados obtenidos después de procesar la biblioteca de compuestos comerciales muestran un candidato llamado 2-(4-metoxifenil)-N-(3-{[2-(4-metoxifenil)etil]imina}-1,4-dihydro-2-quinoxalinyldene)etilamina (ver figura 13). Este compuesto fue sintetizado y mostró que disminuye la producción de glucanos extracelulares (Ren et al., 2016).

En un estudio similar realizado por el departamento de odontología pediátrica de la Universidad de Alabama, emplearon una biblioteca de compuestos de uso comercial más grande, aproximadamente 500.00 compuestos reportados en la base de datos ZINC (Zhang et al, 2017).

En esta ocasión emplearon otro tipo de programa para realizar el cribado virtual llamado Flexx, el cual es un programa licenciado. Este estudio a diferencia del anterior muestra en sus acoplamientos las interacciones que realiza el compuesto con los residuos importantes del sitio activo de la enzima ver figura 14 (Zhang et al, 2017).

El resultado de cribado generó siete posibles candidatos para inhibir la actividad de la enzima glucosiltransferasa, sin embargo solo un compuesto inhibió la formación de placa dental en un modelo *in vivo* de ratas (ver figura 14) (Zhang et al, 2017).

Figura 14. Complejo formado por G-43 y la enzima



En los estudios anteriores no se usaron productos naturales, en principio, fueron compuestos que están disponibles comercialmente. En el siguiente estudio se usó el mayor componente polifenólico presente en el té verde llamado *epigallocatequin galato* (EGCG) (Islam et al, 2020).

Para realizar la investigación, ellos descargaron la estructura de EGCG de la base de datos NCBI y usaron la estructura cristalina de la enzima glucosiltransferasa reportada en la base de datos PDB con el código 3AIB. Esta estructura tiene una resolución de 3.09 Å y la calidad de las cadenas varían entre 52 a 71 %.

Los resultados mostraron que el EGCG además de inhibir la formación de la placa dental, interactúa con el glutamato 515 de la enzima y de esta forma no permite el rompimiento del enlace glucosídico que es el primer paso del mecanismo de reacción de la enzima (Islam et al, 2020).

3. Metodología

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizaron dos procedimientos, el primero consistió en la realización del acoplamiento molecular para seleccionar el programa de acoplamiento que mejor prediga la interacción ligando-proteína y el segundo evaluar los complejos formados durante un periodo de tiempo de 10 ns y las interacciones presentes.

3.1 Preparación de los ligandos

3.1.1 Construcción de las estructuras de terpenos

Las estructuras seleccionadas fueron construidas en el programa Avogadro 1.2.0 (Hanwell et al., 2012) y se guardaron en formato de Gaussian. Usando estos archivos se procedió a optimizar las estructuras con la Teoría de los funcionales de la densidad empleando el funcional híbrido de intercambio y correlación B3LYP, esto se realizó con el programa Gaussian09 (Foresman & Frisch, 2009).

3.2 Preparación de la enzima

Antes de realizar los acoplamientos, la enzima pasará por una serie de pasos que son requisito primordial cuando se aplica esta técnica computacional. El primer paso consistió en eliminar todas las moléculas de agua presentes en la enzima y los ligandos que ayudaron a su cristalización. En el segundo paso se empleó el campo de fuerza CHARMM36 para adicionar los hidrógenos a la proteína. Este campo de fuerza contiene los parámetros necesarios para las proteínas y es uno de los más usados por agregar todos los hidrógenos.

3.3 Acoplamiento molecular

Después de la construcción y optimización de las estructuras de los terpenos y cumplir con los requisitos previos de la proteína, se realizó el acoplamiento molecular entre los terpenos y la enzima glucosiltransferasa empleando los programas Autodock, Vina y Smina, como herramienta de preparación y visualización AutodockTools (Trott, O., & Olson, 2012), como se muestran en la siguiente tabla 1 y 2.

Tabla 1. *Procedimientos y parámetros seguidos para realizar el acoplamiento molecular con Autodock 4.2*

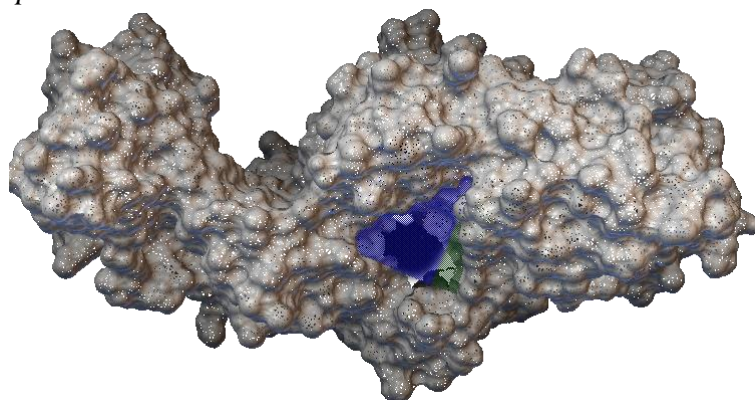
Procedimiento	Programa	Parámetros
Ligandos	Autodock 4.2	Importar el .pdb
	Autodocktools	Detectar rotación de enlaces Guardar .pdbqt
Proteína	Autodock 4.2	Importar el .pdb
	Autodocktools	Detectar rotación de enlaces Guardar .pdbqt
Caja de Interacción	Autodock 4.2	Importar los archivos .pdbqt de la proteína y el ligando
	Autodocktools	Establecer el tipo de mapas para la proteína y el ligando Centro de la caja = 194.05 / 42.996 / 195.375 Tamaño de la caja = 46 Å x 50 Å x 48 Å Guardar como .gpf Correr el cálculo para crear los mapas de interacción
Elementos de acoplamiento	Autodock 4.2	Proteína rígida
	Autodocktools	Ligando flexible Parámetro de búsqueda = Algoritmo genético
Acoplamiento	Autodock 4.2	Número de corridas = 10
	Autodocktools	Tamaño de la población = 150 Máximo de generaciones simuladas= 27000000 Guardar .dpf Correr el cálculo para el acoplamiento

Tabla 2. *Procedimientos y parámetros seguidos para realizar el acoplamiento molecular con Vina y Smina*

Procedimiento	Programa	Parámetros
Ligandos	Vina, Smina	Importar el .pdb
	Autodocktools	Detectar rotación de enlaces Guardar .pdbqt
Proteína	Vina, Smina	Importar el .pdb
	Autodocktools	Detectar rotación de enlaces Guardar .pdbqt
Caja de Interacción	Vina, Smina Autodocktools	Importar los archivos .pdbqt de la proteína y el ligando Establecer el tipo de mapas para la proteína y el ligando Centro de la caja = 194.05 / 42.996 / 195.375 Tamaño de la caja = 46 Å x 50 Å x 48 Å Guardar Correr el cálculo para crear los mapas de interacción
Elementos de acoplamiento	Vina, Smina	Proteína rígida
	Autodocktools	Ligando flexible Parámetro de búsqueda = Algoritmo genético
Acoplamiento	Vina, Smina Autodocktools	Número de corridas = 10 Tamaño de la población = 150 Exhaustividad= 100 Guardar Correr el cálculo para el acoplamiento

3.4 Condiciones de acoplamiento

Los acoplamientos se estudiaron en un espacio de búsqueda específico que contiene los residuos aspartato 477, glutamato 515 y aspartato 588 (figura 15). Las dimensiones de la caja, la exhaustividad y el número de resultados de los acoplamientos se encuentran en el apéndice C.

Figura 15. *Sitio de acoplamiento*

3.4.1 Programa de visualización de interacciones

Después de realizar los acoplamientos, se visualizaron los resultados con el programa Discovery Studio 2021 Client (Studio, 2015), el cual es programa licenciado pero la herramienta de visualización es gratuita

3.5 Elección del programa de acoplamiento

Se evaluaron tres programas especializados de acoplamiento molecular, los cuales se conocen como Autodock (Morris et al, 2009), Autodock vina (Trott, O., & Olson, 2012) y Smina (Koes et al, 2013). En cada programa se utilizó como receptor la estructura cristalina de la enzima glucosiltransferasa del patógeno oral *Streptococcus mutans*, la cual se encuentra almacenada en la PDB con el código 3AIE. Esta estructura es la de mejor resolución (2.10Å) y según el análisis Ramachandran reportado en la base de datos la calidad de sus cadenas varía entre 81 a 84 % (Ito et al., 2011).

Se usaron dos ligandos el primero llamado α -acarbosa es el que está disponible en la base de datos PDB formando el complejo en la estructura 3AIC (Ito et al., 2011). Las coordenadas de

ese ligando fueron extraídas y almacenadas en el archivo de coordenadas de la enzima 3AIE. Lo anterior se realizó, ya que, la estructura 3AIE no cuenta con ese ligando.

El segundo ligando que se usó es el reportado en la literatura por (Zhang et al, 2017), en ese trabajo demostraron que el ligando interactuó con los residuos responsable de la actividad de la proteína y en su defecto logró disminuir la producción de glucanos. Los ligandos fueron tratados siguieron la misma metodología de construcción y optimización anterior.

Con el fin de poder comparar los tres programas se mantuvo las características constantes a la hora de realizaron los acoplamiento, entre ellas el tamaño de la caja de búsqueda, la exhaustividad y el número de resultados generados por los programas.

Los criterios que se usaron para la elección del programa son los siguientes: Solo se evaluó la primera pose del resultado de los acoplamiento y ese resultado debe mostrar las interacciones importantes. El programa que cumpla estos requisitos será seleccionado.

3.6 Estabilidad del complejo formado

Con el fin de estudiar la estabilidad del complejo (Filgueira & Jr, 2019) se seleccionó la primera pose del resultado del acoplamiento entre los terpenos y la proteína, con esas estructura se realizó el estudio de estabilidad usando dinámica molecular con el programa GROMACS 2019.5 (GRONingen Machine for Chemical Simulations) y el campo de fuerza CHARRMM36.

La serie de pasos que se siguieron para realizar el estudio de estabilidad del complejo se muestra en las siguientes subsecciones. Los pasos son: creación de la topología tanto de la proteína como del ligando, construcción del complejo, solvatación, adición de iones, minimización del complejo, seguidamente se llevará a cabo un proceso de equilibrio, primero temperatura y volumen constante después presión y volumen constante.

3.6.1 Creación de la topología de la proteína

Para crear la topología de la proteína se usó una herramienta de Gromacs conocida como `pdb2gmx` donde la sintaxis de esta herramienta requiere el archivo de la proteína en formato `.pdb`. Además de crear la topología de la proteína (`topol.top`), se genera un archivo de restricción (`.prm`) y un archivo de la proteína en formato `.gro`.

3.6.2 Creación de las topologías de los ligandos

La creación de las topologías de los ligandos no se genera automáticamente con algún módulo de Gromacs sin embargo existen ya herramientas para la construcción de topologías para moléculas pequeñas en especial para los campos de fuerza más usados como Charmm36, OPLS, AMBER.

Como se mencionó anteriormente, en esta investigación se usó el campo de fuerza Charmm36, por lo tanto, se usó el programa oficial para la tipificación, asignación de cargas y parámetros de Charmm llamado CGenFF.

El proceso para obtener la topología de los ligandos es muy sencillo. Primero se cargó la estructura de cada ligando en la página y cuando terminó el proceso se guarda cada resultado en un archivo de texto en formato (`.str`).

Después de obtener el archivo (`.str`) de cada ligando se empleó un Script desarrollado por los mismos creadores del campo de fuerza Charmm llamado `cgen_charmm2gmx_py2_ndx1.py` para generar la topología (`itp`) y el archivo de restricción (`prm`) de cada ligando. El Script se descargó de la misma página que el campo de fuerza

3.6.3 Construcción del complejo

Para construir los complejos proteína-ligando se realizó los siguientes procesos. Primero se agregaron las coordenadas de cada ligando en el archivo.gro de la proteína y segundo, se guarda como un nuevo archivo.gro llamado complejo.gro, este archivo tiene las coordenadas de la proteína y el ligando.

Para finalizar y garantizar que Gromacs reconozca al ligando, se incluyó la topología y la restricción de posición de cada ligando en el archivo topol.top creado inicialmente.

3.6.4 Solvatación y adición de iones

El complejo se solvató con moléculas de agua en una caja dodecaédrica y se adicionaron iones para equilibrar las cargas del sistema.

3.6.5 Minimización del sistema

La minimización del sistema se realizó empleando el algoritmo de descenso más pronunciado durante cincuenta mil pasos (100 picosegundos) hasta una tolerancia de $10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$, lo anterior se realizó empleando el Script de la tabla 13.

3.6.6 Equilibrio

El proceso de equilibrio se realizó en dos fases. El primero se consideró que el volumen y la temperatura eran constantes, este proceso se conoce como NVT y en la siguiente fase la presión, el número de partículas y la temperatura se mantienen constantes, este proceso se conoce como NPT.

