

**ESTUDIO *IN SÍLICO* DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE ANESTÉSICOS
LOCALES EN EL CANAL DE SODIO $Na_v1.7$ UNA DIANA FARMACOLÓGICA
SOBRE LA PULPA DENTAL INFLAMADA**

**ISABELLA MANZUR VILLALOBOS
M.Sc. (c) en Farmacología**

**DR. ANTISTIO ANIBAL ALVIZ AMADOR
M.Sc. NEYDER CONTRERAS PUENTES
DRA. MARLENE DURAN LENGUA**

**FACULTAD DE MEDICINA – UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA
GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES Y TRATAMIENTOS
ODONTOLÓGICOS UNIVERSIDAD DE CARTAGENA GITOU
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA.
GRUPO DE INVESTIGACION FARMABAC
CARTAGENA DE INDIAS 2021**

**ESTUDIO *IN SÍLICO* DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE ANESTÉSICOS
LOCALES EN EL CANAL DE SODIO $Na_v1.7$ UNA DIANA FARMACOLÓGICA
SOBRE LA PULPA DENTAL INFLAMADA**

ISABELLA MANZUR VILLALOBOS

M.Sc. (c) en Farmacología

TUTOR

DR. ANTISTIO ANIBAL ALVIZ AMADOR

COTUTORES

M.Sc. NEYDER CONTRERAS PUENTES

DRA. MARLENE DURAN LENGUA

**FACULTAD DE MEDICINA – UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
GRUPO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIONES Y TRATAMIENTOS
ODONTOLÓGICOS UNIVERSIDAD DE CARTAGENA GITOU
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA.
GRUPO DE INVESTIGACION FARMABAC
CARTAGENA DE INDIAS 2021**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por ser nuestro motivo y motor de vida.

A mi tía Martha por apoyarme en este sendero y por buscar lo mejor para mi.

*A toda la comunidad académica y científica para que esto sea un granito de arena
que se adicione al gran mundo de la odontología y la farmacología.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, la Virgen María y el Espíritu Santo por haberme acompañado e iluminado durante toda la realización de este proyecto y sobretodo en el recorrido de mis estudios.

Al Dr. Antistio Alviz y Neyder Contreras, no solo por enseñarme el hermoso mundo de la farmacología computacional sino también por brindarme siempre todas las herramientas, conocimientos y aptitudes necesarias para realizar y culminar este proyecto, además de dedicarme el tiempo que fuera requerido para generar un proyecto bien estructurado.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GENERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MARCO TEÓRICO	16
4. METODOLOGÍA	27
4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LIGANDOS	27
4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL RECEPTOR	27
4.3. IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN	28
4.4. VALIDACIÓN DE PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR 28	
4.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR	28

4.6.	DINÁMICA MOLECULAR.....	29
4.7.	PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS Y TOXICOLÓGICAS Y SIMILITUD DE DROGAS	31
5.	RESULTADOS.....	32
5.1.	SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LIGANDOS.....	32
5.2.	SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL RECEPTOR	34
5.3.	IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN	36
5.4.	VALIDACIÓN DE PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR 37	
5.5.	ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL CRIBADO VIRTUAL.....	39
5.6.	DINÁMICA MOLECULAR.....	43
5.7.	PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS Y TOXICOLÓGICAS Y SIMILITUD DE DROGAS	47
6.	DISCUSIÓN.....	49
7.	CONCLUSIONES.....	55
8.	RECOMENDACIONES	56
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
10.	ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de simulaciones de DM desarrolladas en el estudio.	30
Tabla 2. Predicción de bolsillos de unión en canal Na _v 1.7 por servidores en línea de PrankWeb, CASTp y PockDrug. Residuos de interacción implicados en el sitio de unión de los anestésicos locales al canal Na _v 1.7. * Los residuos de aminoácidos resaltados en negrilla corresponden a los residuos vinculados en el sitio activo de los anestésicos locales.	36
Tabla 3. Interacción entre los residuos de aminoácidos en el canal Na _v 1.7 y ligandos (flecainida, lidocaína, dibucaína, 22578003 y 92367865).	40
Tabla 4. Propiedades ADME y toxicidad oral aguda de dibucaína, 22578003 y 92367865 realizadas por servidores de predicción en línea SwissADME, ADMETSAR y GUSAR.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de anestésicos locales tipo amino-amida.	17
Figura 2. Estructuras químicas de anestésicos locales tipo amino-éster.	18
Figura 3. Estructura de canal de sodio dependiente de voltaje $Na_v1.7$. (A) Vista frontal. (B) Vista superior, donde se observan las cadenas A, B, C y D.	19
Figura 4. Fibras A Delta y C involucradas en las vías de transmisión de dolor, que inicia desde el lugar del estímulo en la pulpa dental hasta la medula espinal a través de la raíz dorsal de la médula espinal.	21
Figura 5. Artículos científicos de canales de sodio dependientes de voltaje $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$ asociados a pulpa dental.	22
Figura 6. 3267 ligandos seleccionados para cribado virtual: flecainida, 10 anestésicos locales y 3256 análogos estructurales.	32
Figura 7. Criterios de selección para análogos estructurales de anestésicos locales. Los análogos estructurales de Ropivacaína y Levobupicaína se encuentran incluidos dentro de Bupivacaína.....	33
Figura 8. Asociación de anestésicos locales tipo amida al receptor del canal de sodio a través de la base de datos PubChem.*SCN9A: Canal $Na_v1.7$. SCN4A: Canal $Na_v1.4$ SCN3A: Canal $Na_v1.3$. SCN5A: Canal $Na_v1.5$. SCN2A: Canal $Na_v1.2$. SCN1A: Canal $Na_v1.1$	34
Figura 9. Superposición del canal $Na_v1.7$ humano (PDB 5EK0) y nuevo modelo por homología. (A). La corrección del espacio entre Tyr594 y Pro595 se corrigió con Phe590, Val591, Ser592 en la cadena C. (B). Corrección del espacio en la cadena D entre Tyr836 y Pro837 con Phe835, Val836 y Ser837.....	35

Figura 10. Alineación de las secuencias del canal Nav1.7 humano (PDB 5EK0) y el canal NavAb (PDB 6MVX) utilizando secuencias de PROTEIN BLAST Align. Consulta: canal NavAb. Asunto: canal Nav1.7 humano.	36
Figura 11. A. Alineación de flecainida acoplada nuevamente en el canal NavAb y la flecainida co-cristalizada en el canal NavAb (código PDB: 6MVX). RMSD: 1.157 Å. B. Alineación de canal NavAb (código PDB: 6MVX) y canal Nav1.7, con un RMSD de 1.560 Å.....	38
Figura 12. Alineación de Nav1.7-flecainida co-cristalizada con complejo de acoplamiento Nav1.7-flecainida. Los residuos encerrados en un círculo rojo (Thr186 (A), Leu187 (A), Thr431 (B), Thr676 (C), Leu677 (C)) corresponden a los mismos residuos de interacción de ambos complejos.....	39
Figura 13. Interacciones de residuos entre anestésicos locales y análogos frente a la proteína Nav.1.7. (A). 92367865. (B). 22578003.....	41
Figura 14. Interacciones de residuos entre anestésicos locales y análogos frente a la proteína Nav.1.7. (A). Flecainída. (B). Dibucaína.	42
Figura 15. Interacciones de residuos en complejo lidocaína frente a la proteína Nav1.7.....	42
Figura 16. Dinámica molecular del canal Nav1.7 nativo, flecainida, lidocaína, dibucaína, 92367865 y 22578003. (A) RMSD. (B) RMSF.....	45
Figura 17. Dinámica molecular del canal Nav1.7 nativo, flecainida, lidocaína, dibucaína, 92367865 y 22578003. (A) SASA. (B) Rg análisis de todas las trayectorias.....	46

RESUMEN

Las vías del dolor se transmiten a través de las fibras sensitivas A delta y C, donde se encuentran los canales Na_v1s . Los subtipos $\text{Na}_v1.7$, 1.8 y 1.9 se expresan y se asocian con la pulpa dental inflamada, pero existen pocos estudios computacionales que muestren su interacción con los anestésicos locales. El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento de los anestésicos locales y los análogos estructurales frente al canal $\text{Na}_v1.7$ mediante el acoplamiento y la dinámica molecular, y predecir los parámetros farmacocinéticos y toxicológicos de los ligandos más afines. Se seleccionaron 3267 ligandos para cribado virtual: 1 ligando de control (Flecainida), 10 anestésicos locales tipo amida, 3256 análogos estructurales con canal $\text{Na}_v1.7$ humano (PDB 5EK0). Se realizó un modelo de homología del canal $\text{Na}_v1.7$ humano para correcciones de espacios en la secuencia de aminoácidos. La validación del protocolo molecular se realizó con el complejo Na_vAb -Flecainida (PDB 6MVX). El acoplamiento molecular se desarrolló a través de AutoDock Vina utilizando bash scripting para calcular la energía de unión de mayor afinidad entre ligando-receptor; la simulación de dinámica molecular fue desarrollada a través del software PMEMD de AMBER16 y permitió evaluar el comportamiento y la estabilidad de complejos con la mejor afinidad. Se realizó una búsqueda predictiva de las propiedades ADME y toxicidad utilizando SwissADME, ADMETSAR y GUSAR Toxicology Prediction. En el acoplamiento molecular 92367865 presentó la mejor energía de enlace ($-6,4 \pm 0.0$ Kcal/mol), seguido por 22578003 con -6.3 ± 0.15 Kcal/mol, con interacciones mediante enlaces hidrófobos comunes con los residuos Met185 (A), Leu187 (A), Leu432 (B) y un solo enlace de hidrógeno en residuo Thr462 (B). En estudio de dinámica molecular se evidenció que el ligando 92367865 mostró el mejor comportamiento de estabilidad, movilidad, accesibilidad al solvente y compactación en los valores de RMSD, RMSF, SASA y R_g respectivamente, similares al canal $\text{Na}_v1.7$ nativo, en comparación con los complejos de lidocaína, dibucaína, 22578003 y flecainida. En la predicción de propiedades ADME y toxicidad, ninguna de las moléculas violó las reglas de Lipinski

y mostraron una clasificación de toxicidad oral tipo III. En conclusión, 92367865 podría considerarse como un fármaco promisorio como anestésico local en condiciones inflamatorias al bloquear las vías del dolor a través del canal $Na_v1.7$.

Palabras clave: anestésicos locales, canales de sodio, docking molecular, simulación de dinámica molecular.

ABSTRACT

Pain pathways are transmitted through sensory fibers A delta and C, where the Na_v1 s channels meet. $\text{Na}_v1.7$, 1.8 and 1.9 subtypes are expressed and associated with inflamed dental pulp, but there are few computational studies showing its interaction between local anesthetics. The aim of this study was to evaluate the behavior of local anesthetics and structural analogues against $\text{Na}_v1.7$ channel through molecular docking and dynamics, and predicting pharmacokinetic and toxicological parameters for top ligands. 3267 ligands were selected for virtual screening: 1 control ligand (Flecainide), 10 local anesthetics, 3256 structural analogs with $\text{Na}_v1.7$ (PDB 5EK0). Homology model of $\text{Na}_v1.7$ was performed for gap corrections in the amino acid sequence. Molecular protocol validation was performed with Na_vAb -Flecainide complex (PDB 6MVX). Molecular docking was developed through AutoDock Vina using bash scripting to calculate the highest affinity binding energy between ligand-receptor. Molecular dynamics simulation was developed through PMEMD of AMBER16 software, which allowed to evaluate behavior and stability of complexes with the best affinity. A predictive search of the ADME and toxicological properties were carried out using SwissADME, ADMETSAR and GUSAR Toxicology Prediction. On molecular docking 92367865 presented best binding energy (-6.4 ± 0.0 Kcal/mol), followed by 22578003 with -6.3 ± 0.15 Kcal/mol, with common hydrophobic bonds interactions with residues Met185 (A), Leu187 (A), Leu432 (B) and only one hydrogen bond on residue Thr462 (B). On molecular dynamics study it was evidenced that 92367865 had the best stability, mobility, solvent accessibility and compactability behavior on RMSD, RMSF, SASA and Rg scores respectively, in comparison to lidocaine, flecainide and 22578003 complexes. In ADME and toxicological properties prediction, none of the molecules had no violations of Lipinski's rules and oral toxicity class III. In conclusion, 92367865 could be considered as a promissory drug as local anesthetics under inflammatory conditions by blocking pain pathways through $\text{Na}_v1.7$ channel.

Keywords (Mesh Database): Anesthetics, Local; Sodium Channels; Molecular Docking Simulation; Molecular Dynamics Simulation; Dental Pulp.

1. INTRODUCCIÓN

En odontología, el dolor dental está asociado a un proceso infeccioso o inflamatorio que involucra la pulpa dental; la cual está fuertemente inervada por fibras sensitivas de tipo A delta y C (1). Estas fibras sensitivas transportan la nocicepción desde la pulpa dental hasta la médula espinal a través de la raíz dorsal de la médula espinal; dentro de estas fibras sensitivas encontramos los receptores de los canales de sodio dependientes de voltaje, que son los principales objetivos farmacológicos de los anestésicos locales (2), cuyo mecanismo de acción es bloquear las vías del dolor mediante su clivaje a canales de sodio dependientes de voltaje intracelulares, inhibiendo la generación o propagación de un potencial de acción y por ende, bloqueando reversiblemente el impulso nervioso (3).