Para realizar la primera fase de equilibrio se usó el Script de la tabla 14, y para la segunda fase se usó Script de la tabla 15

3.6.7 Ejecución

Después de realizar el equilibrio se ejecutó la dinámica durante 10 nanosegundos siguiendo el Script de la tabla 16.

3.6.8 Análisis

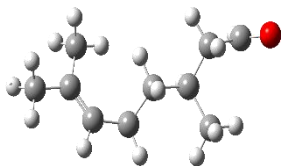
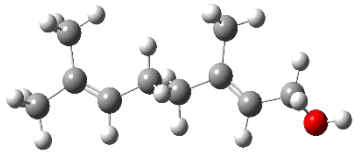
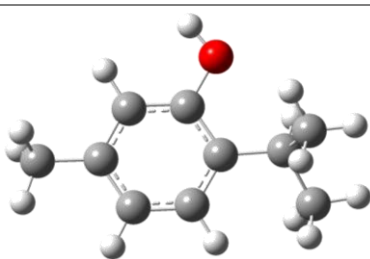
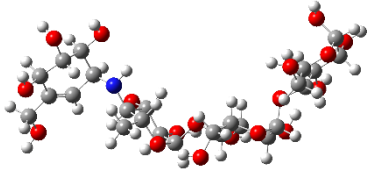
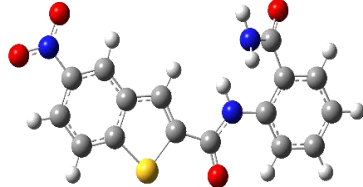
Luego de realizar el proceso de equilibrio se procede a realizar la dinámica molecular durante diez nanosegundos. Las trayectorias se analizaron con los gráficos de RMSD y RMSF y el número de enlaces de hidrógeno que se formaron durante la simulación.

4. Resultados y discusión

4.1 Optimización de las estructuras empleadas

Los resultados de las estructuras optimizadas del citronelal, geraniol, timol, α -Acarbosa y g-43 se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. *Estructuras optimizadas*

Estructura	Nombre	Energía (kJ/mol)
	Citronelal	$-1,23 \cdot 10^6$
	Geraniol	$-1,23 \cdot 10^6$
	Timol	$-1,22 \cdot 10^6$
	α -Acarbosa	$-6,27 \cdot 10^6$
	g-43	$-3,88 \cdot 10^6$

La anterior tabla muestra las energías expresadas en $\frac{kJ}{mol}$ de las estructuras de mínima energía de cada ligando, esto se realizó con el fin de tener estructuras de partida confiables para realizar los acoplamientos moleculares.

4.2 Selección del programa de acoplamiento

En la actualidad existen muchos programas que son usados para realizar acoplamientos moleculares, algunos son de acceso libre, pero requieren interfaz gráfica, otros necesitan que el usuario adquiera una licencia para su uso y no requieren la instalación en su dispositivo, estos programas funcionan en una plataforma donde el usuario ingresa los requerimientos y después de un tiempo obtiene el resultado en la plataforma o son enviados al correo electrónico.

En este trabajo se usaron tres programas que son de acceso libre y requieren interfaz gráfica para realizar los procedimientos, estos programas son Vina, AutodockVina y Smina. Donde se pretendió encontrar el programa que sea capaz de reproducir las siguientes interacciones reportadas por (Ito et al., 2011) : Asp477, Glu515 y Asp 588 con el ligando α -Acarbosa

En la tabla 4 se muestran las interacciones que se encontraron en cada programa y el tipo de interacción.

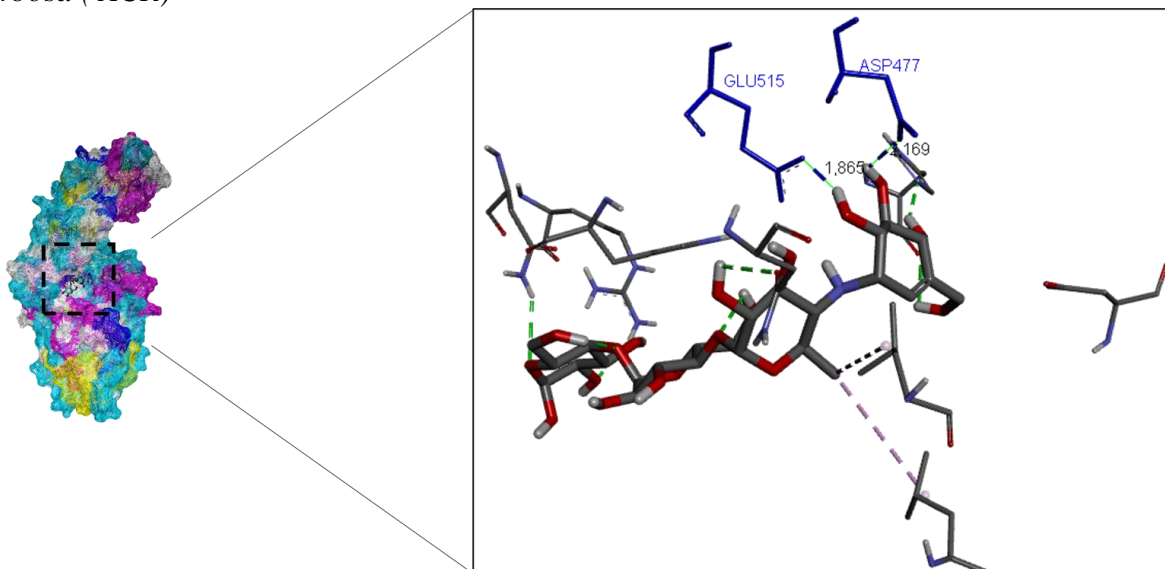
Tabla 4. *Interacciones encontradas en los tres programas de acoplamiento*

Programa	Interacciones		
	P.Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
Vina	Glu525, Asp477, His 587, Arg540, Asn537, Trp517, Asn481, Asp909	Lue433, Lue382	Tyr916, Arg475, Phe907, Asn862, Leu544, Tyr534, Lue541, Ser518,
Smina	Arg475, Asp477, Glu515, Asn481, His587, Gln592, Arg540, Asn537, Trp517, Asp909	Lue433, Lue382	Tyr916, Asp588, Leu434, Leu908, Phe907, Asn862, Ser589, Leu541, Leu544, Ser518, Tyr430, Asp480, Ala478
Autodock	Glu515, Asp477, Asp588, His587, Gln592, Asp909, Asn537, Trp517, Asn481	Ala478	Tyr916, Asn914, Asn816, Phe907, Phe907, Leu434, Leu433, Tyr430, Asp480, Gly429, Ser518, Tyr519, Asn862, Asn914

4.2.1 Vina

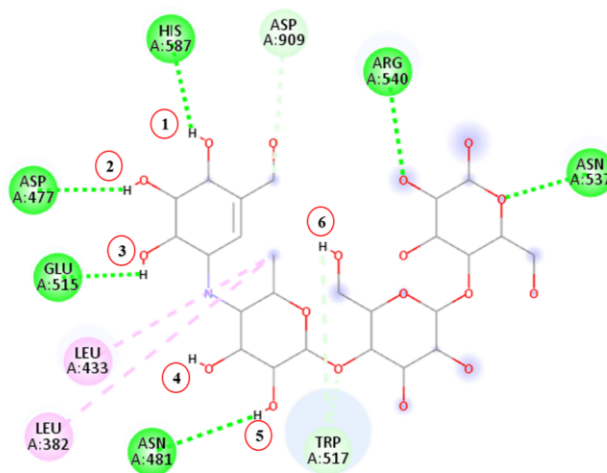
El resultado del acoplamiento molecular entre la proteína 3AIE y el ligando α -Acarbosa (ACR) empleando programa Vina se muestra en la figura 16. Las interacciones encontradas se muestran en la figura 17.

Figura 16. Resultado del acoplamiento molecular de la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)



En la figura 16 se muestra la cavidad de la enzima que es ocupada por el ligando ACR, además de la distancia que existe entre el glutamato 515 y el hidrógeno tres y el aspartato 477 y el hidrógeno dos, las distancias son de 1,865 y 2,169 Å respectivamente.

Figura 17. Interacciones encontradas entre la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)

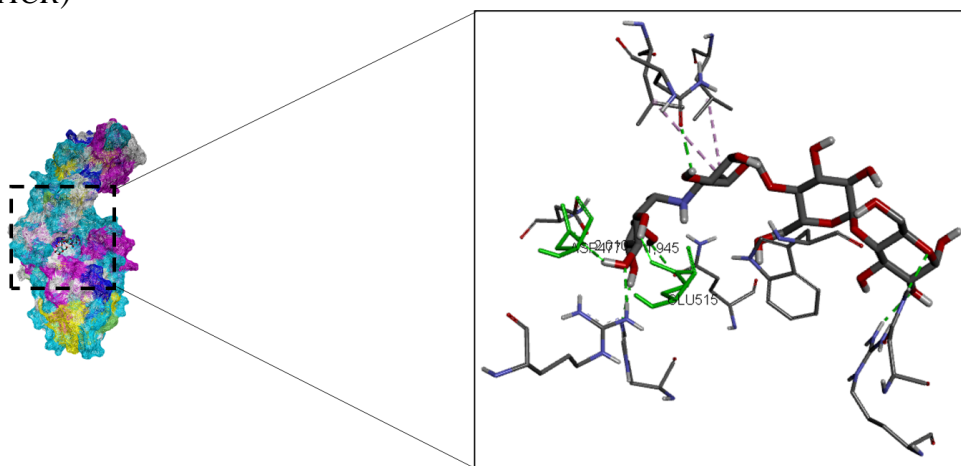


En la figura 17 no se aprecian las interacciones de la forma esperada. Según lo reportado los aminoácidos aspartato 477, Glutamato 515 y aspartato 588 deberían formar puentes de hidrógeno con el ligando α -acarbosa. En esta ocasión se observa la formación de puentes de hidrógeno entre aspartato 477 y el hidrógeno dos, también del glutamato 515 con el hidrógeno tres. De acuerdo con lo anterior faltaría la interacción entre el aspartato 588 para cumplir con las interacciones reportadas experimentalmente.

4.2.2 Smina

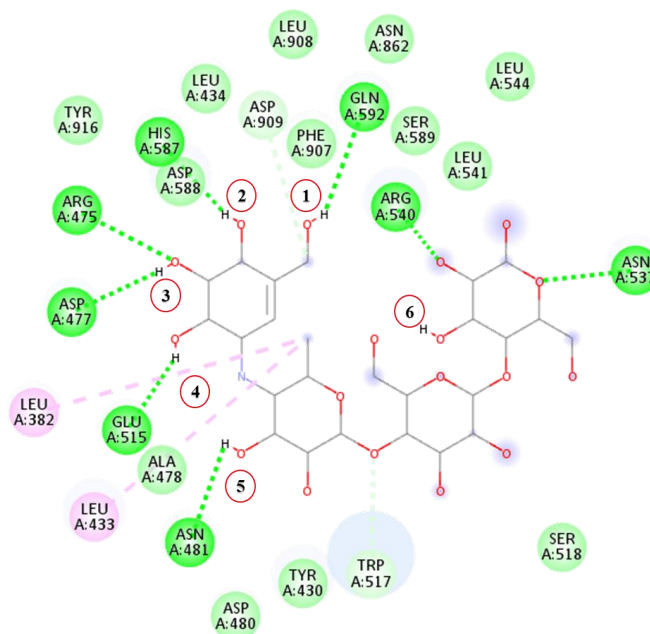
El resultado del acoplamiento molecular entre la proteína 3AIE y el ligando α -acarbosa (ACR) empleando programa Smina se muestra en la figura 18. Las interacciones encontradas se muestran en la figura 19.

Figura 18. Resultado del acoplamiento molecular de la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)



En la figura 18 se muestra la cavidad de la enzima que es ocupada por el ligando ACR, además de la distancia que existe entre el glutamato 515 y el hidrógeno tres y el aspartato 477 y el hidrógeno dos, las distancias son de 1,945 y 2,010 Å respectivamente.

Figura 19. Interacciones encontradas entre la proteína enzima (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)



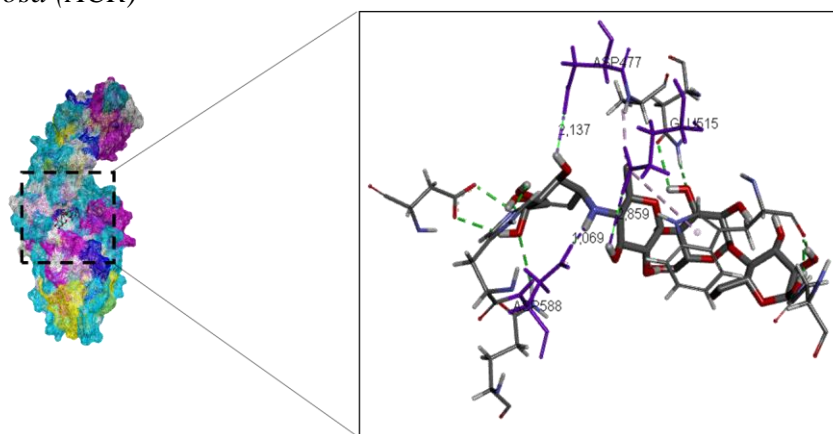
En la figura 19 no están presentes las interacciones de la forma esperada. En esta ocasión se observa la formación de puente de hidrógeno de los aminoácidos aspartato 477 con el hidrógeno tres, además el aminoácido Glutamato 515 también forma puentes de hidrógeno con el hidrógeno cuatro del ligando.

En la figura también se observa la interacción del aspartato 588 pero no cumple con el tipo de interacción reportada, ya que el resultado del acoplamiento muestra que la interacción entre el aspartato 588 y el ligando es de Van der Waals y de acuerdo con la distancia al hidrógeno más próximo no podría formar puentes de hidrógeno.

4.2.3 Autodock

El resultado del acoplamiento molecular entre la proteína 3AIE y el ligando α -acarbosa (ACR) empleando programa Autodock se muestra en la figura 20. Las interacciones encontradas se muestran en la figura 21.

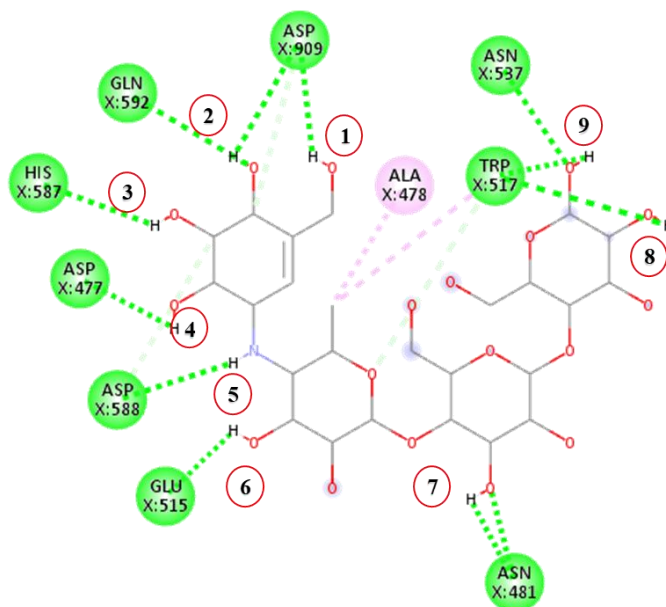
Figura 20. Resultado del acoplamiento molecular de la enzima glucosiltransferasa (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)



En la figura 20 se muestra la cavidad de la enzima que es ocupada por el ligando ACR, además de la distancia que existe entre el glutamato 515 y el hidrógeno seis, el aspartato 477 y el hidrógeno cuatro y el aspartato 588 y el hidrógeno cinco. Las distancias son de 1,856, 2,137 y 1,069 Å respectivamente.

En la figura 20 se presenta las interacciones de la forma esperada. Según artículos anteriores (Ito et al., 2011) los aminoácidos aspartato 477, Glutamato 515 y aspartato 588 deberían formar puentes de hidrógeno con el ligando α -acarbosa. Los hidrógenos con los cuales se forman los puentes de hidrógeno son el cuatro, cinco y seis respectivamente.

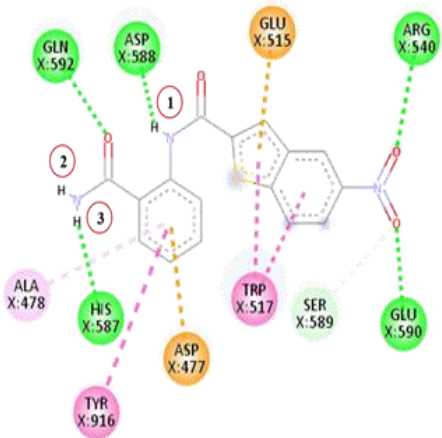
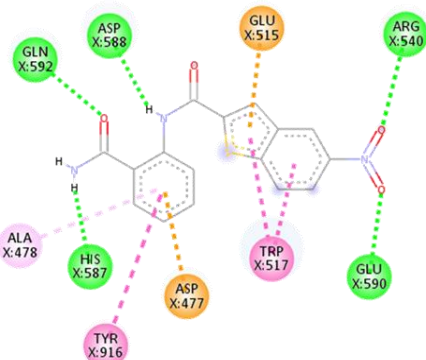
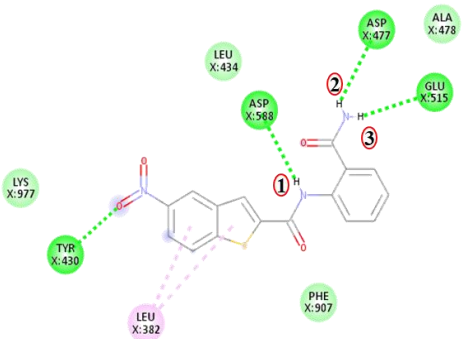
Figura 21. Interacciones encontradas entre la enzima glucosiltransferasa (3AIE) y el ligando α -acarbosa (ACR)



4.3 Reproducción de las interacciones reportados por ligandos usados experimentalmente en la proteína glucosiltransferasa empleando los programas de acoplamiento molecular Vina, Smina y AutodockVina

Con el fin de demostrar que el programa Autodock es eficiente para reproducir las interacciones entre enzimas y ligandos, se replicó el trabajo de (Zhang et al., 2017) Estas interacciones coinciden con las interacciones reportadas previamente por (Ito et al., 2011), donde describen la formación de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos Aspartato 477, Aspartato 588 y Glutamato 588 con la enzima glucosiltransferasa. Se encontró que el programa Autodock obtuvo mejores resultados que Vina y Smina.

Tabla 5. Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y el ligando G-43 empleando los programas Vina, Smina y Autodock

Programa	Puentes de Hidrógeno	Interacciones Hidrofóbicas	Van der Waals
	Gln592, Asp588, Arg540, Glu590, His587	Ala478, Tyr916, Trp517	Ser589
Vina	Gln592, Asp588, Arg540, Glu590, His587	Ala478, Tyr916, Trp517	
	Glu515, Asp477, Asp588	Leu382	Leu434, Lys977, Phe907, Ala478
Smina	Glu515, Asp477, Asp588	Leu382	Leu434, Lys977, Phe907, Ala478
			
Autodock			

En la tabla 5 se encuentran los resultados encontrados con los tres programas de acoplamiento, donde el programa con mejores resultados fue Autodock, este programa reprodujo las interacciones entre el ligando G-43 y la proteína glucosiltransferasa reportadas por (Zhang et al., 2017) y (Ito et al., 2011), estas interacciones se dieron entre el hidrógeno uno con el aspartato 588, también entre el hidrógeno dos y el aspartato 477 y por último la interacción entre el hidrógeno tres y el glutamato 515.

Los otros programas de una u otra forma fallaron en la reproducción de las interacciones reportadas, por ejemplo, usando el programa Vina logró reproducir la formación de puente de hidrógeno entre aspartato 588 y el hidrógeno uno.

Las otras interacciones no fueron ubicadas en la forma adecuada, se observa tanto en Vina y Smina los aminoácidos aspartatos 477 y glutamato 515 interactuaron con los anillos del ligando.

4.4 Resultados de los acoplamientos moleculares entre los terpenos y la enzima glucosiltransferasa empleando Autodock

En las tablas 5, 6 y 7 se encuentran los resultados de las tres primeras poses de los acoplamientos moleculares, también las diferentes interacciones que existen entre la enzima y los ligandos citronelal, geraniol y timol respectivamente, usando como programa de acoplamiento Autodock.

Se esperaba que los terpenos lograran reproducir alguna de las tres interacciones mencionadas a lo largo del documento, lo que daría indicios sobre la posible inhibición de los terpenos frente a la enzima más importante de las caries dentales.

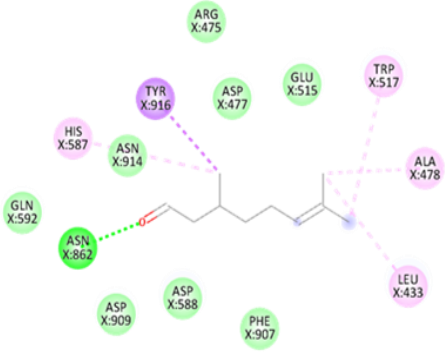
Las poses uno dos y tres de cada acoplamiento se nombraron como A) B) y C) en las tablas previamente mencionadas.

4.4.1 Resultados de las primeras tres poses- citronelal

En la siguiente tabla se muestran los resultados del acoplamiento usando el programa Autodock, así como las interacciones encontradas.

Tabla 6. Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Citronelal

Citronelal	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
<p>A) Diagram showing Citronelal molecule (green sticks) interacting with Trp517 (green circle), Asp480 (green circle), Val479 (green circle), Asn481 (green circle), Phe907 (pink circle), Leu434 (pink circle), Leu433 (pink circle), Gln592 (green circle), Ala516 (green circle), Glu515 (green circle), and Ala478 (green circle). Dashed lines indicate hydrogen bonds between Trp517 and the carbonyl oxygen, and between Phe907, Leu434, and Leu433 and the terminal double bond.</p>	Trp517	Phe907, Leu434, Leu433	Asp480, Glu515, Ala516, Ala478, Gln592, Asn481, Val479
<p>B) Diagram showing Citronelal molecule (green sticks) interacting with Asn862 (green circle), Asp909 (green circle), His587 (green circle), Asn914 (green circle), Asp588 (green circle), Gln592 (green circle), Ser589 (green circle), Asp593 (green circle), Phe907 (green circle), and Tyr610 (pink circle). Dashed lines indicate hydrogen bonds between Asn862 and the carbonyl oxygen, and between Asp909 and the terminal double bond.</p>	Asn862	Tyr610	Phe907, His587, Asp909, Asn914, Asp588, Gln592, Ser589, Asp593

Citronelal	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
	Asn862	Leu433, Ala476, Trp517	Gln592, Asp909, Asp588, Phe907, Glu515, Asp477, Arg475, Asn914
C)			

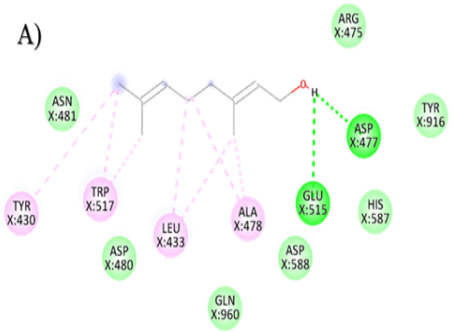
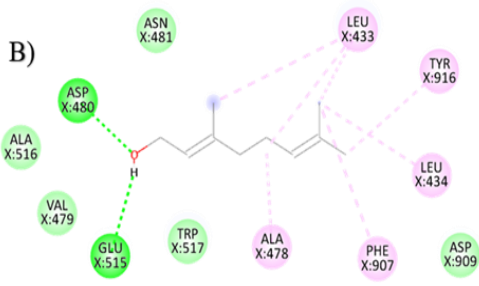
En la tabla 6 muestra que tanto en la pose B) como en la pose C) se formó un puente de hidrógeno con la asparagina 862 y en la pose A) se formó un solo enlace de hidrógeno, pero con el triptófano 517. Además de las interacciones mencionadas anteriormente es importante resaltar otro tipo de interacción que se encontró, esta interacción es conocida como Van der Waals (VdW). En la pose A) se encontraron siete interacciones de VdW entre ellas la que se da con el glutamato 515. En la pose B) se encontraron ocho interacciones de VdW pero a diferencia de la pose A) la interacción que se encontró se dio con el aspartato 588. En la pose C), la última pose de este acoplamiento, se encontraron ocho interacciones de VdW entre ellas las interacciones entre el glutamato 515, aspartato 477 y aspartato 588 con la enzima.

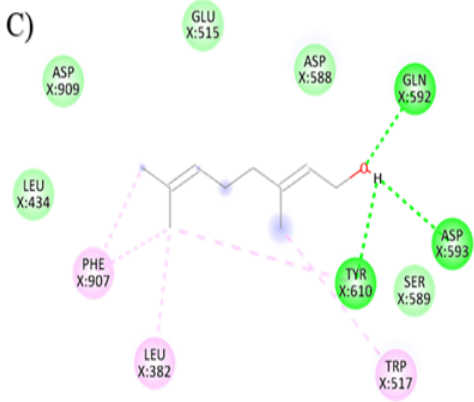
Sin embargo, los resultados en esta oportunidad no coinciden con los reportados en la bibliografía, ya que en ninguna de las tres poses de los acoplamientos se encontró que los aminoácidos mencionados anteriormente formen puentes de hidrógeno con la enzima y los puentes de hidrógeno formados, cabe resaltar que el citronelal no han sido reportados con actividad inhibitoria.