Estructuralmente, los anestésicos locales se componen de tres estructuras químicas: un anillo aromático lipófilo, una cadena intermedia con un grupo funcional y un grupo amino terminal hidrófilo (4), cada uno de sus compuestos le confiere propiedades diferentes. Los anillos aromáticos determinan la solubilidad en lípidos de AL (5); la cadena intermedia es responsable de disminuir la toxicidad de la solución y mantener el equilibrio en la estructura separando el grupo lipofílico del hidrofílico (4,6). Las AL se clasifican según el grupo funcional de la cadena intermedia y su unión al amino terminal de la estructura; pueden ser amino-amida o amino-éster (7). Debido a que el aminoéster de AL tiene una alta toxicidad sistémica y reacciones alérgicas asociadas, las amidas de tipo AL son las más utilizadas en la actualidad en odontología (5,6,8,9).

Los canales de sodio dependientes de voltaje, también llamados Na_v , son proteínas transmembrana que se componen de subunidades alfa y beta. La subunidad alfa está ubicada en el centro, caracterizada por ser el canal formador de poros y es la principal unidad conductora de sodio dentro de la célula, con 24 segmentos transmembrana divididos en cuatro dominios repetidos que contienen seis segmentos respectivamente (S1-S6); en cambio, las subunidades beta son

moduladoras de la actividad y de la apertura o cierre del canal, contienen un pequeño dominio transmembrana compuesto por un grupo N-terminal extracelularmente y un grupo C-terminal intracelular (10). Los subtipos de canal de sodio dependientes de voltaje más implicados en las vías de transmisión del dolor desde la cavidad oral son los subtipos 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, que se encuentran en la raíz dorsal de la médula espinal (11). En odontología se han realizado diversos estudios experimentales con respecto a la expresión de los diferentes subtipos de canales de sodio voltaje dependientes asociados a la pulpa dental, los subtipos más predominantes en fibras sensitivas de la pulpa dental normal son $Na_v1.6$, 1.8, 1.9. Por otro lado, investigaciones experimentales mostraron que en la pulpa dental inflamada los subtipos más expresados son $Na_v1.7$, 1.8, 1.9 (12).

Sin embargo, hoy en día la mayor parte de la evidencia científica que evalúan los anestésicos locales en los canales de sodio dependiente del voltaje son estudios de casos y controles clínicos o estudios experimentales, pero existe muy poca literatura sobre estudios moleculares y computacionales que muestren la interacción entre los anestésicos locales y canales $Na_v1.7$, 1.8 y 1.9 asociados con la vía de transmisión del dolor, que muestran cómo y dónde se unen los AL o los análogos de AL a los receptores Na_v .

Los estudios *in silico* poseen la gran ventaja de poder evaluar cualquier estructura o complejo de manera más detallada a nivel molecular. Además, a través de ellos se pueden buscar e identificar nuevas dianas farmacológicas o sitios de clivaje con múltiples compuestos, el cual en este caso se realiza para evidenciar la interacción de los anestésicos locales en los Na_v1s asociados a pulpa dental inflamada. Se cree que los AL se unen a los canales de sodio dependientes del voltaje mediante su clivaje al dominio del poro central según resultados obtenidos por Gamal y col en 2018, donde se observó una fuerte densidad electrónica dependiente de fármacos en la cavidad del poro central (13).

El objetivo de este estudio fue conocer a través del acoplamiento y dinámica molecular el comportamiento de posibles nuevos anestésicos locales y sus análogos estructurales sobre el canal de sodio $\text{Na}_v1.7$ y evaluar su utilidad promisorio en procesos inflamatorios y de dolor en odontología, teniendo en cuenta que el canal de sodio $\text{Na}_v1.7$ humano ya está cristalizado y disponible en línea (14).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Realizar cribado virtual mediante acoplamiento y dinámica molecular de anestésicos locales y análogos estructurales frente al receptor de canal de sodio $Na_v1.7$.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar diferentes anestésicos locales usados actualmente en odontología y análogos estructurales en las bases de datos.
- Identificar el receptor de canal de sodio dependiente de voltaje asociado a anestésicos locales en las bases de datos.
- Evaluar afinidad de los anestésicos locales y sus análogos estructurales con el receptor $Na_v1.7$ mediante acoplamiento molecular.
- Analizar mediante simulaciones de dinámica molecular el complejo receptor-ligando de mayor afinidad.
- Predecir las propiedades farmacocinéticas ADME y toxicológicas para los ligandos de mayor afinidad.

3. MARCO TEÓRICO

ANESTÉSICOS LOCALES

La anestesia local en odontología se ha convertido en una parte fundamental para muchos procesos donde es necesario suprimir la sensación dolorosa de la estructuras dentarias o tejidos, tales como extracciones dentarias, colocación de implantes, regeneración ósea, gingivectomía, excisiones de tejidos patológicos y tratamientos endodónticos, entre otros (15).

En general los anestésicos locales son vasodilatadores e incrementan el flujo sanguíneo en el área donde son inyectados, por lo que por sí solos proveen anestesia de corta duración y poco profunda. Sus características farmacocinéticas van a depender de ciertos factores como: su unión a proteínas plasmáticas, pH, sitio de acción, estructura química y sus propiedades físicas. La absorción de los AL desde el sitio de colocación dependerá en gran parte de su solubilidad lipídica, si se administra junto con un vasoconstrictor y también de la vascularidad de la zona donde se administró (8). Es por esto que el vasoconstrictor es adicionado al anestésico local para incrementar la duración del efecto anestésico, reducir la absorción y la toxicidad sistémica ya que disminuyen el flujo sanguíneo en la zona inyectada (16).

La propiedad farmacocinética de unión a proteínas es muy importante puesto que entre más afinidad de unión tengan hacia las proteínas plasmáticas, mayor cantidad de anestésico se unirá a las proteínas de los canales de sodio, y de esta manera, bloquearán por mayor tiempo, aumentando la duración del efecto; por ejemplo, la lidocaína tiene un 65% de unión a proteínas, en cambio, la bupivacaína tiene una unión a proteínas de 95%, lo cual explica por qué la bupivacaína posee un mayor efecto anestésico (5).

Actualmente, existen distintos tipos de anestésicos locales clínicamente disponibles para su uso odontológico, entre los que encontramos (en orden de mayor a menor uso): lidocaína, articaína, mepivacaína, prilocaína, bupivacaína, etidocaína,

ropivacaína, y levobupivacaína (7,17); su clasificación va a depender de la unión de los compuestos químicos en sus estructuras.

Los AL amino-amidas poseen un metabolismo hepático, principalmente por las enzimas del citocromo P450, su volumen de distribución es amplio y su metabolismo lento por lo cual poseen un efecto más prologado y esto también puede generar mayor posibilidad de toxicidad sistémica (8). El inicio de la acción de estos compuestos es moderado a rápido y el pH de este grupo, sin ningún tipo de aditivos, es de 7.6 a 8.1 (9). Los anestésicos locales cuyas estructuras son amino-amidas encontramos a la articaína, bupivacaína, etidocaína, levobupivacaína, lidocaína, mepivacaína, dibucaína, butinilicaína, prilocaína y ropivacaína (5). (Figura 1)

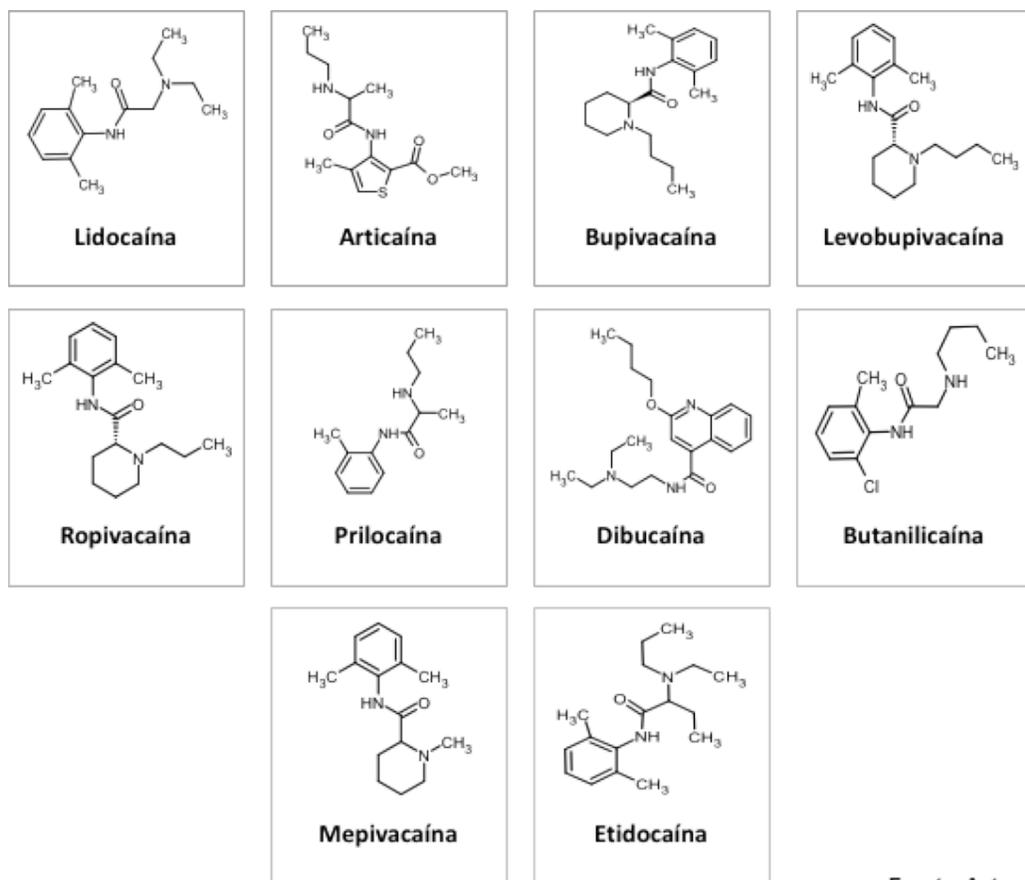


Figura 1. Estructuras químicas de anestésicos locales tipo amino-amida.

A diferencia de los compuestos amino-amidas, los AL con compuestos amino-éster, poseen una duración del efecto anestésico variable, que puede ser corto, moderado o rápido, debido a que poseen un volumen de distribución pequeño debido a que son fácilmente metabolizados a través de las pseudocolinesterasas plasmáticas y excretados por el riñón rápidamente (8); sin embargo, su inicio de acción es lento y poseen un pH alcalino entre 8.5 y 8.9; no son compuestos químicamente tan estables puesto que pueden degradarse con el sol y el calor. Entre los AL que encontramos dentro de este grupo está la benzocaína, cloroprocaina, cocaína, procaína, proparacaína y tetracaína (5).

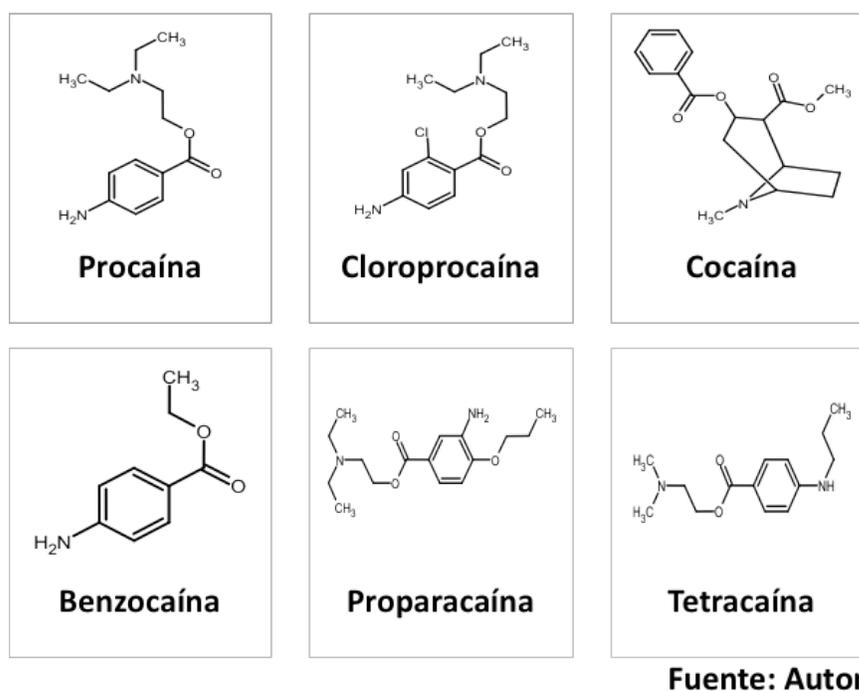


Figura 2. Estructuras químicas de anestésicos locales tipo amino-éster.

Cabe destacar que estos AL amino-éster al metabolizarse se convierten en metabolitos de ácido paraaminobenzoico (PABA), los cuales son altamente alergénicos y es la principal causa de las reacciones alérgicas generadas por anestésicos locales amino-éster; razón por la cual hace más de 60 años estos

anestésicos no se utilizan en odontología, además de comprobar su alta toxicidad sistémica (5,6,8,9).

CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales de sodio dependientes de voltaje, son los receptores transmembrana implicados principalmente en la vía de transducción de los anestésicos locales, compuesto por cuatro cadenas y seis segmentos transmembrana. (Figura 3) Los Na_v poseen 9 genes distintos (también denominados SCN) y, por ende, existen 9 proteínas distintas de canales de sodio dependientes de voltaje, desde $Na_v1.1$ hasta $Na_v1.9$ (18). Éstos Na_v se encuentran a distintos sitios a lo largo de todo el organismo. Se pueden encontrar en el sistema nervioso central, retina, neuronas sensoriales olfatorias, miocardio, células beta pancreáticas, músculo esquelético piel, neurona de la raíz dorsal de la médula espinal e incluso en células de cáncer metastásico (11).

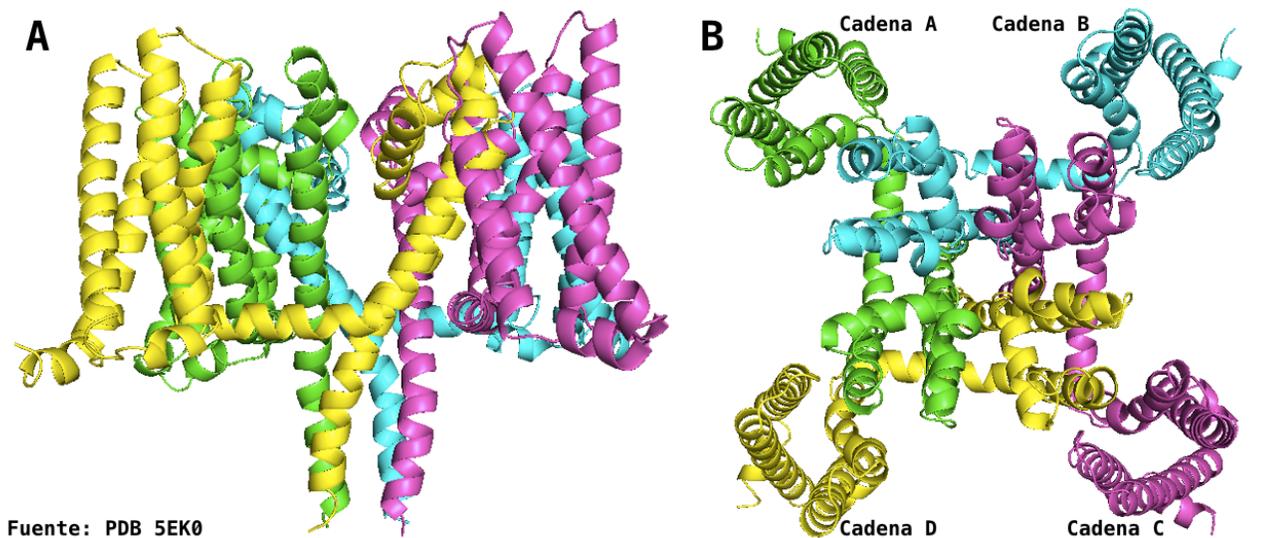


Figura 3. Estructura de canal de sodio dependiente de voltaje $Na_v1.7$. (A) Vista frontal. (B) Vista superior, donde se observan las cadenas A, B, C y D.

Los canales de sodio dependientes de voltaje se pueden encontrar en tres estados: estado en reposo, estado abierto y estado inactivo. Se sabe que los AL actúan en el estado en reposo de los canales de sodio dependientes de voltaje mediante el paso de la fracción no ionizada a través de la membrana lipídica, su unión a hidrogeniones y su formación en RNH^+ generando el clivaje en el poro del receptor del canal de sodio (13,18).

VÍA DE TRANSMISIÓN DEL DOLOR

En odontología, el dolor dental representa el primer motivo de consulta para urgencias odontológicas, siendo éste un dolor insoportable y latente. Este dolor dental se puede asociar a múltiples factores que producen un proceso infeccioso o inflamatorio que generalmente involucra la pulpa dental, altamente innervada por fibras sensitivas tipo A delta y C (19). Las fibras sensitivas A delta se caracterizan por tener una velocidad de conducción media y un diámetro pequeño, se encuentra mielinizadas y se asocia al dolor agudo. Por el contrario, las fibras sensitivas C poseen un diámetro aun más pequeño que las A y una velocidad de conducción mucho más lenta, por lo cual son las encargadas en la transmisión del dolor crónico (1).

El mecanismo de acción de los anestésicos locales consiste en inhibir la generación de un potencial de acción a través de su clivaje sobre los canales de sodio dependientes de voltaje intracelulares, evitando de esta manera que se transmita la señal nerviosa y, por ende, el dolor (Figura 4)(3). Jurcakova y col en 2018 realizaron un estudio donde se evaluaron los diferentes subtipos de canales de sodio dependientes de voltaje en neuronas de la raíz dorsal de un ratón, donde evidenciaron que en aquellas neuronas donde existía una transmisión del dolor positiva los subtipos de Na_v1 s que mas se expresaban eran los canales $\text{Na}_v1.7$, 1.8 y 1.9 , en cambio, en aquellas neuronas donde no existía dolor, los subtipos más expresados eran canales $\text{Na}_v1.1$ y 1.6 (20).

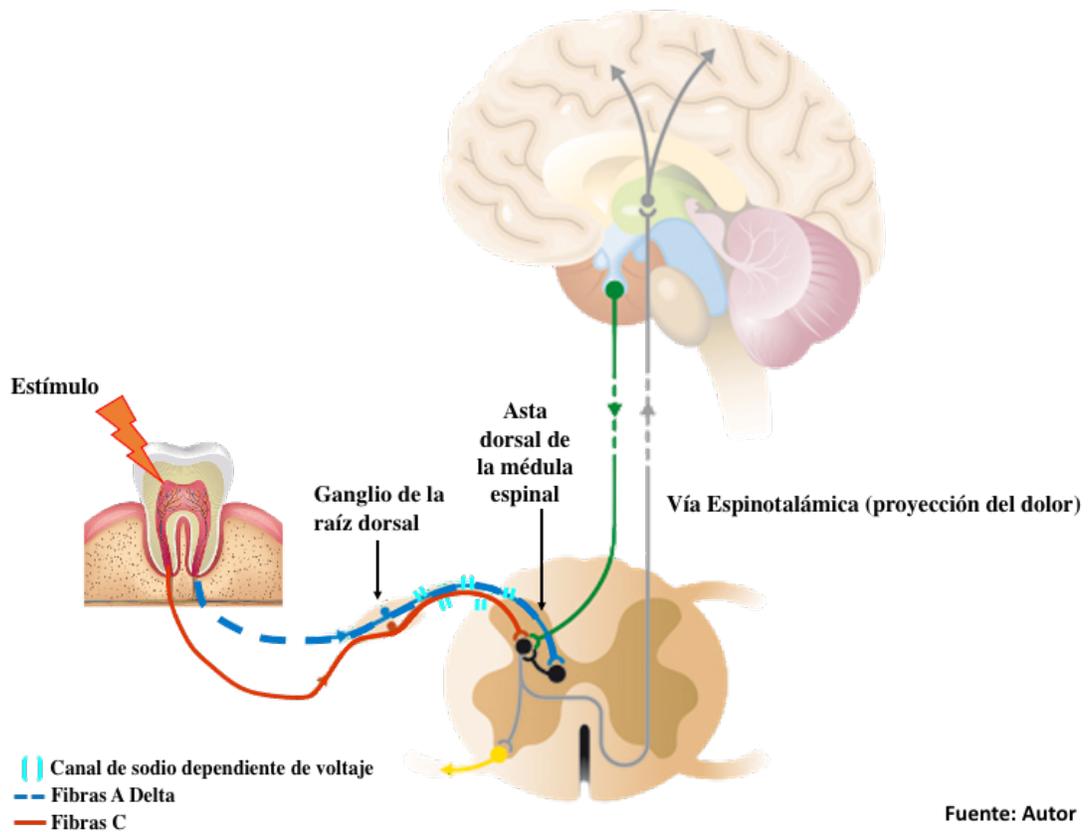


Figura 4. Fibras A Delta y C involucradas en las vías de transmisión de dolor, que inicia desde el lugar del estímulo en la pulpa dental hasta la médula espinal a través de la raíz dorsal de la médula espinal.

Adicionalmente, diversos estudios han evidenciado un aumento en la cantidad de canales $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ en respuesta a procesos inflamatorios, provocando una hiperalgesia inducida por una rápida transmisión del impulso nervioso doloroso y la iniciación del potencial de acción, por lo cual puede explicar el fracaso anestésico en odontología para controlar el dolor (19).

Asimismo, investigaciones han encontrado que durante un proceso infeccioso las quimiocinas y citocinas que se producen en el organismo en respuesta a la inflamación provocan una potenciación de la excitabilidad de los nociceptores, generando un menor umbral del potencial de acción por lo cual los anestésicos

locales no son suficientes para bloquear el impulso nervioso (15). Además, evidencia científica demuestra que durante la inflamación se genera una liberación de neuropéptidos que producen un aumento de las fibras sensitivas C, involucradas en el dolor, y por ende, aumentando las terminales nerviosas en las estructuras o tejidos afectados lo cual genera que el estímulo nervioso sea más rápidamente activado y transmitido (21).

Sin embargo, aunque existen investigaciones de casos clínicos o experimentales sobre la asociación de canales $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ y $Na_v1.9$ a pulpa dental como se puede observar en la figura 5, no existen estudios moleculares que demuestren el clivaje o tipo de interacción que tienen los anestésicos locales en canales de sodio dependientes de voltaje específicamente expresados en procesos inflamatorios. Al dilucidar este tipo de unión se podría saber cuál sería la mejor solución anestésica a utilizar en esta región y así posiblemente se podría disminuir el porcentaje de los fracasos anestésicos al aumentar la efectividad de la anestesia en los tejidos pulpares.

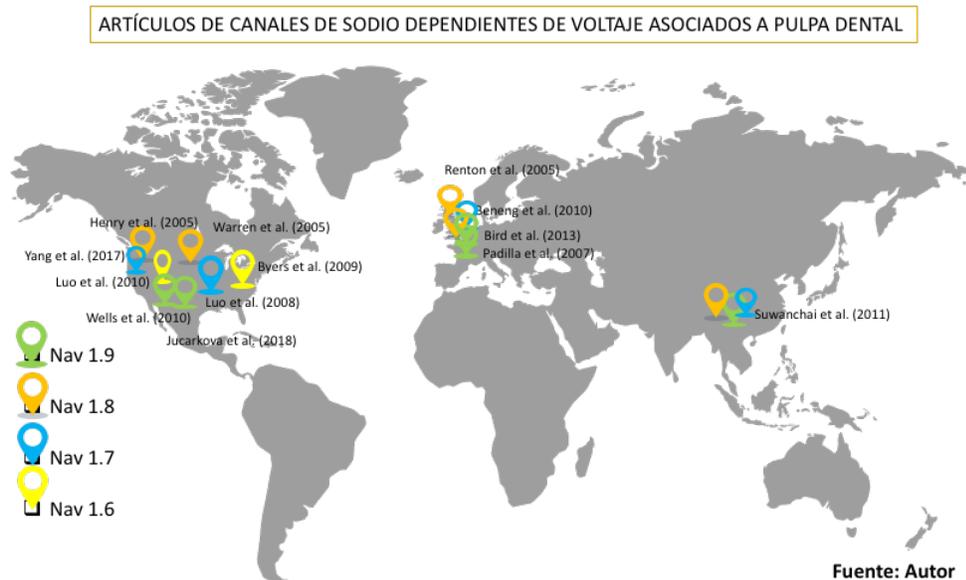


Figura 5. Artículos científicos de canales de sodio dependientes de voltaje $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$ asociados a pulpa dental.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Hoy en día, muchos estudios experimentales e incluso de descubrimiento de fármacos se están realizando de manera computacional, mediante acoplamiento molecular, también llamado docking molecular, basado en ligandos o basado en receptores. El acoplamiento molecular consiste en predecir a nivel estructural y energético de cada proteína, cómo está dada la unión del ligando a otras proteínas o receptores, y tipo de interacción intermolecular que se da en el anclaje del ligando al receptor, las cuales pueden ser enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, enlaces de Van der Waals o interacciones hidrófobas (22). Por ende, el cribado virtual mediante acoplamiento molecular logra mostrar que tanta afinidad tienen los distintos compuestos mediante las interacciones electrostáticas entre ellas, incluso logra comparar cuál es la proteína con mejor afinidad a la macromolécula y en que sitio se da esa unión (23).

Por lo tanto, el rol del acoplamiento molecular y el cribado virtual es muy importante para generar nuevos avances no solo al dilucidar el sitio de acción de una molécula en una nueva diana farmacológica sino que también permite el reposicionamiento de fármacos y la predicción de reacciones adversas a fármacos a través de sus interacciones con proteínas (24,25) .

De esta forma, el acoplamiento molecular ligando-proteína puede ser de dos tipos: acoplamiento molecular rígido, donde tanto el ligando y el receptor se encuentran rígidos y solo se considera una única conformación con 6 grados de libertad de traslación y rotación; por otro lado, el acoplamiento molecular flexible, donde el ligando se encuentra flexible y el receptor rígido, donde el ligando podrá adoptar múltiples conformaciones en el espacio del sitio activo (22).

El acoplamiento molecular es la combinación de dos funciones: algoritmos de búsqueda y función de puntuación. Con respecto a los algoritmos de búsqueda, existen distintos métodos para la búsqueda conformacional del sitio de anclaje

flexible del ligando a la proteína: búsqueda sistemática y aleatoria, Monte Carlo, algoritmos genéticos, dinámica molecular. Los algoritmos de búsqueda determinan todos los modos de unión posibles del ligando a la proteína en un espacio determinado (22,26).