4.4.2 Resultados de las primeras tres poses-Geraniol

En la siguiente tabla se presenta los resultados del acoplamiento entre el geraniol y la enzima, también las interacciones clasificadas en puentes de hidrógeno, Hidrofóbicas y Van der Waals.

Tabla 7. Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Geraniol

Geraniol	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
<p>A)</p> 	Glu515, Asp477	Tyr430, Trp517, Leu433, Ala478	Asn481, Asp480, Gln960, Asp588, His587, Tyr916, Arg475
<p>B)</p> 	Asp480, Glu515	Leu433, Tyr916, Leu434, Phe907, Ala478	Ala516, Val479, Trp517, Asp909

Geraniol	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
<p>C)</p> 	Tyr610, Asp593, Gln592	Phe907, Leu382, Trp517	Leu434, Ser589, Asp909, Asp588,

En la tabla 7 se muestra las primeras tres poses (A) (B) y (C) de los acoplamientos moleculares entre la enzima glucosiltransferasa y el ligando geraniol (En la pose (A) se muestran dos puentes de hidrógeno entre el único hidrógeno polar de geraniol y los aminoácidos glutamato 515 y aspartato 477, adicionalmente a esto se observaron algunas interacciones de Van der Waals entre ellas la que se da con el aminoácido aspartato 588.

La distancia entre el hidrógeno y el oxígeno OE1 del aminoácido glutamato es de 2,8 angstrom por el contrario la distancia entre ese mismo hidrógeno y el oxígeno OD1 del aminoácido aspartato 477 es de 1,7 angstrom.

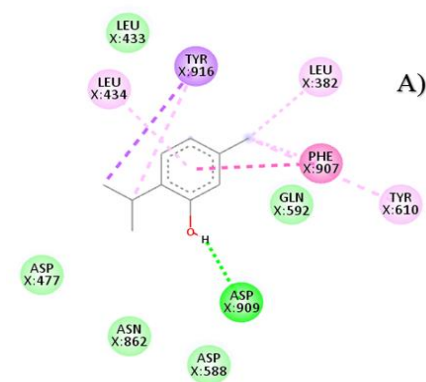
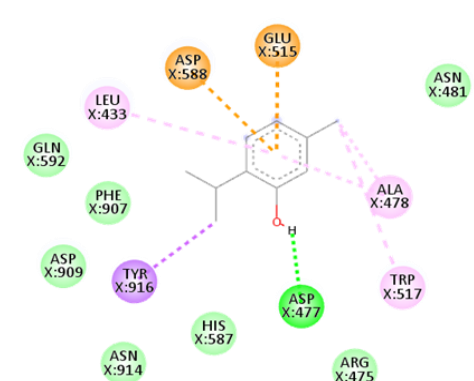
En la pose (B) lo más importante es la formación de un puente de hidrógeno entre el único hidrógeno polar de geraniol y el oxígeno del aminoácido glutamato 515.

En la pose (C) a diferencia de lo encontrado en (A) y (B) no se muestran los puentes de hidrógeno entre los aminoácidos glutamato 515, aspartato 477 y aspartato 588, sin embargo, se formaron tres puentes de hidrógeno, dos entre el único hidrógeno polar y los aminoácidos TYR 610, ASP 593 y otro entre la glutamina 592 y el oxígeno aceptor formando un puente de hidrógeno

aceptor. Teniendo en cuenta estas interacciones es de esperar que el geraniol presente actividad frente a esta enzima.

4.4.3 Resultados de las primeras tres poses-Timol

Tabla 8. Tipos de interacciones entre la enzima glucosiltransferasa y Timol

Timol	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
 <p>A)</p>	Asp909	Leu434, Tyr916, Leu382, Phe907, Tyr610	Leu433, Asp477, Asn862, Asp588, Gln592
 <p>b)</p>	Asp477	Ala478, Trp517, Leu433	Gln592, Phe907, Asp909, Asn914, His587, Arg475, Asn481

Timol	Interacciones		
	Puentes de Hidrógeno	Hidrofóbicas	Van der Waals
<p>c)</p>	Asp909	Tyr916, Leu433, Tyr610, Leu382, Phe907, Leu434	Asp477, Ala478, Gln960, Asn914, Gln592

En la tabla 8 se muestra las primeras tres poses (A) (B) y (C) de los acoplamientos moleculares entre la enzima glucosiltransferasa y el ligando timol (TML). En la pose (A) se muestran un puente de hidrógeno entre el único hidrógeno polar de timol y el aminoácido aspartato 909, adicionalmente a esto se observaron algunas interacciones de Van der Waals entre ellas la que se da con los aminoácidos aspartato 477 y 588.

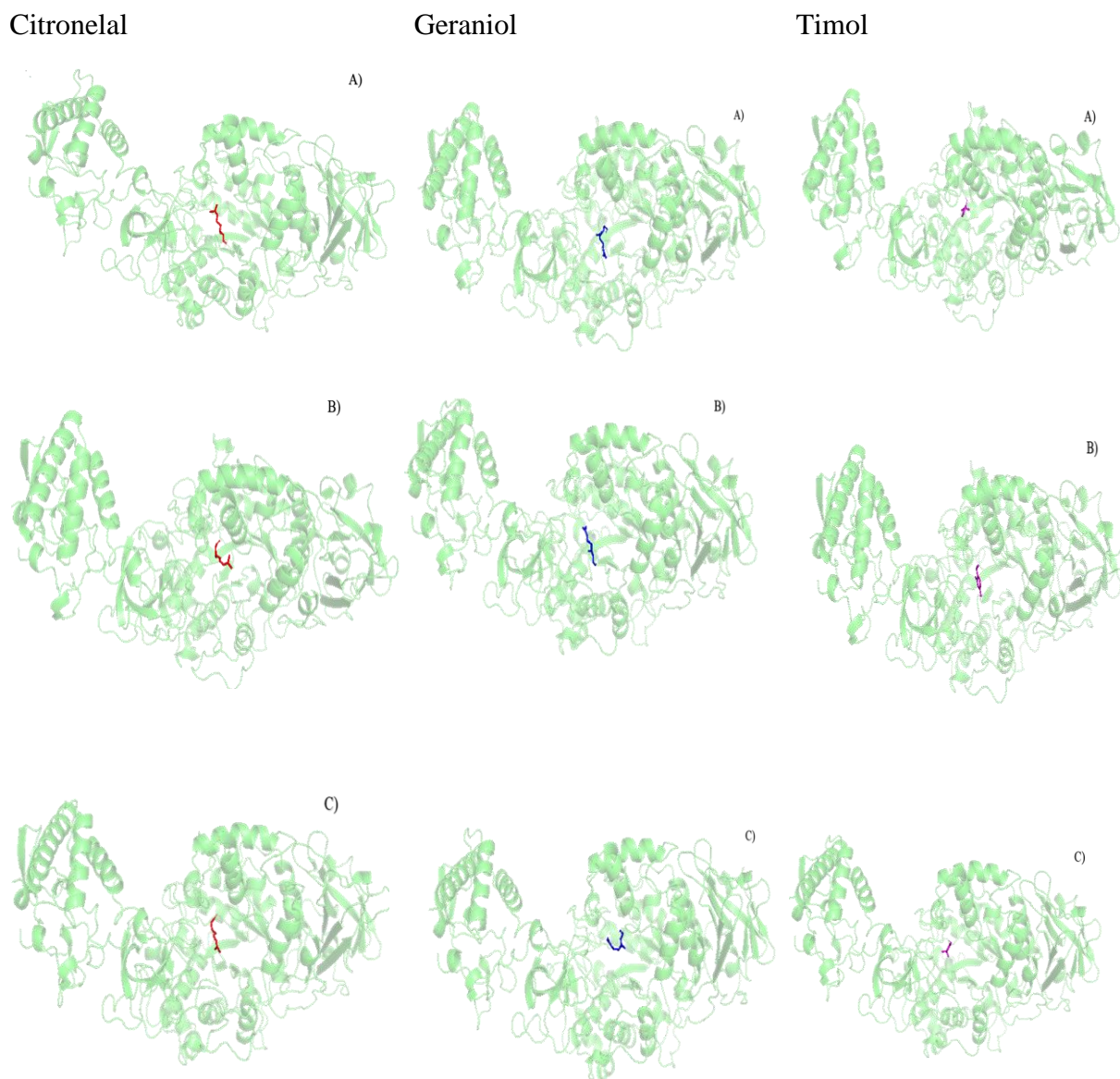
En (B) se observa la interacción de puente de hidrogeno con el aminoácido aspartato 477, además se observa como interactúa el aspartato 588 y el glutamato 515 con el ligando, esta interacción es de tipo pi-anión.

En la pose (C) se muestra un puente de hidrógeno entre el único hidrógeno polar de timol y el aminoácido aspartato 909, adicionalmente a esto se observaron algunas interacciones de Van der Waals entre ellas la que se da con el aminoácido aspartato 477. De acuerdo a estos resultados es de esperar que el Timol no presente actividad inhibitoria.

4.5 Estructura de partida para las simulaciones de dinámica molecular

Después de realizar los acoplamientos moleculares para cada ligando se seleccionó los tres primeros resultados para estudiar la estabilidad de los complejos empleando la simulación de dinámica molecular.

Tabla 9. Estructuras de partida empleadas para los cálculos de dinámica molecular

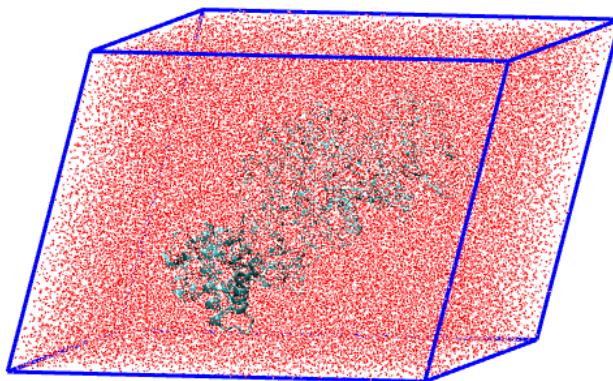


En la tabla 9 se observa como varía el acoplamiento entre los terpenos y la proteína, en la primera columna se observa el terpeno citronelal, en la segunda el geraniol y en la tercera el timol. En las filas uno (A), dos (B) y tres (C) se encuentran las primeras tres poses de cada terpeno. De acuerdo con esto las poses de cada ligando varían de forma significativa y eso se pudo evidenciar en las interacciones mostradas en las tablas 5, 6 y 7.

4.6 Solvatación de la proteína

Para iniciar los procesos de equilibrio y producción se procedió a solvatar el sistema. Como se observa en las figuras 22. Se empleó una caja de forma dodecaedro de modo que la proteína estuviera totalmente dentro y se usara la mínima cantidad de aguas, esto disminuye el tiempo de cálculo del proceso.

Figura 22. *Proteína solvatada*

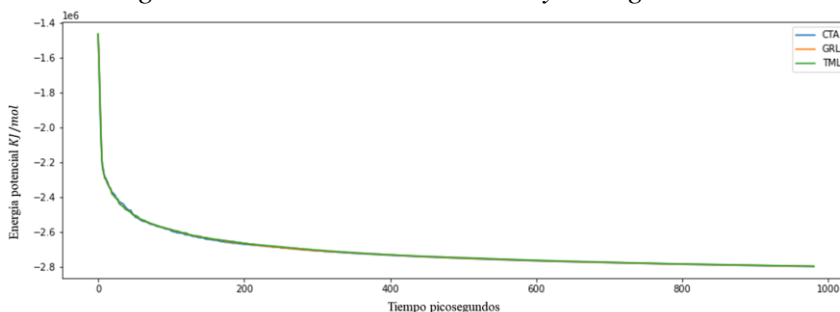


4.7 Energía potencial

Después de solvatar los sistemas, se realizó la minimización de energía de cada uno, empleando el algoritmo de descenso más pronunciado durante cincuenta mil pasos (100 picosegundos) hasta una tolerancia de $10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$. Adicional a esto se agregaron 6 aniones de cloro

para estabilizar la carga del sistema. En la figura 23 se observa el resultado de la minimización, el cual, confirma que todas las estructuras fueron correctamente minimizadas cuanto a geometría.

Figura 23. Resultado de energía de minimización de enzima y los ligandos



4.8 Equilibrado

Después de minimizar la energía de cada sistema se realizó el proceso de equilibrado en dos fases. La primera fase es conocida como ensamble canónico NVT y la segunda fase se conoce como ensamble isotérmico-isobárico NPT donde el volumen y la temperatura son constantes para el primero y la presión, el número de partículas y la temperatura es constante para el segundo. Para determinar el adecuado equilibrado para cada uno de los sistemas se determinó la variación de temperatura, presión y densidad para cada sistema en función del tiempo.

La primera fase de equilibrio con ensamble NVT estabilizó la temperatura del sistema y la segunda etapa utiliza ese resultado para posteriormente estabilizar la presión del sistema. De acuerdo con los resultados mostrados en el anexo A todos los sistemas fueron estables durante cien picosegundos. Del mismo modo para la variación de la presión y la densidad para cada sistema a lo largo de la segunda fase de equilibrio con ensamble NPT se pudo lograr el equilibrio. Según los resultados mostrados en las dos fases de equilibrio se puede proceder con las simulaciones de dinámica molecular.

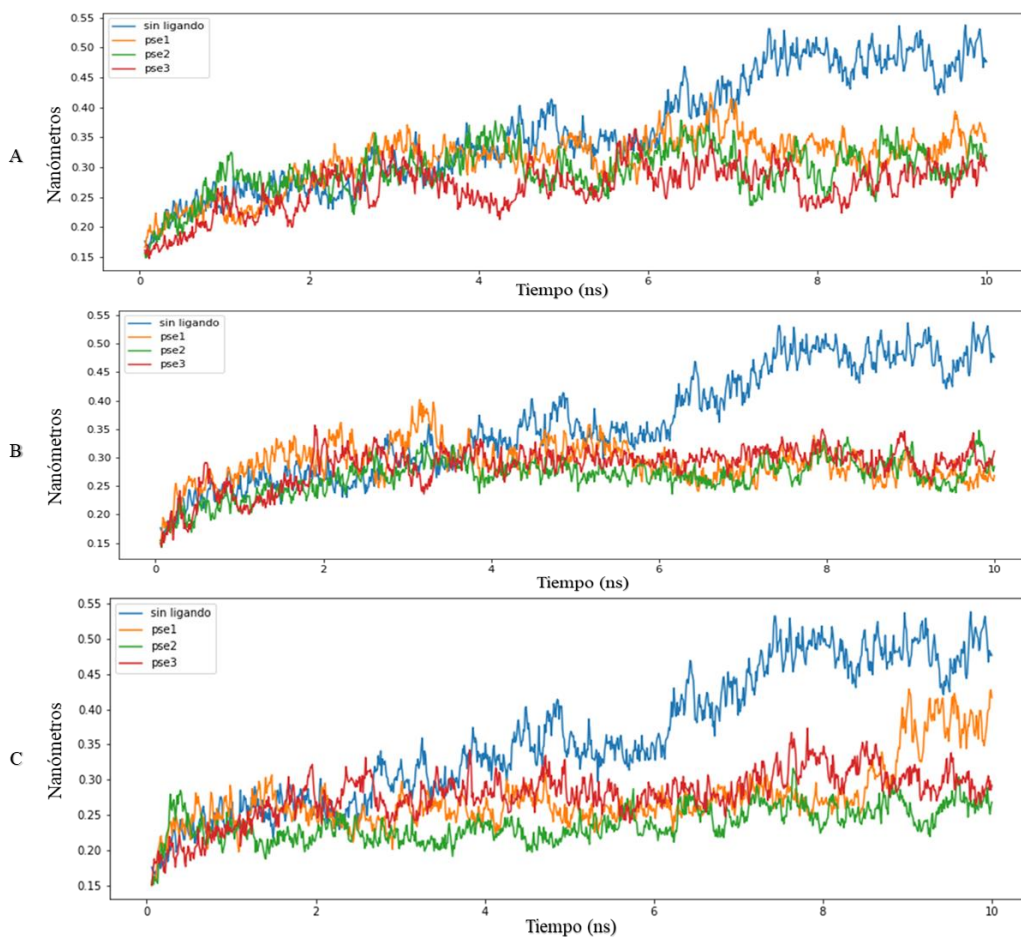
4.9 Evaluación de la estabilidad de los complejos

Al final la simulación se obtuvo un archivo de formato xtc, el cual tiene la información de la trayectoria de todos los residuos de la proteína y de la sustancia acoplada. Teniendo en cuenta este archivo y empleando un paquete disponible en GROMACS se calculó el RMSD de cada complejo, de esta manera se obtienen las figuras 24.

4.9.1 Análisis RMSD del complejo 3AIE – Geraniol

En la figura 25 se muestra la variación de los complejos durante diez nanosegundos, en el eje Y se muestra esa variación en términos de distancia (nanómetros). Los colores representan una simulación, por ejemplo, el color azul representa la simulación de la proteína sin ligando durante el tiempo mencionado anteriormente y los colores naranja, verde y rojo son las poses uno, dos y tres respectivamente.

Figura 24. *RMSD de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses de los terpenos geraniol (A), citronelal (B) y timol (C)*



Según lo observado en la figura 24 y lo presentado anteriormente en las tablas 5, 6 y 7 el ligando que estabilizó de mejor forma a la proteína fue el geraniol y la pose número uno fue la mejor de las tres. Las razones se mostrarán a continuación.

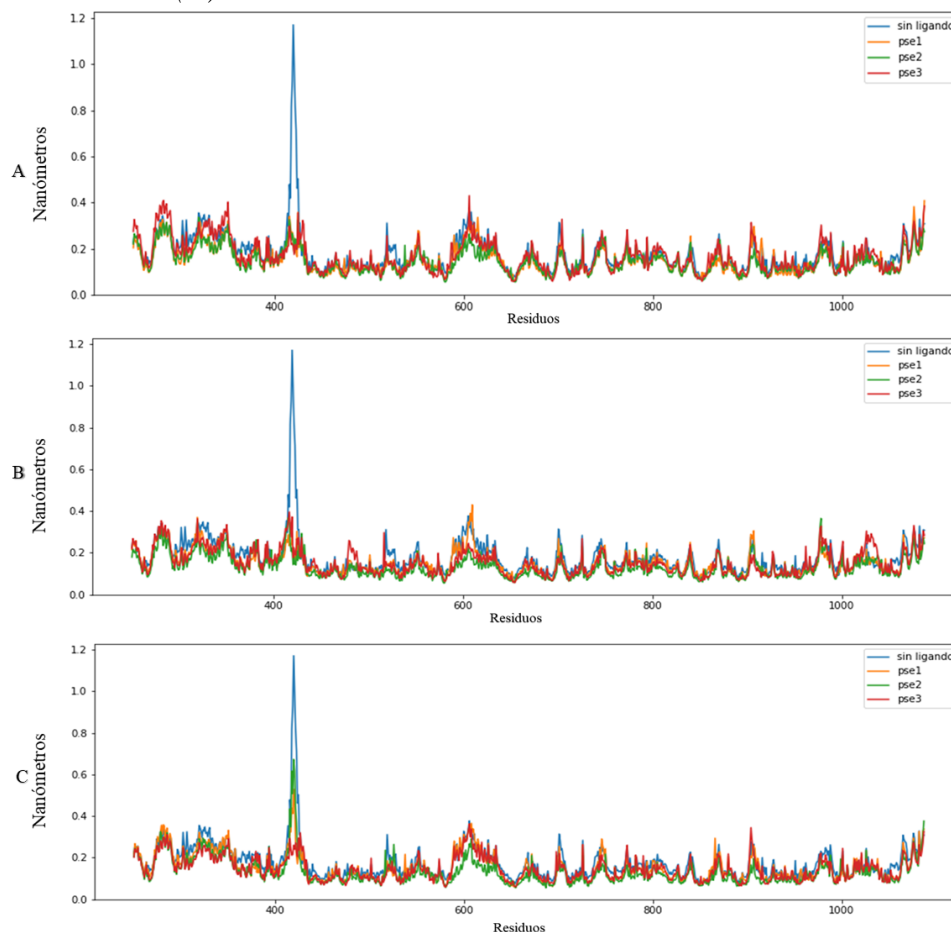
El primer terpeno a descartar es el timol con respecto a la estabilidad del geraniol, ya que en la figura 24 (C) se observa gran diferencia entre la proteína sin ligando y la proteína con el terpeno, esta diferencia se debe a la ausencia de las interacciones con el glutamato 515 y el aspartato 477. En la tabla 7 se muestra que solo la pose número dos formó un puente de hidrógeno con el aspartato 477.

Las interacciones que se encontraron con el ligando citronelal fueron de tipo Van der Waals, estas interacciones se observan en la tabla 5. En la figura 24 B) se muestra un comportamiento similar con respecto a la figura 24 A), sin embargo, las interacciones encontradas en la pose 1 del geraniol corresponde a la triada catalítica reportada en la bibliografía entre ellos la interacción con el glutamato 515 aminoácido importante para romper el enlace glucosídico. Lo que lleva considerar que este tipo de interacciones presentes en la pose uno es ostensiblemente más fuertes que las presentes en los otros terpenos y por lo tanto esta pose estabilizó mejor la enzima.

4.9.2 Análisis RMSF del complejo 3AIE – Geraniol

Adicionalmente se realizó el análisis RMSF de todos los residuos de la enzima durante el periodo de simulación, este análisis se realizó de la enzima sin ligando y de los tres complejos, en la figura 25 se muestran los resultados de los complejos 3AIE-geraniol (A), 3AIE-Citronela (B) y 3AIE-Timol (C).

Figura 25. RMSF de la enzima sin ligando y de los complejos 3AIE-geraniol (A), 3AIE-Citronela (B) y 3AIE-Timol (C)



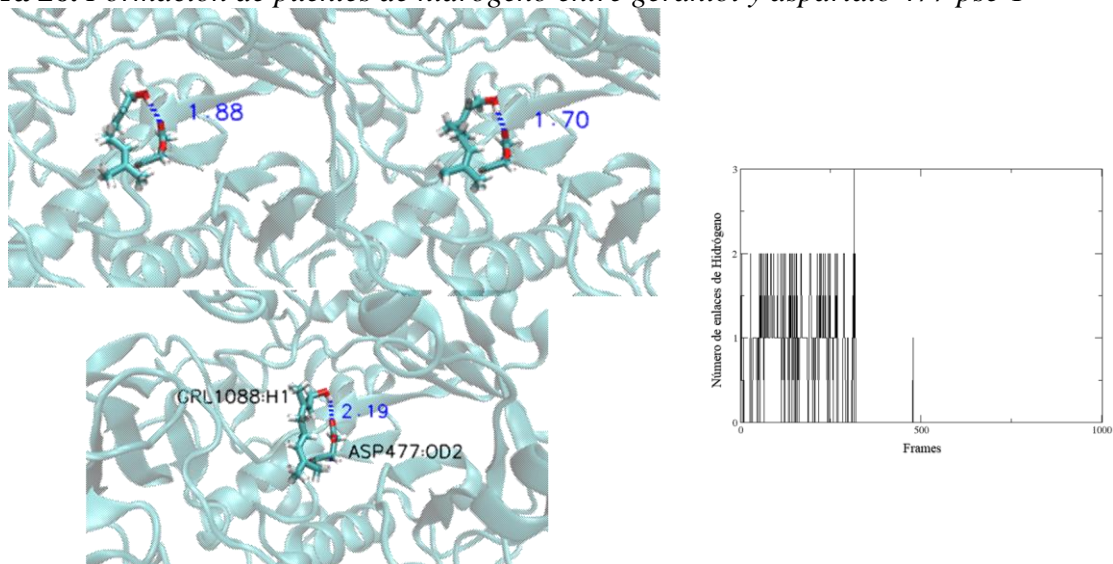
En la figura 25 se observa el comportamiento flexible de los aminoácidos prolina 419, arginina 420 y tirosina 421 de la proteína sin ligando (azul). Al entrar los ligandos geraniol y citronela la movilidad de las cadenas laterales de esos residuos disminuye radicalmente a diferencia del terpeno timol donde la movilidad de esas cadenas se reduce a la mitad.

4.9.3 Formación de enlaces de hidrógeno entre el geraniol y la enzima

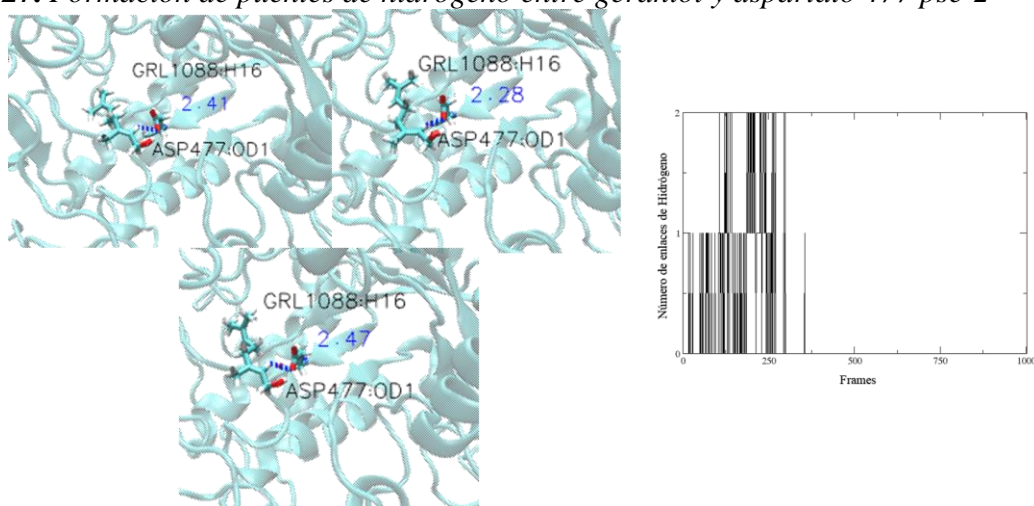
La formación de puentes de hidrógeno es un parámetro importante cuando hablamos de interacciones no covalentes, en esta sección se muestran los posibles puentes de hidrógeno que se forman con cada una de las tres primeras poses del terpeno geraniol con la enzima, los resultados

de los complejos citronelal y timol se encuentran en el anexo F. Las figuras 26, 27 y 28 muestran la formación de enlaces de hidrógeno de las poses uno, dos y tres respectivamente.