En la función de puntuación, se tienen en cuenta los potenciales químicos que se producen entre las dos moléculas, los cuales determinan la preferencia hacia la conformación de unión y la energía libre de unión o también llamada afinidad de unión. Por lo cual, es un método matemático que determina la fuerza de interacción entre ambas moléculas, donde su ecuación tiene en cuenta la suma total de los enlaces inter e intramoleculares entre el ligando y receptor (27).

De esta manera, mientras que el algoritmo de búsqueda determina los modos conformacionales de ligando a la proteína, la función de puntuación determina la afinidad de unión y la preferencia hacia una conformación. Así, el acoplamiento molecular es capaz de predecir a nivel molecular el lugar de anclaje de una molécula en otra molécula en un espacio junto con sus potenciales químicos de interacción entre ellos.

CRIBADO VIRTUAL (VS)

El cribado virtual, también llamado screening virtual (VS), es un filtro computacional (*in silico*) que consiste en seleccionar virtualmente moléculas o compuestos que posean un potencial de actividad frente a una determinada diana farmacológica, de tal manera que se pueda generar nuevos fármacos o análogos de fármacos a partir de ellos (28). Existen dos métodos de selección de compuestos derivados del cribado virtual, dependiendo del tipo de estructura a analizar: cribado virtual basado en ligandos (Ligand-based virtual screening) o cribado virtual basado en receptores (Receptor-based virtual screening)

El cribado virtual basado en ligandos analiza las similitudes y propiedades fisicoquímicas de los ligandos activos para predecir la actividad que tendrá otro compuesto con características similares. En cambio, el cribado virtual basado en receptores es utilizado cuando está disponible la estructura tridimensional del receptor o proteína; mediante este método se evalúa las posibles interacciones entre los ligandos activos y las estructuras del receptor en el sitio de unión. Por tal razón, el cribado virtual basado en receptor representa un estudio más determinado puesto que analiza la interacción entre el ligando y su unión a la estructura, a diferencia del basado en ligandos donde solo se enfocan en la estructura de los ligandos buscando nuevos sitios de unión de moléculas o cambiando las moléculas unidas a ellas, de tal manera que se mejoren sus propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas (28).

La ventaja de realizar un cribado virtual es que se puede evaluar una diana farmacológica con múltiples o miles de compuestos al tiempo, característica muy importante cuando se está buscando sustancias promisorias para desarrollo de nuevos fármacos (27).

DINÁMICA MOLECULAR (DM)

La dinámica molecular es una herramienta computacional que predice a nivel estructural la interacción ligando-receptor no solo a nivel espacial sino también temporal. La DM se basa en los principios de la mecánica clásica, calculando la fuerzas entre los átomos que la conforman mediante en la segunda ley de termodinámica de Newton, donde $F=ma$ (29); ya que al saber la posición de los átomos en un sistema, se puede determinar la fuerza que ejerce cada átomo hacia los demás átomos, así como también establecer la posición atómica en un tiempo de acuerdo a las leyes de movimiento de newton (30).

La DM evalúa los cambios en la energía potencial de un sistema, generando una predicción del comportamiento temporal del sistema, con un análisis de trayectorias

y fluctuaciones, y evalúa que tan estable es un complejo ligando-receptor. Se trata por tanto de un método determinista, es decir, el estado de un punto de la trayectoria permite predecir el estado del siguiente (31). Por tanto, se hace necesario emplear métodos teóricos de modelado molecular y de simulación que complementen los resultados obtenidos mediante técnicas experimentales.

Las simulaciones de dinámica molecular se basan en unos campos de fuerza de mecánica molecular, para determinar el movimiento de cada átomo en un sistema a lo largo del tiempo basándose en las interacciones interatómicas que se produzcan entre ellos. Adicionalmente, a diferencia del acoplamiento molecular, en la DM no solo se pueden observar los cambios conformacionales de los compuestos y el clivaje del ligando a la proteína, sino también el plegamiento de las proteínas en el sistema, de acuerdo a sus posiciones atómicas en un tiempo determinado (30).

Los campos de fuerza en DM son esenciales para determinar el movimiento espacial de las proteínas. Éstos se basan en la suma de las interacciones enlazantes y no enlazantes del sistema; siendo las interacciones enlazantes los enlaces covalentes, ángulos de valencia y ángulos torsionales, mientras que las interacciones no enlazantes se refieren a las fuerzas de Van der Waals y las interacciones electrostáticas (31).

4. METODOLOGÍA

4.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LIGANDOS

Se realizó una búsqueda de anestésicos locales en la literatura científica, donde solo se eligieron como ligandos los 10 anestésicos locales tipo amida clínicamente disponibles; utilizando la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) (32), se insertó el nombre de la estructura y se identificó el código de registro. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de análogos de anestésicos locales tipo amida, con un filtro de búsqueda de identidad estructural del 95%, cuyos criterios de exclusión fueron aquellas moléculas con estructura salina y moléculas que tuvieran el mismo análogo estructural con otros ligandos. La minimización de las estructuras se realizó mediante algoritmo de herramientas Open Babel (33), aplicando campos de fuerza MMFF94; utilizando gradientes conjugados y el algoritmo de descenso más pronunciado que incluye 2500 pasos.

4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL RECEPTOR

Se seleccionó el complejo cristalográfico de la estructura de la proteína del canal Nav1.7 humano (código PDB: 5EK0, resolución de 3,53 Å) (34). Se analizó la proteína en *pdb4amber*, donde se evidenciaron espacios en la estructura. Por tanto, su refinamiento se realizó mediante un modelo por homología utilizando el servidor online Swiss Model del Bioinformatic Swiss Institute (<https://swissmodel.expasy.org/>) (35), mediante la secuencia FASTA del PDB: 5EK0, generando un nuevo modelo PDB.

Además, el complejo co-cristalizado de canal NavAb-flecainida (código PDB: 6MVX) (13) fue seleccionado como complejo de validación de ligando objetivo. El canal NavAb se preparó utilizando el paquete de software UCSF Chimera versión 1.15

(36), eliminando los iones fosfato y extrayendo flecainida de la estructura, generando un nuevo archivo PDB flecainida independiente.

El canal Na_v1.7 humano de la estructura de la proteína diana y el canal Na_vAb de la proteína de control se calcularon con cargas atómicas de Kollman y se unieron hidrógenos no polares mediante AutoDockTools 1.5.7 (37).

4.3. IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN

Inicialmente, se realizó una búsqueda predictiva de los bolsillos de unión de ligandos en el canal Na_v1.7 mediante servidores en línea de PrankWeb (<https://prankweb.cz/>)(38), CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?4jii>)(39) y PockDrug (<http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/index.py?page=home>) (40), utilizando el PDB del modelo por homología generado.

4.4. VALIDACIÓN DE PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

La validación de las estructuras del complejo proteína-ligando se realizó utilizando el complejo Na_vAb-flecainida co-cristalizado (código PDB: 6MVX). Se seleccionó el ligando de referencia flecainida para definir el centro y las dimensiones del cuadro de la cuadrícula. Se realizó una réplica de las coordenadas del ligando con un espaciado de cuadrícula establecido en 1.00 Å, en un espacio de cuadrícula central de x = -4.609 Å, y = -45.023 Å, z = -27.019 Å con valores de compensación de x = 12.0 Å, y = 14.0 Å y z = 10.0 Å., de tal forma que los resultados obtenidos en el re-acoplamiento molecular fueron lo más aproximados posibles a la pose, ubicación e interacciones del ligando obtenidas en la cristalografía previa, con un RMSD <2 Å.

4.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Los acoplamientos moleculares de Na_v1.7 y los ligandos se ejecutó por triplicado mediante AutoDock Vina basado en bash scripting (27). El espaciado de la cuadrícula se estableció en 1.00 Å, con un espacio de la cuadrícula central de x = -

50.225 Å, $y = -22.328$ Å, $z = 4.359$ Å con valores de desplazamiento de $x = 12.0$ Å, $y = 6.0$ Å y $z = 10.0$ Å. Cada acoplamiento molecular se simuló individualmente, con una exhaustividad de 8 y determinando 10 conformaciones en función del valor de efectividad, energía libre y RMSD. Los resultados de la mejor conformación se registraron en formato pdbqt y se visualizaron con el software PyMOL versión 2.3.4 (41), y luego se convirtieron en formato PDB. La pose con la energía de enlace más baja se seleccionó como el resultado final de acoplamiento, y se realizó un promedio de las energías libres de unión con desviación estándar. Las interacciones y los tipos de unión del complejo canal $Na_v1.7$ -ligando se analizaron mediante el visualizador BIOVIA Discovery Studio versión 4.5 (42) y el programa LigPlot+ versión 2.2 (43).

4.6. DINÁMICA MOLECULAR

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular sin restricciones de todos los átomos utilizando el software PMEMD de AMBER16 (44). Protocolos y análisis de minimización, equilibrado y producción de DM según Alviz-Amador y col (45) con algunas modificaciones. Esto se hizo para todos los sistemas de canal $Na_v1.7$ unidos con flecainida, lidocaína, dibucaína, 92367865 y 22578003. Se utilizó el campo de fuerza ff14SB y GAFF2 para canal $Na_v1.7$ y ligandos, respectivamente.

Las estructuras solvatadas con el modelo de agua TIP3P se minimizaron utilizando 1000 pasos de descenso más pronunciado seguidos de 1000 pasos de minimización del gradiente conjugado, aplicando una constante de fuerza de restricción de 25 Kcal/mol-Å² a toda la molécula de soluto. El calentamiento se realizó en 5000 pasos de MD de 100 a 300 K con un paso de tiempo de 2 fs, empleando un termostato de acoplamiento débil a presión constante y restringiendo los enlaces que involucran hidrógeno usando SHAKE con la tolerancia establecida en 0.00001. Se utilizó un límite no unido de 8 Å. La electrostática de largo alcance se manejó utilizando una malla de partículas Ewald (PME) con los parámetros de PME predeterminados para AMBER con actualización automática de la lista de

pares. Después del calentamiento, las restricciones aplicadas a los péptidos y proteínas se redujeron lentamente de 5 a 0,5 Kcal/mol-Å² en 5 intervalos, minimizando cada paso primero utilizando 1000 pasos de descenso más pronunciado seguido de 500 pasos de minimización de gradiente conjugado y paso de tiempo de 2 fs, seguido de 50 ps de MD a 300 K, presión y temperatura constantes, ambos con constantes de acoplamiento de Berendsen de 0,2 ps.

El tiempo total de producción fue de 100 ns para cada sistema. En la Tabla 1 se describe un resumen de todas las simulaciones.

Tabla 1. Resumen de simulaciones de DM desarrolladas en el estudio.

Estructura Inicial	Fuente	Tiempo de Simulación
Proteína		
Canal Na_v1.7 (humano)	PDB: 5EK0	100ns
Canal Na_v1.7-flecainida	PDB: 5EK0	100ns
Canal Na_v1.7-lidocaína	PDB: 5EK0	100ns
Canal Na_v1.7- dibucaína	PDB: 5EK0	100ns
Canal Na_v1.7-92367865	PDB: 5EK0	100ns
Canal Na_v1.7-22578003	PDB: 5EK0	100ns

Luego, se realizaron análisis de RMSD utilizando las estructuras promedio como referencias para estudiar la estabilidad del receptor nativo y acoplados. De manera similar, se realizó un análisis de movilidad utilizando cálculos de RMSF; al igual que el análisis de la superficie accesible al solvente (SASA) del canal Na_v1.7 y el grado de compactación de los complejos por medio de radio de giro (Rg). Todos estos análisis fueron realizados usando el programa cpptraj que se encuentra en el paquete AMBER16. (46)

4.7. PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS Y TOXICOLÓGICAS Y SIMILITUD DE DROGAS

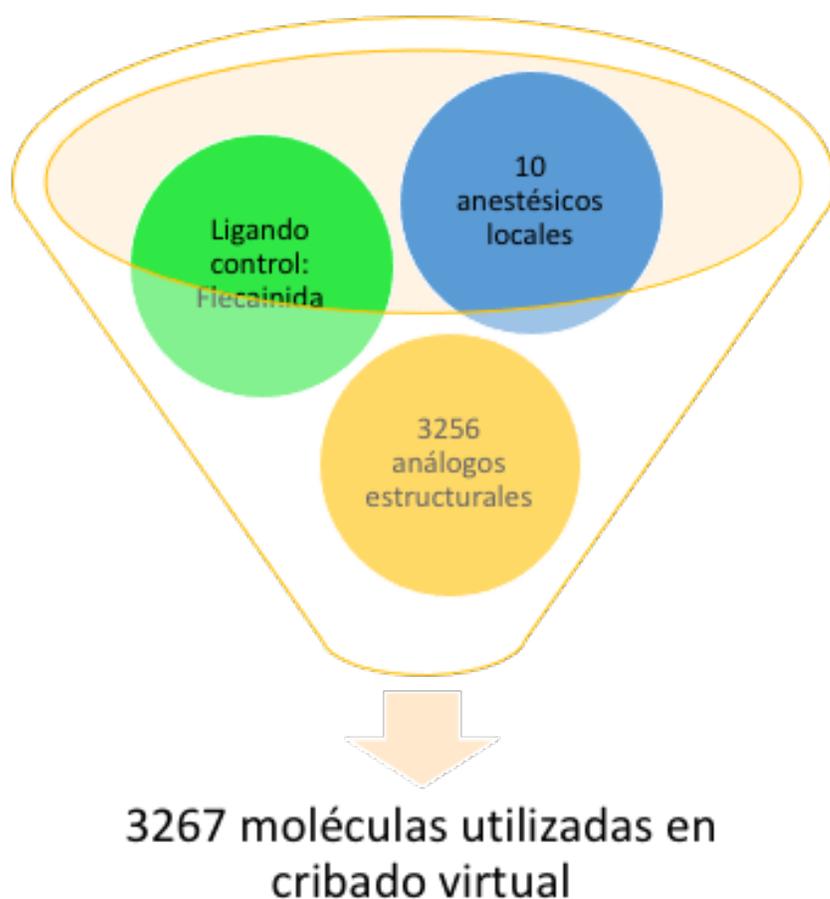
La predicción farmacocinética y de similitud para los ligandos de mayor afinidad 92367865, 22578003 y dibucaína se realizaron utilizando la herramienta en línea SwissADME del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://www.sib.swiss>) (47) y ADMETSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/about/>) (48), un servidor web de la Universidad de Ciencia y Tecnología de China Oriental. Para ello se utilizó la representación molecular canónica SMILES y el generador de archivos de estructura que se encuentran en la herramienta online SwissADME. El análisis se realizó para determinar algunos parámetros estructurales y farmacocinéticos. Estos parámetros fueron: donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, peso molecular, XlogP3, familia del citocromo P450 inhibidor (CYP450), absorción gastrointestinal, permeabilidad de la barrera hematoencefálica y unión a glicoproteínas P, unión a proteínas plasmáticas, se verificó Caco2. Por otro lado, los parámetros de predicción de similitud farmacológica se indicaron como regla de Lipinski y biodisponibilidad.