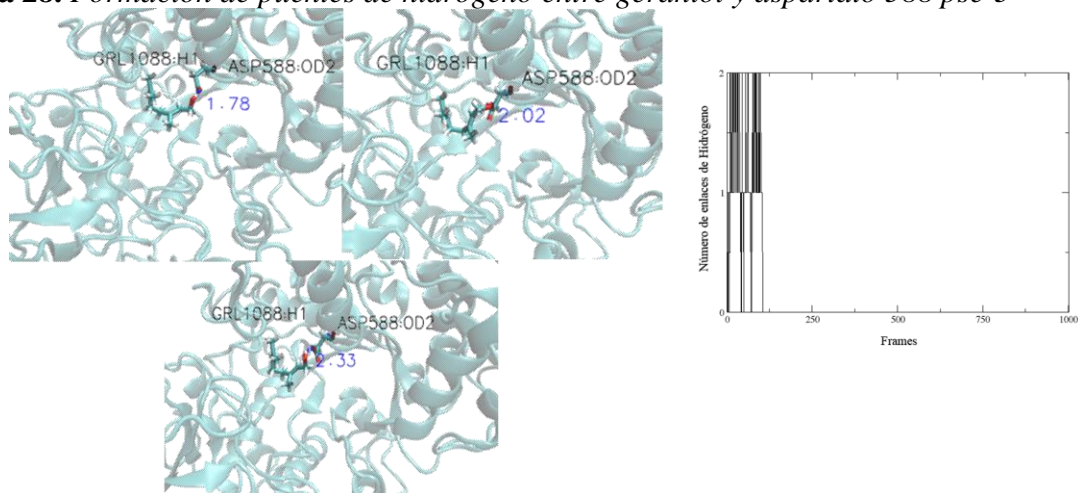
Figura 26. Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 477 *pse-1*



En la figura 26 se observa la formación de puente de hidrógeno entre el aspartato 477 y el geraniol, esta interacción se da entre el hidrógeno H1 del geraniol y el oxígeno OD2 del aspartato, ese enlace vario entre 1.70 a 2.10 Å durante los 10 nanosegundos de simulación.

Figura 27. Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 477 pse-2

La figura 27 muestra la formación de puente de hidrógeno entre el geraniol y el aspartato 477, esta interacción se da entre el hidrógeno H16 del geraniol y el oxígeno OD2 del aspartato, ese enlace varía entre 2,28 hasta 2,47 Å.

Figura 28. Formación de puentes de hidrógeno entre geraniol y aspartato 588 pse-3

La figura 28 muestra la formación de puente de hidrógeno entre el geraniol y el aspartato 477, esta interacción se da entre el hidrógeno H1 del geraniol y el oxígeno OD2 del aspartato, este enlace varía entre 1,78 hasta 2,33 Å.

Lo observado en las figuras anteriores muestra que las tres poses del geraniol durante la simulación de dinámica molecular interactuaron con los aminoácidos importantes de la proiteína, lo que varía es el tiempo que dura el enlace de hidrógeno.

5. Conclusiones

De los tres programas de acoplamiento molecular Autodock, smina y vina se encontró que el Autodock logró reproducir las interacciones de los ligandos α -Acarbosa y g-43 con la enzima glucosiltransferasa.

El acoplamiento molecular con los terpenos citronelal, geraniol y timol evidencio que todos los terpenos interactúan con algún residuo responsable de la actividad catalítica de la enzima, sin embargo el geraniol presentan interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos de la enzima lo que presuntamente disminuye la actividad de la proteína según lo reportado por Hairul Islam et al., 2020.

La dinámica molecular permitió evaluar la estabilidad de los complejos formados y se encontró que la primera pose del ligando geraniol presentaba la trayectoria más estable entre los otros terpenos, esto se evidenció con los análisis de RMSD Y RMSF. La estabilidad de la interacción posiblemente se da por los puentes de hidrógeno entre el geraniol y la enzima.

Con todo lo anterior se evidencia lo importante de las herramientas computacionales para encontrar sustancias naturales que posiblemente ayudarían a contrarrestar enfermedades como las caries dentales que afectan a gran parte de las personas, ya que, los tratamientos que existen en la actualidad se tornan ineficientes para el control de este patógeno. De tal forma que se propone al geraniol, una sustancia natural, que potencialmente pueda ser usada para el control de las caries

dentales, ya que, el geraniol interactuaría con los residuos importantes para la inhibición de la enzima glucosiltransferasa.

Referencias

- Aceves, H. (2018). Dinámica molecular de la permeabilidad de nanotubos de carbono en una Bicapa Lipídica. In CONACYT. Centro de Investigación en Materiales Avanzados.
- Aguirre Valderrama, A. (2009). Estudio Mecanocuántico, Docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa: algoritmo para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamiento vecinales (CAL3JHH). Universidad de Granada.
- Al-asmari, A. K., Athar, T., & Al-faraidy, A. A. (2017). Chemical composition of essential oil of thymus vulgaris collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(2), 147–150.
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y., & Smith, J. C. (2018). Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophysical Journal*, 114(10), 2271–2278. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>
- Botan, A., Favela-Rosales, F., Fuchs, P. F. J., Javanainen, M., Kanduč, M., Kulig, W., Lamberg, A., Loison, C., Lyubartsev, A., Miettinen, M. S., Monticelli, L., Määttä, J., Ollila, O. H. S., Retegan, M., Róg, T., Santuz, H., & Tynkkynen, J. (2015). Toward Atomistic Resolution Structure of Phosphatidylcholine Headgroup and Glycerol Backbone at Different Ambient Conditions. *Journal of Physical Chemistry B*, 119(49), 15075–15088. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b04878>
- Bueren-Calabuig, J. (2014). *Dinámica Molecular* (1st ed., Vol. 8, Issue 3, pp. 1–17). CreateSpace.
- Caceres, M., Hidalgo, W., Stashenko, E., Torres, R., & Ortiz, C. (2020). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial , Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics*, 9(147), 1–15. <https://doi.org/10.3390 / antibiotics9040147>

- Carvalho, L., Furletti, V. F., Meyre, S., Bersan, F., Guilherme, M., Ana, L., Tasca, G., Carvalho, E. De, Sartoratto, A., Vera, L., Rehder, G., Mara, G., Cristina, M., Duarte, T., Ikegaki, M., Alencar, S. M. De, & Rosalen, P. L. (2012). Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/751435>
- Chen, Y. C. (2015). Beware of docking! Trends in Pharmacological Sciences, 36(2), 78–95. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001>
- Fejerskov, O., N. B. (2004). Dental Caries: The Disease and its Clinical Management. In Blackwell Munksgaard (2nd ed., Vol. 8, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2004.00341.x>
- Filgueira, W., & Jr, A. (2019). Docking Screens for Drug Discovery (W. Filgueira (ed.); 1st ed.).
- Foresman, J., & Frisch, A. (2009). Exploring chemistry with electronic structure methods. In Gaussian Inc, Pittsburgh, PA (2nd ed., Vol. 10, Issue 13, pp. 4161–4163). <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Exploring+Chemistry+With+Electronic+Structure+Methods#1%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Exploring+chemistry+with+electronic+structure+methods,+1996#1>
- Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., Alencar, S. M. De, & Rosalen, P. L. (2015). Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. Molecules, 20, 7329–7358. <https://doi.org/10.3390/molecules20047329>
- Guandalini Cunha, B., Duque, C., Sampaio Caiaffa, K., Massunari, L., Araguê Catanoze, I., dos Santos, D. M., de Oliveira, S. H. P., & Guiotti, A. M. (2020). Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. Archives of Oral Biology, 109(September 2019).

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104577>

Gupta, M., Sharma, R., & Kumar, A. (2018). Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Computational Biology and Chemistry*, 76(June), 210–217.

<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005>

Hairul Islam, M. I., Arokiyaraj, S., Kuralarasan, M., Senthil Kumar, V., Harikrishnan, P., Saravanan, S., Ashok, G., Chellappandian, M., Bharanidharan, R., Muralidaran, S., & Thirugnanasambantham, K. (2020). Inhibitory potential of EGCG on *Streptococcus mutans* biofilm: A new approach to prevent Cariogenesis. *Microbial Pathogenesis*, 143(February), 104129. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104129>

Hamada, S., & Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44(2), 331–384. <https://doi.org/10.1128/membr.44.2.331-384.1980>

Hanwell, M. D. Curtis, D. E Lonie, D. C. Vandermeersch, T., Zurek, E. y Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.aim.2014.05.019>

Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2011). Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*, 408(2), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.028>

Jaña, G. A. (2018). QM/MM Approach on the structural and stereoelectronic Factors governing glycosylation by GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *Organic y Biomolecular Chemistry*, 14, 1–4. <https://doi.org/10.1039/C8OB00284C>

Jiménez, C. (2002). Análisis de Interfases Metálicas y Su Modificación Por Bombardeo Iónico.

Universidad Complutense de Madrid.

Kidd, E. (2005). Essentials of Dental Caries. In Oxford University Press (3rd ed., Vol. 4, Issue 3).

Koes, D. R., Baumgartner, M. P., & Camacho, C. J. (2013). Lessons learned in empirical scoring with smina from the CSAR 2011 benchmarking exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(8), 1893–1904. <https://doi.org/10.1021/ci300604z>

Kumar, S., & Kumar, S. (2019). Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In *In Silico Drug Design* (pp. 161–189). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816125-8.00006-7>

Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling principles and applications* (2nd ed.). Prentice Hall.

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Leeuwen, S. S. Van, Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, alpha-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037>

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>

Ministerio de salud. (2014). IV Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB IV (Vol. 3).

Morris y Olson, A. (2009). Autodock4 y AutoDockTools4: acoplamiento automático con flexibilidad de receptor selectivo. *Computational Chemistry*, 16, 85–96. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

Ochoa, R., Martínez-Pabón, M. C., Arismendi-Echeverri, M. A., Rendón-Osorio, W. L., &

- Muskus-López, C. E. (2017). In silico search of inhibitors of *Streptococcus mutans* for the control of dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 83, 68–75. <https://doi.org/doi:10.1016/j.archoralbio.2017.06.027>
- Osorio, M. I., Zúñiga, M. A., Mendoza, F., Jaña, G. A., & Jiménez, V. A. (2018). Modulation of glucan-enzyme interactions by domain V in GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *WILEY Proteins*, July, 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.25624>
- Pan, W., Fan, M., Wu, H., Melander, C., & Liu, C. (2015). A new small molecule inhibits *Streptococcus mutans* biofilms in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1403–1411. <https://doi.org/10.1111/jam.12940>
- Ren, Z., Cui, T., Zeng, J., Chen, L., Zhang, W., Xu, X., Cheng, L., Li, M., Li, J., Zhou, X., & Li, Y. (2016). Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 126–135. <https://doi.org/10.1128/AAC.00919-15>
- Rodríguez Quintanilla, R., Ruiz Nova, C., Arias Moyano, G., Castro Salazar, H., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(1), 77–85.
- Sánchez, L., Mendoza, F., Alderete, J. B., Jiménez, V. A., & Jaña, G. A. (2019). The role of conserved arginine in the GH70 family: A computational study of the structural features and their implications on the catalytic mechanism of GTF-SI from: *Streptococcus mutans*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 17(25), 6269–6276. <https://doi.org/10.1039/c9ob01055f>
- Santillán, M. (2015). El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia.

Universidad Nacional Autónoma de México.

http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia

Santos, L. H. S., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. In *Docking Screens for Drug Discovery, Methods in Molecular Biology* (1st ed., Vol. 2053, p. 22). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2

Schött, G., Liesegang, S., Gaunitz, F., Gleß, A., Basche, S., Hannig, C., & Speer, K. (2017). The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *Fitoterapia*, 121(May), 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.07.005>

Schwartz, R. Anachem, M. S. G., Fritz, T., & Anachem, D. (2012). *Molecular Modelling for Beginners* (2nd ed.).

Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. In *Lancet* (Vol. 369, Issue 9555, pp. 51–59). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)

Studio, D. (2015). Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5. Accelrys Software Inc.

Teles, B., Murbach, Braga, C. P., Carolo, K., Barbosa, L. N., Lúcia, V., Rall, M., Sforcin, J. M., Angélica, A., Fernandes, H., & Júnior, A. F. (2014). Effect of Inhaling *Cymbopogon martinii* Essential Oil and Geraniol on Serum Biochemistry Parameters and Oxidative Stress in Rats. *Biochemistry Research International*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/493183>

Tofiño-Rivera, A., Ortega-Cuadros, M., Galvis-Pareja, D., Jiménez-Rios, H., Merini, L. J., &

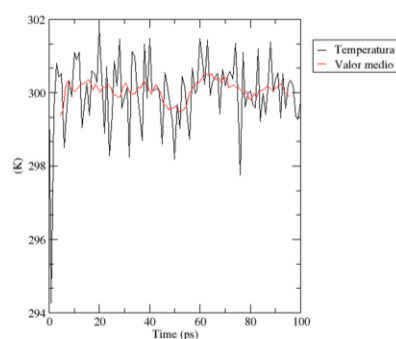
- Martínez-Pabón, M. C. (2016). Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 749–754. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.044>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2012). Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 32, 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>
- Zhang, Q., Nijampatnam, B., Hua, Z., Nguyen, T., Zou, J., Cai, X., Michalek, S. M., Velu, S. E., & Wu, H. (2017). Structure-Based Discovery of Small Molecule Inhibitors of Cariogenic Virulence. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06168-1>

Apéndices

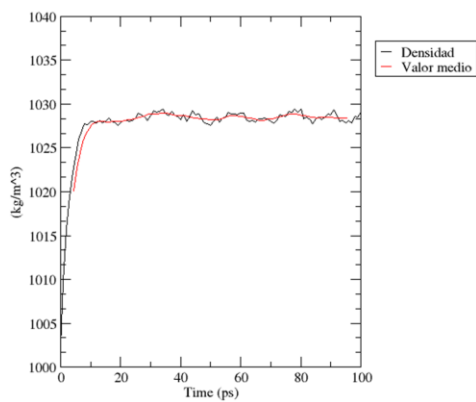
Apéndice A. *Propiedades fisicoquímicas de las dinámicas moleculares*

Resultado de las propiedades fisicoquímicas de la dinámica molecular entre la proteína y la citronelal

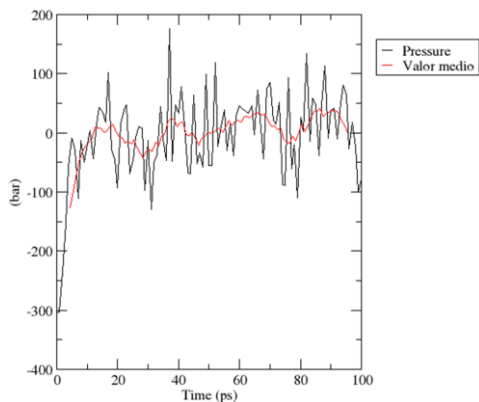
Temperatura



Densidad

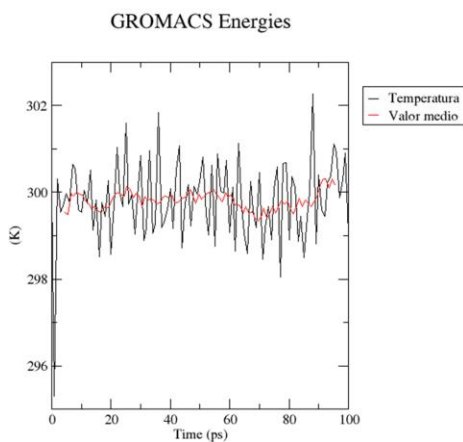


Presión

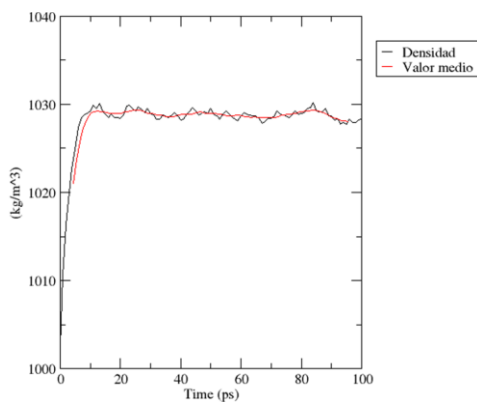


Resultado de las propiedades fisicoquímicas de la dinámica molecular entre la proteína y el geraniol

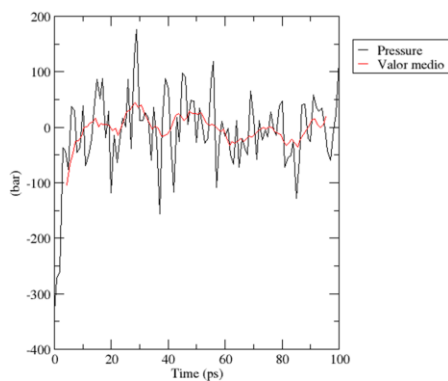
Temperatura



Densidad

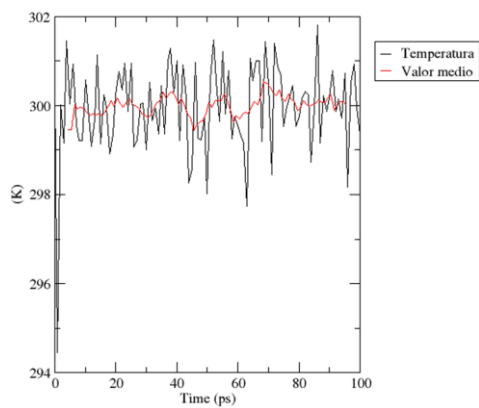


Presión

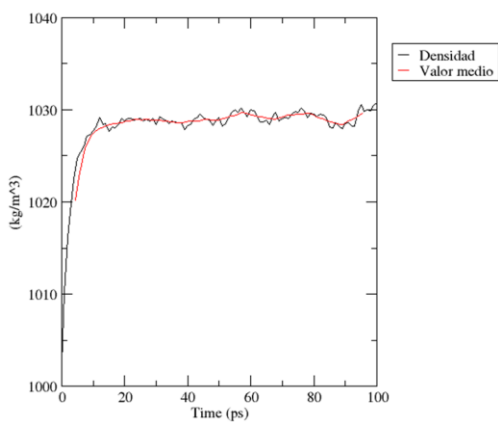


Resultado de las propiedades fisicoquímicas de la dinámica molecular entre la proteína y el timol

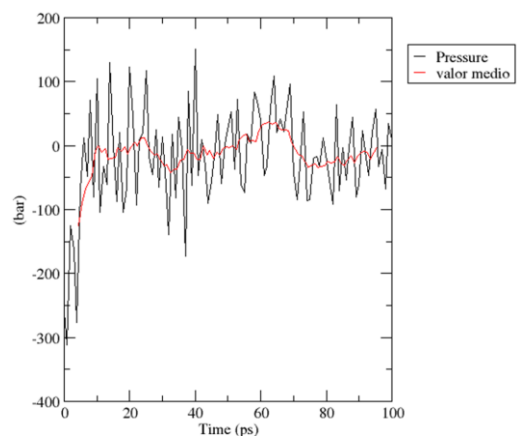
Temperatura



Densidad

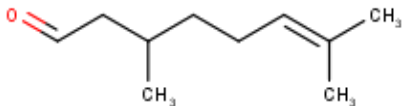


Presión

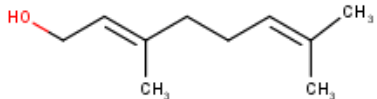


Apendice B. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon martinii* y *Thymus vulgaris*

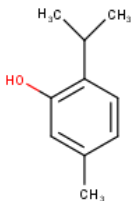
Componentes químicos del aceite esencial *Cymbopogon nardus*

Aceite esencial	Compuesto químico	Porcentaje	Componente mayoritario	Referencia
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronellal	27,53		(Guandalini Cunha et al., 2020)
	Citronellol	25,00		
	Nerol	21,89		
	Geranial	0,67		
	Eugenol	0,50		
	Otros	25,80		

Componentes químicos del aceite esencial *Cymbopogon martinii*

Aceite esencial	Compuesto químico	Porcentaje	Componente mayoritario	Referencia
<i>Cymbopogon martinii</i>	Geraniol	69,6 ± 1,6		(Rodríguez Quintanilla et al., 2012)
	Acetato de geranilo	15,6 ± 0,3		
	Otros	14,80		

Componentes químicos del aceite esencial *Thymus vulgaris*

Aceite esencial	Compuesto químico	Porcentaje	Componente mayoritario	Referencia
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	37,70		(Schött et al., 2017)
	Terpineno	10,40		
	Terpineol	2,00		
	Cimeno	7,70		
	Carvacrol	5,00		
	Otros	37,20		

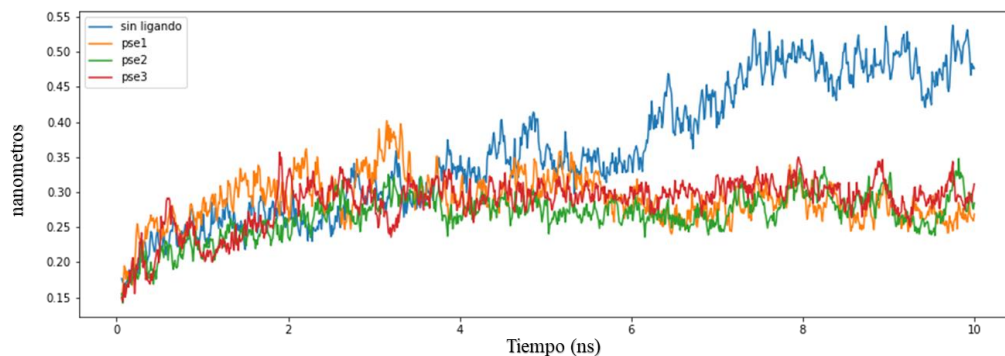
Apendice C. Condiciones de acoplamiento

Condiciones de acoplamiento

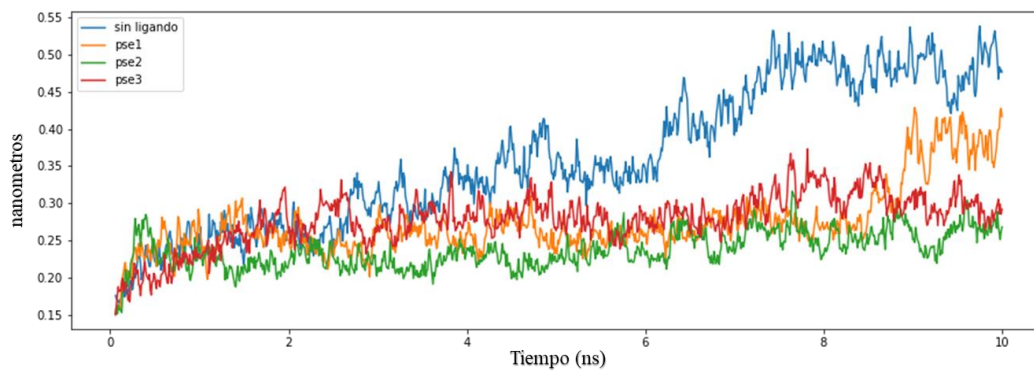
Programa	Tamaño de caja			Centro de caja			Número de resultados	Exhaustividad
	x	y	z	x	y	z		
Vina	46	50	48	194.05	42.996	195.375	10	100
Smina	46	50	48	194.05	42.996	195.375	10	100
Autodock	46	50	48	194.05	42.996	195.375	10	100

Apéndice D. RMSD de los complejos formados*Análisis RMSD del complejo 3AIE – Citronelal*

RMSD de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses del acoplamiento

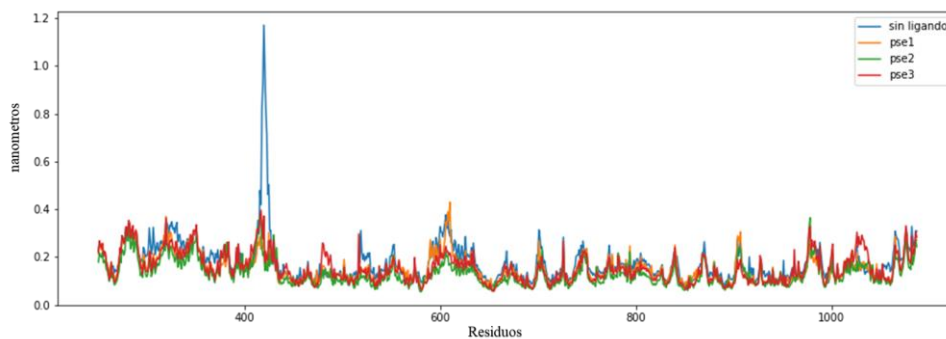
*Análisis RMSD del complejo 3AIE – Timol*