Además, se evaluó la toxicidad *in silico* de las moléculas utilizando el servidor GUSAR-Online (49); insertando la representación molecular canónica SMILE, seguido del desarrollo de las predicciones de los valores de dosis letal 50 (DL₅₀) para la administración oral de ratas, y finalmente, mostrando la clasificación de toxicidad aguda en roedores basada en el Proyecto OCDE.

5. RESULTADOS

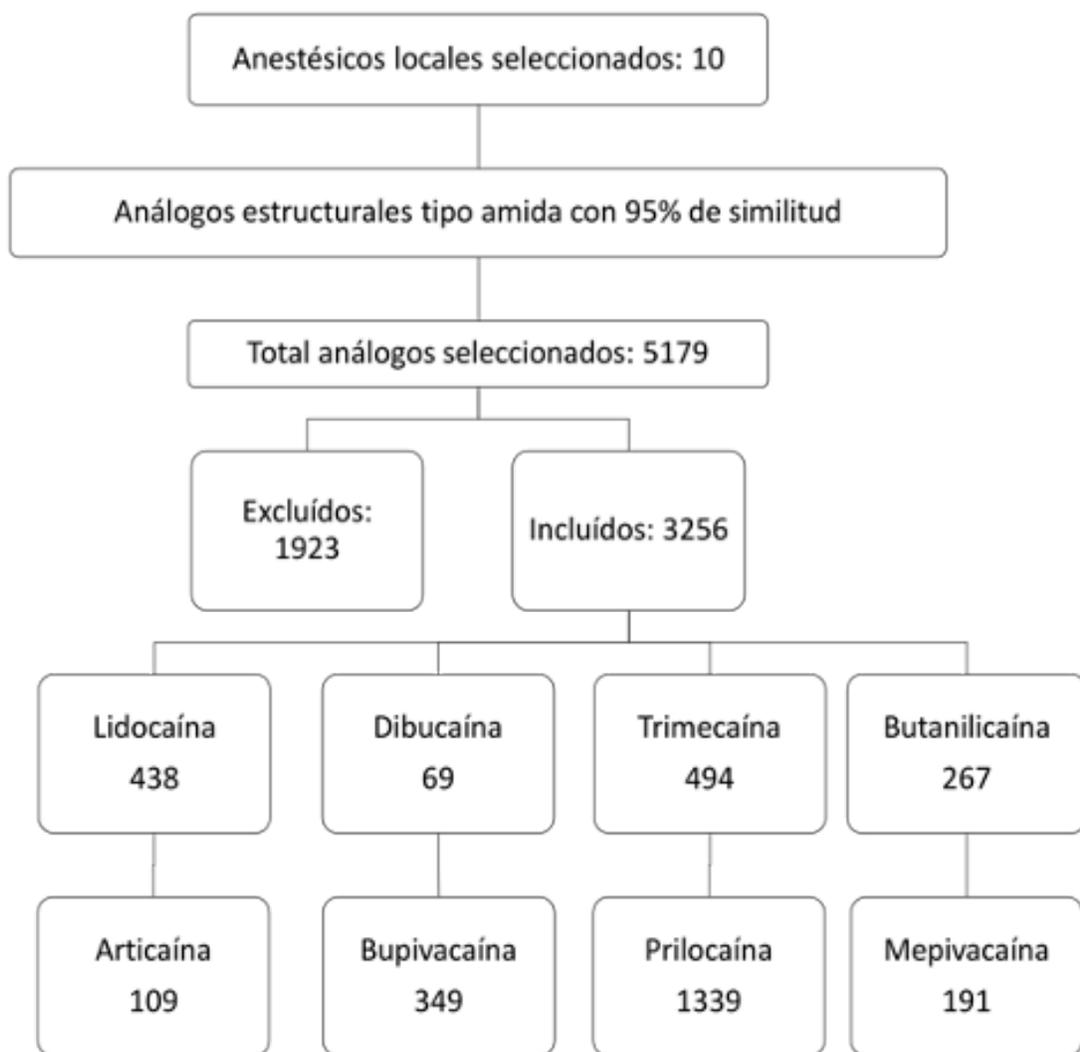
5.1. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LIGANDOS

El cribado virtual (Figura 6) se realizó con 3267 ligandos: 1 ligando de control (flecainida), 10 anestésicos locales seleccionados y 3256 anestésicos locales análogos (Figura 7). De la búsqueda de 10 anestésicos locales, solo la lidocaína tiene una asociación con el canal de sodio dependiente de voltaje tipo 9 (canal Nav1.7), descrito en la base de datos PubChem (Figura 8).



Fuente: Autor

Figura 6. 3267 ligandos seleccionados para cribado virtual: flecainida, 10 anestésicos locales y 3256 análogos estructurales.



Fuente: Autor

Figura 7. Criterios de selección para análogos estructurales de anestésicos locales. Los análogos estructurales de Ropivacaína y Levobupicaína se encuentran incluidos dentro de Bupivacaína.

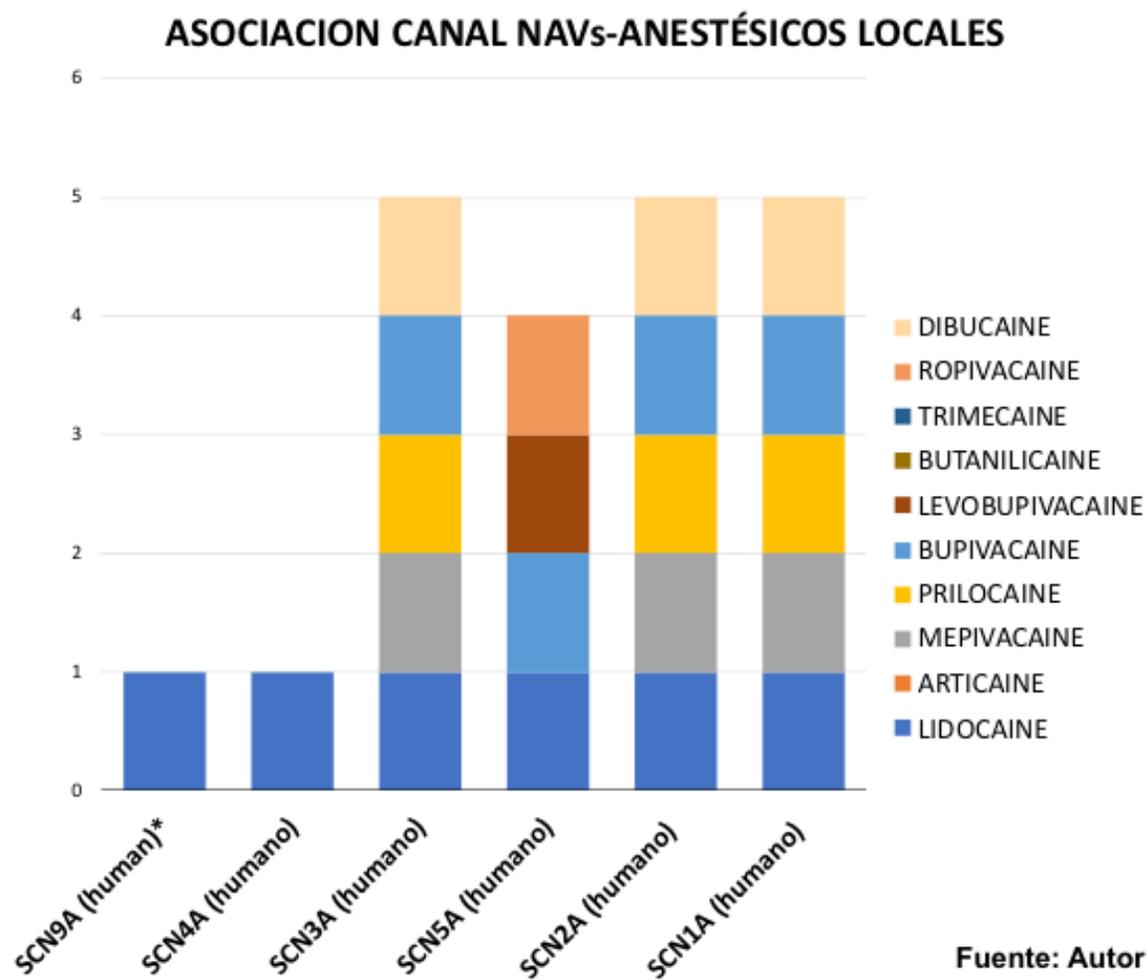
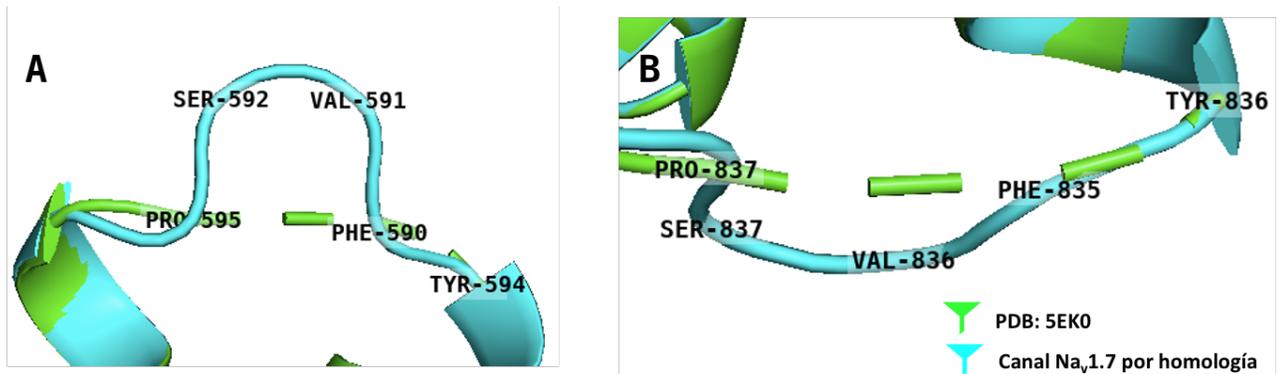


Figura 8. Asociación de anestésicos locales tipo amida al receptor del canal de sodio a través de la base de datos PubChem.*SCN9A: Canal Na_v1.7. SCN4A: Canal Na_v1.4 SCN3A: Canal Na_v1.3. SCN5A: Canal Na_v1.5. SCN2A: Canal Na_v1.2. SCN1A: Canal Na_v1.1.

5.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL RECEPTOR

Durante la preparación del canal Na_v1.7 humano (código PDB 5EK0) usando *pdb4amber*, la estructura cristalográfica de los resultados del canal Na_v1.7 mostró dos espacios de 6.69 Å entre el residuo de aminoácido Tyr594 y Pro595 y 7.860 Å entre Tyr836 y Pro837 Por tanto, se realizó un modelo por homología utilizando el

servidor online Swiss Model, con una identidad de secuencia con código PDB 5EK0 y una estimación de calidad global (GMQE) de 0,61 y QMEAN de -3,64. Luego, se realizó un alineamiento del PDB 5EK0 y el nuevo modelo por homología usando UCSF Chimera, evidenciando la corrección de los espacios con la adición de los residuos de aminoácidos faltantes. El espacio entre Tyr594 y Pro595 se corrigió con Phe590, Val591, Ser592 y el espacio en la cadena D entre Tyr836 y Pro837 se completó con Phe835, Val836 y Ser837. (Figura 9)



Fuente: Autor

Figura 9. Superposición del canal Na_v1.7 humano (PDB 5EK0) y nuevo modelo por homología. (A). La corrección del espacio entre Tyr594 y Pro595 se corrigió con Phe590, Val591, Ser592 en la cadena C. (B). Corrección del espacio en la cadena D entre Tyr836 y Pro837 con Phe835, Val836 y Ser837.

El complejo de control seleccionado para el estudio (código PDB: 6MVX) se alineó con el canal Na_v1.7 humano (código PDB 5EK0) utilizando PROTEIN BLAST Align Sequences (50), cuyos resultados mostraron 82% de identidad (244/299), espacios de 5% (17/299) y una puntuación de alineación de 471 bits. Los espacios mostrados en el servidor BLAST coinciden con los resultados mostrados en *pdb4amber* para PDB 5EK0. (Figura 10)

5EK0_1|Chains A,B,C,D|Chimera of bacterial Ion transport protein and human Sodium channel protein type 9 subunit alpha|Arcobacter butzleri (367737)

Sequence ID: Query_9159 Length: 296 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 296 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
471 bits(1212)	2e-174	Compositional matrix adjust	245/299(82%)	259/299(86%)	17/299(5%)
Query 1	MDYKDDDDKGS L V P R G S H M Y L R I T N I V E S S F F T K F I I Y L I V L N G I T M G L E T S K T F M Q S F G				60
Sbjct 1	MDYKDDDDKGS L V P R G S H M Y L R I T N I V E S S F F T K F I I Y L I V L N + T M + E OS				57
Query 61	VYTTLF--NQIVITIFTIEIILRIYVHRISFFKDPWSLDFDFVVAISLVP-----				108
Sbjct 58	+ L+ N + I +FTIEIILRIYVHRISFFKDPWSLDF VV IS+V MTEVLYWINVVFIIILFTIEIILRIYVHRISFFKDPWSLDFV V V V I I S I V G M F L A D L I E T Y				117
Query 109	--TSSGFEILRVLRVLRFLVAVPQMRKIVSALISVIPGMLSVIALMTLFFYIFAIMA				166
Sbjct 118	+ + F ++R+ R+ R+ RLVTAVPQMRKIVSALISVIPGMLSVIALMTLFFYIFAIMA FVSPTLFRVIRLARI GRILRLVAVPQMRKIVSALISVIPGMLSVIALMTLFFYIFAIMA				177
Query 167	TQLFGERFPEWFGTLGESFYTLFQVMTLESWSMGIVRPLMEVYPYAWVFFIPFIFVVTFF				226
Sbjct 178	TQLFGERFPEWFGTLGESFYTLFQVMTLESWSMGIVRPLMEVYPYAWVFFIPFIFVVTFF				237
Query 227	MINLVVAICVDAMAILNQKEEQHIIDEVQSHEDNINNEI IKLREEIVELKELIKTSLKN				285
Sbjct 238	MINLVVAIIVDAMAILNQKEEQHIIDEVQSHEDNINNEI IKLREEIVELKELIKTSLKN				296

Fuente: PROTEIN BLAST Align

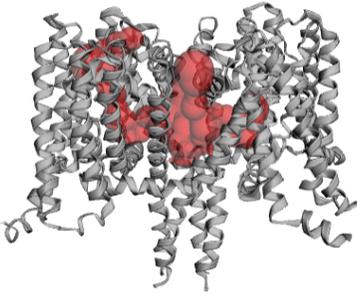
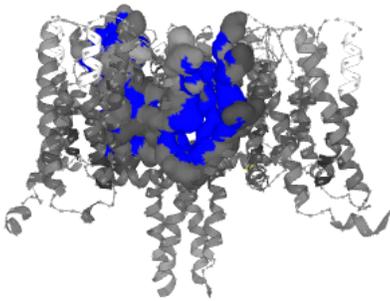
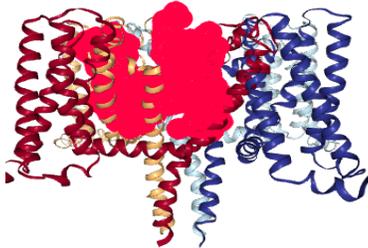
Figura 10. Alineación de las secuencias del canal Na_v1.7 humano (PDB 5EK0) y el canal Na_vAb (PDB 6MVX) utilizando secuencias de PROTEIN BLAST Align. Consulta: canal Na_vAb. Asunto: canal Na_v1.7 humano.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN

En la predicción de los sitios de unión de ligandos al canal Na_v1.7 evidenció que los tres servidores en línea arrojan resultados similares, donde los mejores bolsillos de unión al canal de sodio dependiente de voltaje se encuentran ubicados cerca al dominio del poro central. Asimismo, estos bolsillos contienen los residuos Met185 (A), Thr186 (B), Leu187 (A), Met220 (A), Met430 (B), Thr431 (B), Leu432 (B), Ile458 (B), Thr462 (B), Thr676 (C), Leu677 (C), Thr921 (D), Leu922 (D) implicados en la interacción con los anestésicos locales en las cadenas A, B, C y D del canal Na_v1.7. (Tabla 2).

Tabla 2. Predicción de bolsillos de unión en canal Na_v1.7 por servidores en línea de PrankWeb, CASTp y PockDrug. Residuos de interacción implicados en el sitio de unión de los anestésicos locales al canal Na_v1.7. * **Los residuos de aminoácidos**

resaltados en negrilla corresponden a los residuos vinculados en el sitio activo de los anestésicos locales.

PREDICTOR EN LÍNEA	UBICACIÓN	RESIDUOS DE INTERACCIÓN EN SITIOS DE UNIÓN*			
CASTp		Pocket 1 Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met220 (A), Met430 (B), Thr431 (B), Leu432 (B) , Ile458 (B), Thr462 (B), Thr676 (C), Leu677 (C), Thr921 (D), Leu922 (D).			
PrankWeb		Pocket 1 Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met220 (A), Met430 (B), Thr431 (B), Leu432 (B) , Ile458 (B), Thr462 (B), Leu677 (C).			
PockDrug		Pocket 1 Leu187 (A) , Thr921 (D), Leu922 (D).			Pocket 2 Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met220 (A), Met430 (B), Leu432 (B) , Ile458 (B),
		Pocket 2 Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met220 (A), Met430 (B), Leu432 (B) , Ile458 (B),			

5.4. VALIDACIÓN DE PROTOCOLOS DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Con el fin de validar el acoplamiento molecular para el cribado virtual, el ligando co-cristalizado flecainida del complejo Na_vAb (código PDB: 6MVX) se volvió a acoplar

contra este receptor del canal de sodio, calculando la mejor postura de unión y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD). Los resultados del reacoplamiento se alinearon con el complejo co-cristalizado (6MVX) obtenido de Protein Data Bank, cuyos resultados mostraron un RMSD de 1.157 Å con la mejor pose de unión (-5.7 Kcal/mol) (Fig. 11A). Además, el complejo co-cristalizado del canal de Na_vAb-flecainida se alineó con el canal Na_v1.7, con un RMSD de 1.560 Å., donde una pose con un resultado de RMSD de menos de 2.0 Å se considera exitosa (51). (Fig.11B)

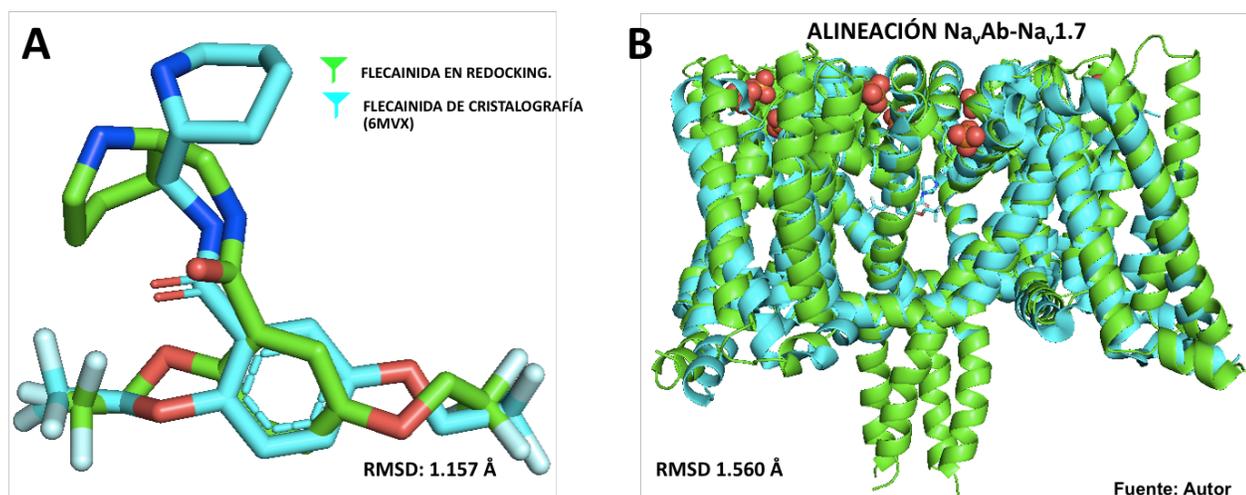


Figura 11. A. Alineación de flecainida acoplada nuevamente en el canal Na_vAb y la flecainida co-cristalizada en el canal Na_vAb (código PDB: 6MVX). RMSD: 1.157 Å. **B.** Alineación de canal Na_vAb (código PDB: 6MVX) y canal Na_v1.7, con un RMSD de 1.560 Å.

Posteriormente, se extrajo flecainida co-cristalizada del canal Na_vAb (código PDB: 6MVX) y se unió al canal Na_v1.7, para determinar las interacciones con este receptor. Las interacciones de unión entre la flecainida co-cristalizada en el canal Na_v1.7 y el complejo Na_v1.7-flecainida en los resultados de acoplamiento de cribado virtual mostraron que los residuos de aminoácidos Thr186 (A), Leu187 (A), Thr431 (B), Thr676 (C), Leu677 (C) comparten las mismas interacciones hidrófobas y de

enlace de hidrógeno con la pose de flecainida co-cristalizada en el complejo de canales Na_vAb (6MVX). (Figura 12)

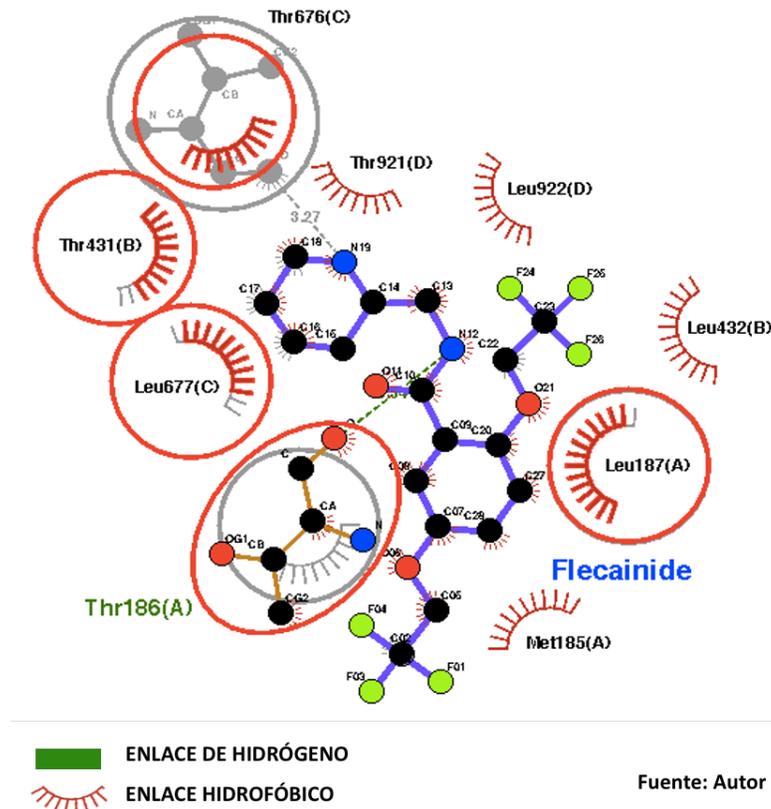


Figura 12. Alineación de $\text{Na}_v1.7$ -flecainida co-cristalizada con complejo de acoplamiento $\text{Na}_v1.7$ -flecainida. Los residuos encerrados en un círculo rojo (Thr186 (A), Leu187 (A), Thr431 (B), Thr676 (C), Leu677 (C)) corresponden a los mismos residuos de interacción de ambos complejos.

5.5. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL CRIBADO VIRTUAL

Los resultados del acoplamiento revelaron que 92367865 mostró la mejor energía de unión por afinidad con valores de -6.4 ± 0.0 Kcal/mol, seguido por 22578003 con valores de -6.3 ± 0.15 Kcal/mol. Igualmente, se comparó con flecainida, dibucaína y lidocaína, cuyos resultados de acoplamiento molecular mostraron que el ligando de control tenía un puntaje de acoplamiento de -5.6 ± 0.15 Kcal/mol, mientras que la

dibucaína tiene una energía de unión mayor de -5.1 ± 0.12 Kcal/mol que la lidocaína con -4.2 ± 0.12 Kcal/mol. (Tabla 3)

Tabla 3. Interacción entre los residuos de aminoácidos en el canal Nav1.7 y ligandos (flecainida, lidocaína, dibucaína, 22578003 y 92367865).