RMSD de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses del acoplamiento

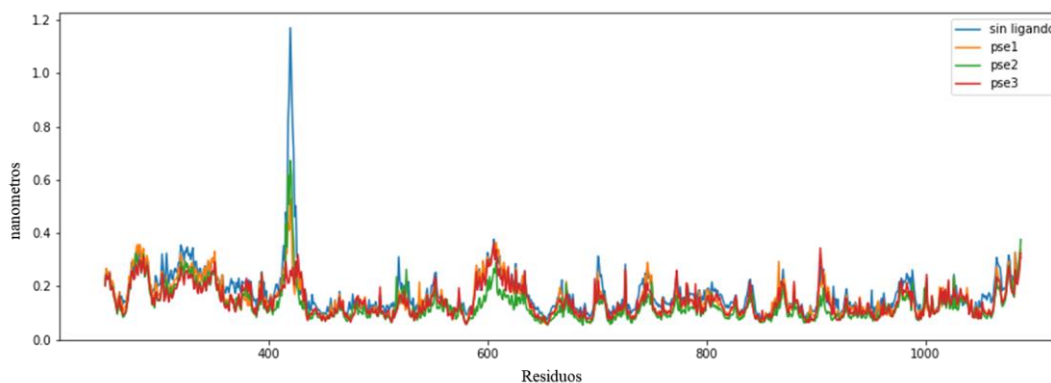


Apéndice E. Apéndice A RMSF de los complejos formados*Análisis RMSF del complejo 3AIE – Citronelal*

RMSF de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses del acoplamiento entre la enzima y citronelal

*Análisis RMSF del complejo 3AIE - Timol*

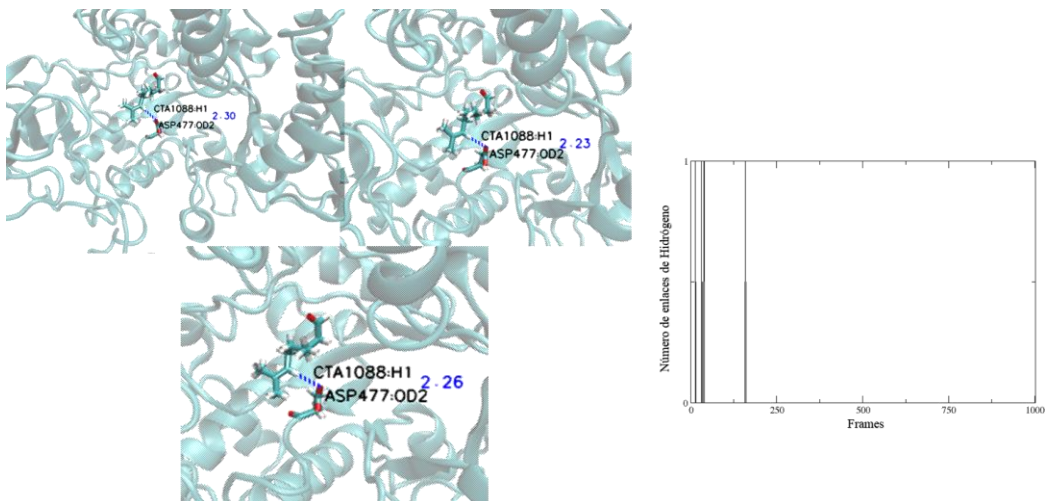
RMSF de la enzima sin ligando y de las tres primeras poses del acoplamiento entre la enzima y timol



Apendice F. Formación de puentes de hidrógeno

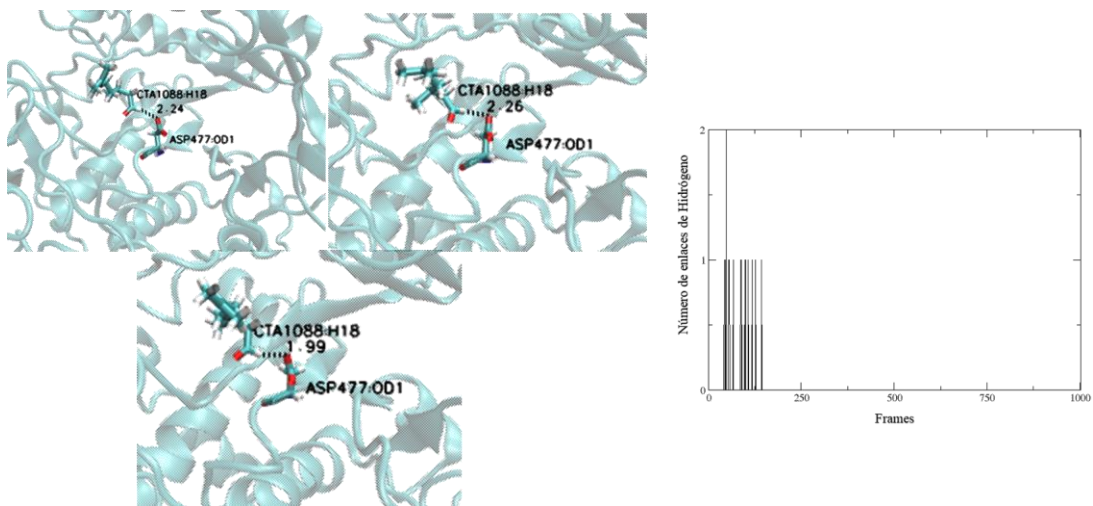
Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 477 pse-2

Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 477 pse-2



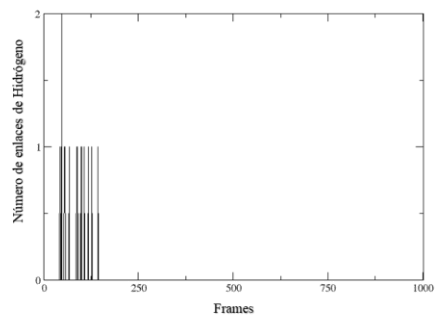
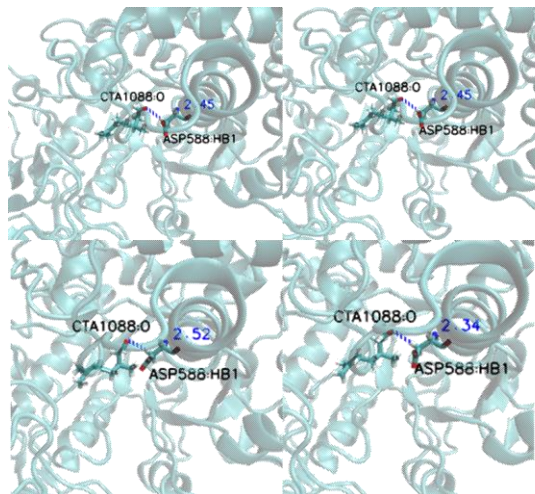
Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 477 pse-2

Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 477 pse-3



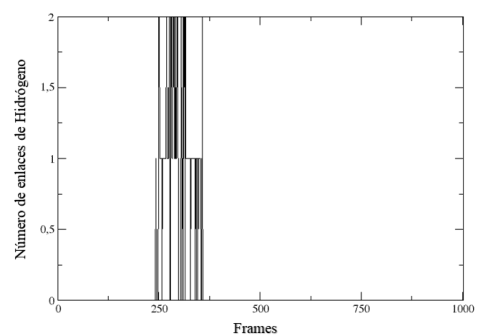
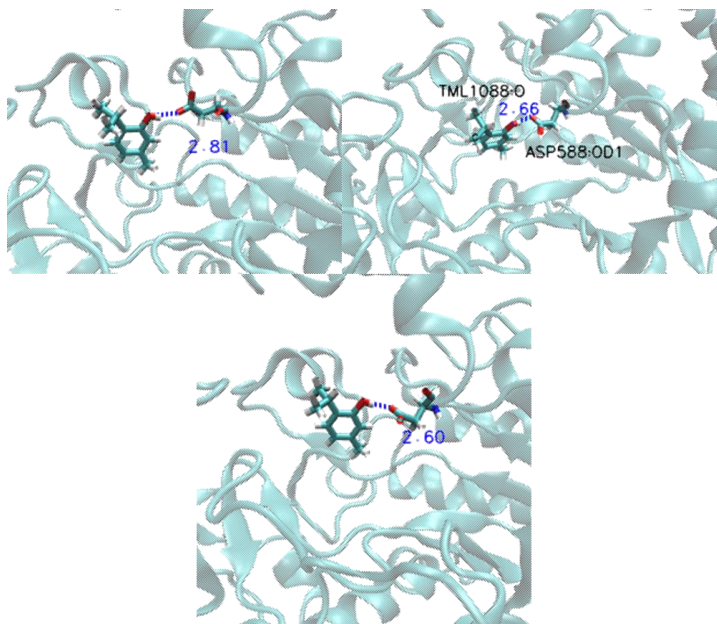
Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 588 pse-2

Formación de puentes de hidrógeno entre citronelal y aspartato 588 pse-3



Apendice G. Formación de enlaces de hidrógeno*Formación de enlaces de hidrógeno timol y ASP588 pse-2*

Formación de puentes de hidrógeno entre timol y aspartato 588 pse-2



Apendice H. *Parámetros utilizados para realizar la simulación*

Script para minimizar el sistema

Título	Minimización
*	
Integrator	=steep
emtol	= 1000.0
emstep	= 0.01
nsteps	50000
**	
nstlist	= 1
cutoff- scheme	= Verlet
ns_type	= grid
rlist	= 1.2
coulombtype	= PME
vdwtype	= cut-off
vdw- modifier	= force-switch
rvdw-switch	= 1.0
rvdw	= 1.0
pbc	= xyz

* Parámetros que describen lo que se realizó y cada cuanto se guarda la información

** Parámetros que describen como ubicar los átomos vecinos y calcula las interacciones

Script para equilibrar el sistema NVT

Titulo	Equilibrio NVT Protein- ligand
Define	==DPOSRES
integrator	md
nsteps	50000
dt	= 0.002
nstenergy	500
nstlog	500
nstxout-compressed	500
*	
continuation	no
constraint_algorithm	lincs
constraints	h-bonds
lincs_iter	1
lincs_order	4
**	
cutoff-scheme	Verlet
ns_type	grid ;
nstlist	20 ;
rlist	1.2
vdwtype	Cutoff
vdw-modifier	force-switch
rvdw-switch	1.0
rvdw	1.2

coulombtype	PME
rcoulomb	1.2
pme_order	4
fourierspacing	0.16

tcoupl	V-rescale
tc-grps	Protein_ligand Water_and_ions
tau_t	0.1 0.1
ref_t	300 300

pcoupl	no

gen_vel	Yes
gen_temp	300
gen_seed	-1

* Parámetros de enlace

** Búsqueda de átomos vecinos y Van der Waals

*** Electrostática

**** Acoplamiento de temperatura

***** Acoplamiento de presión

***** Generación de velocidad

Script para equilibrar el sistema NPT

Titulo	Equilibrio NPT Protein- ligand
Define	=-DPOSRES
integrator	md
nsteps	50000
dt	= 0.002
nstenergy	500
nstlog	500
nstxout-compressed	500
*	
continuation	yes
constraint_algorithm	lincs
constraints	h-bonds
lincs_iter	1
lincs_order	4
**	
cutoff-scheme	Verlet
ns_type	grid ;
nstlist	20 ;
rlist	1.2
vdwtype	Cutoff
vdw-modifier	force-switch
rvdw-switch	1.0
rvdw	1.2

coulombtype	PME
rcoulomb	1.2
pme_order	4
fourierspacing	0.16

tcoupl	V-rescale
tc-grps	Protein_ligan d Water_and_i ons

tau_t	0.1 0.1
ref_t	300 300

pcoupl	Berendsen
pcoupltype	Isotropic
tau_p	2.0
ref_p	1.0
compressibility	4.5e-5
refcoord_scaling	Com

* Parámetros de enlace

** Búsqueda de átomos vecinos y Van der Waals

*** Electrostática

**** Acoplamiento de temperatura

***** Acoplamiento de presión

Script para realizar la dinámica molecular

Titulo	Simulación de dinámica molecular
Integrator	md
nsteps	5000000
dt	0.002
nstenergy	5000
nstlog	5000
nstxout_compressed	5000
*	
continuation	yes
constraint_algorithm	lincs
constraints	h-bonds
lincs_iter	1
lincs_order	4
**	
Cut-off-scheme	Verlet
ns_stype	grid
nstlist	20
rlist	1.2
vdwtype	cutoff
vdw_modifier	force-switch
rvdw_switch	1.0
rvdw	1.2

coulombtype	PME
rcoulomb	1.2
pme_order	4
fourierspacing	0.16

tcoupl	V-rescale
tc-grps	Protein_ligand Water_and_ions
tau_t	0.1 0.1
ref_t	300 300

	Parrinello-
pcoupl	Rahman
pcoupltype	isotropic
tau_p	2.0
ref_p	1.0
compressibility	4.5e-5

pb	xyz

gen_vel	no

* Parámetros de enlace

** Búsqueda de átomos vecinos y Van der Waals

*** Electrostática

**** Acoplamiento de temperatura

***** Acoplamiento de presión

***** Condiciones periódicas de contorno

***** Generación de velocidad