LIGANDO	ENERGÍA DE AFINIDAD (Kcal/mol)	ENLACES DE HIDRÓGENO	ENLACES HIDROFÓBICOS
92367865	-6.4 ± 0.0	Thr462 (B)	Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met220 (A), Thr431 (B), Leu432 (B) , Ile458 (B)
22578003	-6.3 ± 0.15	Thr462 (B)	Met185 (A) , Thr186 (A), Leu187 (A) , Met430 (B), Thr431 (B), Leu432 (B) , Thr676 (C), Leu677 (C)
Flecainida	-5.4 ± 0.15	Thr186 (A)	Met185 (A) , Leu187 (A) , Thr431 (B), Leu432 (B) , Thr676 (C), Leu677 (C), Thr921 (D), Leu922(D)
Dibucaína	-5.2 ± 0.12	Thr186 (A)	Met185 (A) , Leu187 (A) , Leu432 (B) , Thr462 (B), Leu677 (C), Thr921 (D), Leu922(D)
Lidocaína	-4.1 ± 0.12	-	Met185 (A) , Leu187 (A) , Thr217 (A), Thr431 (B), Leu432 (B) , Thr676 (C), Thr921 (D), Leu922(D)

La visualización de las interacciones entre las mejores poses de los ligandos seleccionados reveló enlaces hidrófobos comunes con los residuos Met185 (A), Leu187 (A), Leu432 (B) para todos los ligandos. 22578003 y 92367865 tenían el

mismo y único enlace de hidrógeno entre el residuo Thr462 en la cadena B (Figura 13), mientras que la flecaína y la dibucaína compartían el mismo enlace de hidrógeno con el residuo Thr186 en la cadena A (Figura 14). Sin embargo, excepcionalmente la lidocaína no tiene interacción de enlace de hidrógeno y en cambio tiene un enlace hidrofóbico con Thr462 (B) (Figura 15). Además, se encontraron muchas otras interacciones de enlaces hidrofobos entre Thr186 (A), Met220 (A), Met430 (B), Thr431 (B), Ile458 (B), Thr676 (C), Leu677 (C), Thr921 (D), Leu922 (D).

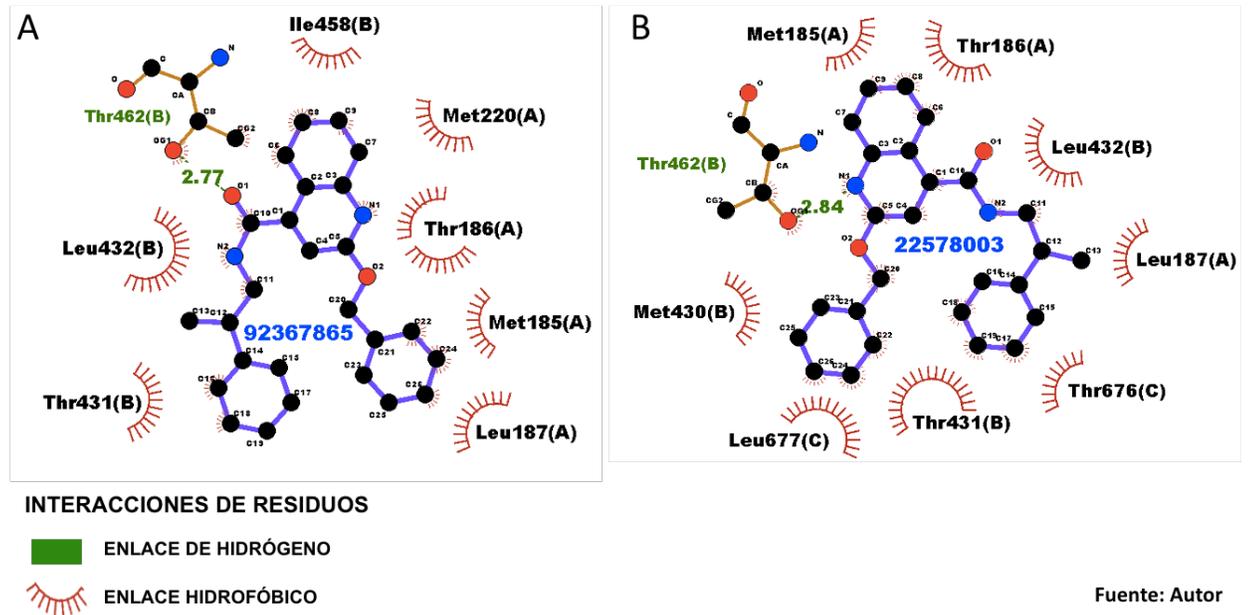
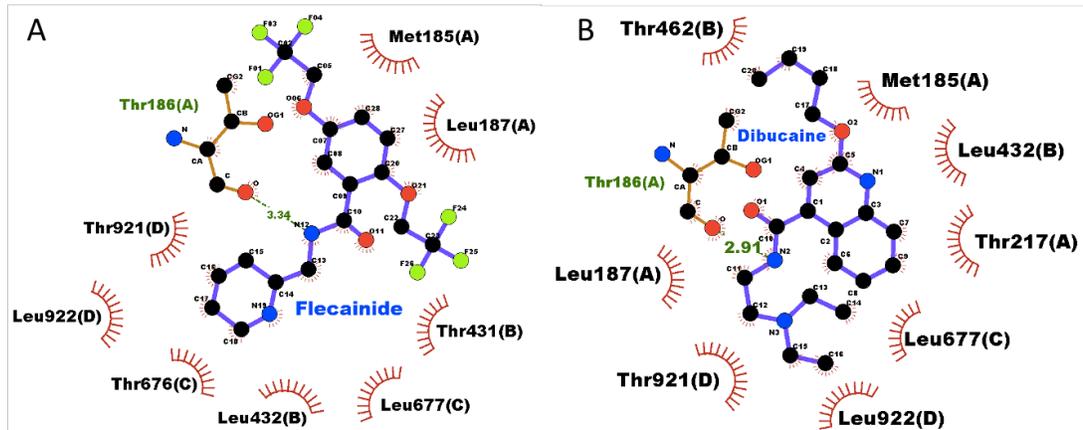


Figura 13. Interacciones de residuos entre anestésicos locales y análogos frente a la proteína Nav.1.7. (A). 92367865. (B). 22578003.



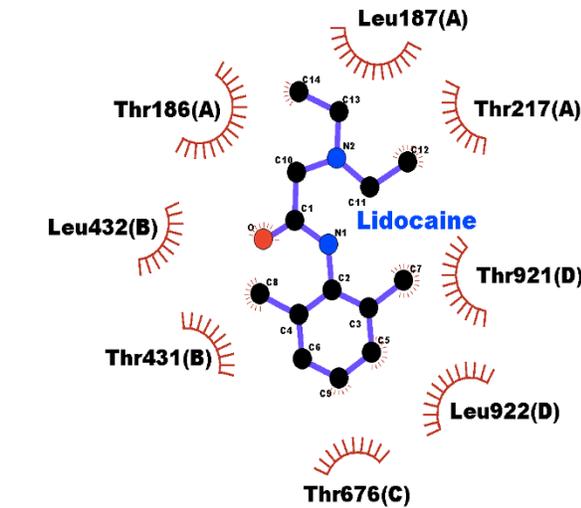
INTERACCIONES DE RESIDUOS

■ ENLACE DE HIDRÓGENO

☏ ENLACE HIDROFÓBICO

Fuente: Autor

Figura 14. Interacciones de residuos entre anestésicos locales y análogos frente a la proteína Na_v1.7. (A). Flecaína. (B). Dibucaína.



INTERACCIONES DE RESIDUOS

■ ENLACE DE HIDRÓGENO

☏ ENLACE HIDROFÓBICO

Fuente: Autor

Figura 15. Interacciones de residuos en complejo lidocaína frente a la proteína Na_v1.7.

5.6. DINÁMICA MOLECULAR

Debido a que ambos ligandos con mejores valores de afinidad en los resultados de acoplamiento molecular son análogos de la dibucaína, la dibucaína también se seleccionó para la dinámica molecular, al igual que lidocaína (fármaco referente clínicamente en odontología como anestésico local) y flecainida (como ligando de control). En la figura 16A se presentan los valores de RMSD del canal $\text{Na}_v1.7$ humano nativo como referencia, el complejo $\text{Na}_v1.7$ -dibucaína, el complejo $\text{Na}_v1.7$ -lidocaína, el complejo $\text{Na}_v1.7$ -92367865, el complejo $\text{Na}_v1.7$ -22578003 y el complejo de control $\text{Na}_v1.7$ -flecainida.

El análisis de trayectoria de RMSD, evidenció que 22578003, dibucaína y lidocaína son más estables con valores de RMSD entre 2 y 3 Å, mientras que flecainida fue el complejo que presentó los valores de RMSD más altos entre 20-30 ns con un rango de RMSD entre 5 y 7 Å ; lo que significa que la flecainida es el ligando que induce más cambios conformacionales en el canal $\text{Na}_v1.7$, mientras que 92367865 fue el ligando que realizó los menores cambios conformacionales en el canal de sodio $\text{Na}_v1.7$ dependiente por voltaje.

Por otro lado, los valores de RMSF muestran el movimiento de cada residuo durante la simulación. Los residuos con valores de RMSF más altas representan una mayor flexibilidad individual durante el movimiento de las proteínas. Los resultados de RMSF muestran que, en general, los complejos de dibucaína, flecainida y 22578003 tienen la mayor flexibilidad en los residuos entre la posición 230-260 de la secuencia (DAMAILNQKEEQHIIDMYLRITNIVESSFFT) con valores de RMSF de 14 y 13 Å y un ΔRMSF 1.57 Å respectivamente. El complejo de lidocaína evidenció una alta flexibilidad que oscila entre los residuos de la posición 480-510 de la secuencia (LNQKEEQHIIDMYLRITNIVESSFFTKFIY), en comparación con los otros complejos. Sin embargo, el complejo 92367865 tenía el perfil de movilidad más bajo de todos los complejos estudiados en la simulación, con valores de RMSF inferiores a 10 Å, con un ΔRMSF total -5.6 Å. Además, las puntuaciones de RMSF más bajas

en general son de los complejos 92367865 y 22578003, entre los residuos 185-189 de secuencia (MTLES) con 0,8 Å, con un Δ RMSF -5.6 Å, los residuos 462-465 de secuencia (TFVM) con 1,1 Å y un Δ RMSF -5.7 Å

677-679 de secuencia (LES) con 0,75 Å y 920-923 de secuencia (MTLE) con 0,85 Å. (Figura 16B)

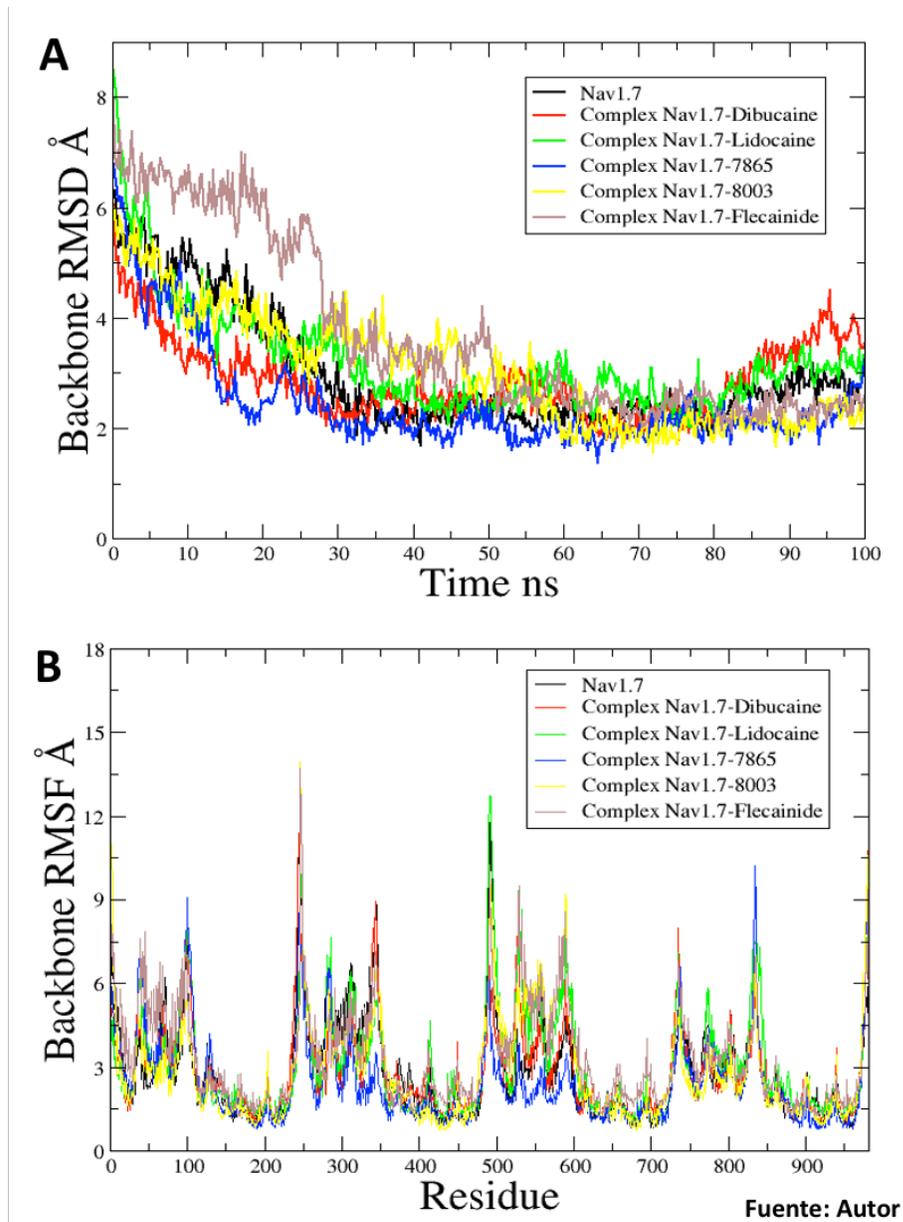


Figura 16. Dinámica molecular del canal Na_v1.7 nativo, flecainida, lidocaína, dibucaína, 92367865 y 22578003. (A) RMSD. (B) RMSF.

Los valores de SASA corresponden al área superficial accesible al solvente para todo el complejo en el estudio. Todos los complejos tienen valores de SASA que oscilan entre 60000 y 56000 Å², con una tendencia a disminuir con el tiempo, lo que indica que todos los complejos tienen el mismo comportamiento y estabilidad en el canal Na_v1.7. Sin embargo, los complejos de análogos tuvieron los valores de SASA más altos por encima de 62000 Å² y son los mismos con las puntuaciones más bajas por debajo de 55000 Å², mientras que los complejos de dibucaína y lidocaína tienden a aumentar los valores de SASA con el tiempo con picos más altos entre 61600 y 61900 Å². El complejo de flecainida es el que tiene los picos de fluctuación más bajos, lo que indica que este ligando es de naturaleza encogida. (Figura 17A)

En el radio de giro (Rg), los resultados muestran que la dibucaína y el complejos 22578003 tienen los valores más altos en comparación con los demás, lo que indica que poseen un menor grado de compactación y rigidez, mientras que 92367865 no afecta el canal Na_v1.7 de la proteína porque tiene los valores de Rg más bajos, por lo tanto, es más compacto, lo que sugiere que estos dos formaron conformaciones más rígidas durante las simulaciones. (Figura 17B)

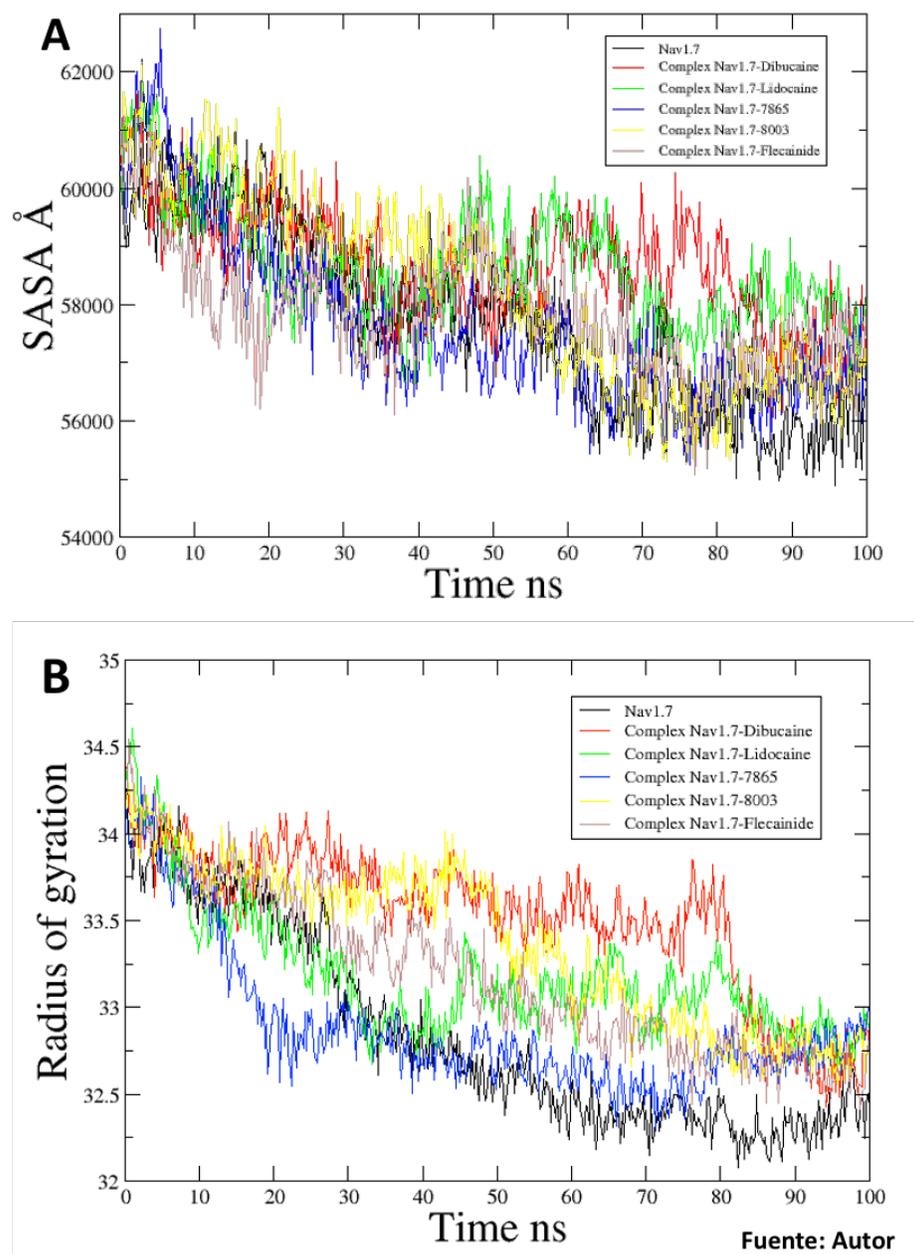


Figura 17. Dinámica molecular del canal $\text{Na}_v1.7$ nativo, flecainida, lidocaína, dibucaína, 92367865 y 22578003. **(A)** SASA. **(B)** Rg análisis de todas las trayectorias.

5.7. PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS Y TOXICOLÓGICAS Y SIMILITUD DE DROGAS

La Tabla 4 presenta las propiedades farmacocinéticas predichas usando el servidor en línea SwissADME y ADMETSAR y la toxicidad oral aguda en ratas obtenida con el predictor GUSAR. Ninguna molécula estudiada mostró violaciones de Lipinski, todas presentaron alta absorción gastrointestinal, permeabilidad de la barrera hematoencefálica, una puntuación prevista de biodisponibilidad de 0,55, una variabilidad de predicción inhibitoria sobre CYP y toxicidad aguda clasificada como clase III según la OCDE.

Tabla 4. Propiedades ADME y toxicidad oral aguda de dibucaína, 22578003 y 92367865 realizadas por servidores de predicción en línea SwissADME, ADMETSAR y GUSAR.

PROPIEDADES	Dibucaína	22578003	92367865
Peso Molecular^a	343.46	396.48	396.48
#H-enlaces aceptadores^b	4	3	3
#H-enlaces donantes^c	1	1	1
XLOGP3^d	4.4	6.16	6.16
Refractividad molar^e	102.58	119.82	119.82
#Violaciones Lipinski^f	0	0	0
#Enlaces rotativos^g	11	8	8
TPSA^h	54.46	51.22	51.22
Absorción GI	High	High	High
Permeabilidad BHE	Yes	Yes	Yes
Puntuación biodisponibilidad	0.55	0.55	0.55

Substrato Pgp	No	Yes	Yes
CYP1A2 inhibidor	Yes	No	No
CYP2D6 inhibidor	Yes	Yes	Yes
CYP3A4 inhibidor	Yes	Yes	Yes
log Kp (cm/s)	-5.27	-4.34	-4.34
Caco-2	+	+	+
Toxicidad Oral Aguda (c)	III	III	III
Ratones Oral LD50 (mg/kg)	676,800 AD	in 1505,000 AD	in 1505,000 in AD

^a Peso molecular inferior a 500 Dalton.

^b Aceptador de enlaces de hidrógeno menor o igual a 10.

^c Menos o iguales 5 donantes de enlaces de hidrógeno.

^d Alta lipofilicidad (expresada como LogP) inferior a 5.

^e La refractividad molar debe estar entre 40 y 130.

^f Regla de Lipinski de cinco violaciones menores o iguales a 1.

^g Menor o igual a 10 enlaces rotativos.

^h Área de superficie polar topológica (TPSA) menor o igual a 140.2.

6. DISCUSIÓN

Los avances en la ciencia han permitido el uso de nuevas tecnologías y procesos que hoy en día están aprobados, los cuales proporcionan grandes descubrimientos con información detallada como estudios *in silico*, a través de inteligencia artificial. La inteligencia artificial puede evaluar el objetivo, la eficacia y la predicción ADMET de un fármaco, e incluso el diseño de un fármaco *de novo* (52). Por lo tanto, la inteligencia artificial ha transformado y cambiado las vías de desarrollo de fármacos, con múltiples tipos de técnicas que pueden utilizarse para el descubrimiento y la identificación de fármacos en cualquier campo académico. En odontología, la técnica *in silico* de este estudio a través del cribado virtual basado en receptores proporciona una herramienta útil e importante para una mejor comprensión de la interacción entre los anestésicos locales y el canal de sodio dependiente de voltaje $Na_v1.7$ presente en la pulpa dental inflamada.

Se sabe que los canales de sodio $Na_v1.7$ dependientes de voltaje están ampliamente involucrados en la pulpa dental dolorosa, el cual es un factor clave para resolver un proceso inflamatorio urgente en la cavidad oral. Como demostraron varios estudios, el canal $Na_v1.7$ se activa e inactiva rápidamente con la sensación de dolor relacionada con la generación de potencial de acción en neuronas periféricas (20). Los anestésicos locales juegan un papel importante en el bloqueo de las vías del dolor mediante la inhibición del potencial de acción. Los estudios muestran que los anestésicos locales no tienen un sitio de unión específico en los canales de sodio activados por voltaje, sino que están localizados en el poro de la cavidad central. Sin embargo, no hay estudios que evalúen la asociación molecular y estructural entre el canal $Na_v1.7$ y los anestésicos locales, a excepción de este estudio que enfatizó específicamente en el sitio de unión, las interacciones y el comportamiento de los anestésicos locales a través de un amplio cribado virtual.

De acuerdo con el complejo cristalizado de Gamal y col., los resultados de reacomplamiento de flecainida con el canal Na_vAb coinciden con la posición de unión

y el sitio de los residuos Met174, Thr175, Leu176 (13). Aunque la validación inicial se realizó en un canal de sodio activado por voltaje bacteriano y no en un canal Na_v humano, la superposición del canal $\text{Na}_v1.7$ humano y el canal Na_vAb ha demostrado que comparten una estructura común, dominios y secuencia, con resultados mostrados con una identidad del 82% durante el alineamiento, lo cual fue relevante en la identificación de residuos ligados al bolsillo de unión del canal $\text{Na}_v1.7$, mostrando cuatro dominios diferentes con una cavidad de poro central. Estos resultados están respaldados por Ahuja y col, quienes diseñaron con éxito el canal $\text{Na}_v1.7$ humano a partir del canal Na_vAb translocando los cuatro dominios de detección de voltaje y manteniendo sus propiedades funcionales, farmacológicas y estructurales (14).

En investigaciones, el filtro de selectividad de Na^+ se ha dilucidado en la estructura cristalina del canal Na_vAb , en el que se determina que los iones de Na^+ interactúan directamente con los carbonilos de Leu176 o Thr175 (53), lo que coincide con los resultados de este acoplamiento y explica la capacidad de los anestésicos locales para unirse fuertemente a estos residuos de aminoácidos (Thr186 y Leu 187 correspondientes en el canal $\text{Na}_v1.7$ humano), teniendo en cuenta que los anestésicos locales impiden el paso de los iones Na^+ a los canales de sodio activados por voltaje, al entrar en el canal de sodio y alcanzar el filtro de selectividad para los iones de Na^+ .

El principal hallazgo de este estudio fue evidenciar el sitio de unión específico de los anestésicos locales a los residuos de aminoácidos Met185 (A), Thr186 (A), Leu187 (A), Leu432 (B), Thr462 (B) del canal $\text{Na}_v1.7$, en el dominio del poro central. Asimismo, los resultados mostraron que la tríada catalítica de los anestésicos locales está constituida por Met185, Thr186 y Leu187 en el dominio del poro interno, en el cual los grupos carbonilo de estos residuos interactúan con los grupos amino en estado protonado de los anestésicos locales, los cuales son factores clave para su interacción de unión molecular y energía de afinidad (54). Adicionalmente, los resultados predictivos del sitio de unión en los servidores en línea evidencian que

éstos contienen también los mismos residuos fundamentales en la sitio catalítico de interacción con los anestésicos locales al canal Na_v1.7, como también se encontró en el acoplamiento molecular, lo cual reafirma el sitio de clivaje específico de ellos en el canal.

Los compuestos 22578003 y 92367865 tienen la mejor energía de unión en general al canal Na_v1.7, presumiblemente debido a sus anillos aromáticos adicionales y grupos propilo que difieren de las estructuras de dibucaína, lidocaína y flecainida, lo que les confiere más enlaces rotativos y aceptores de enlaces de hidrógeno. Al mismo tiempo, estos análogos tienden a unirse a las cadenas laterales A y B, preferiblemente con un enlace de hidrógeno común en la cadena B al residuo Thr462. Sin embargo, 22578003 se une más centralmente al poro interno, logrando algunos enlaces hidrófobos a la cadena C a través de los residuos Thr676 (C), Leu677 (C). Los resultados de acoplamiento en general muestran que los residuos clave están compuestos principalmente de metionina, treonina y leucina del canal Na_v1.7 que interactúan directamente en el poro interno, excepto en un caso único de Ile458 en la cadena B unida a 92367865; de manera similar, a los hallazgos de Buyan y col donde las interacciones entre los anestésicos locales en los canales Na_vMs y Na_vAb se componen principalmente de leucinas clave y treonina y, en algunos casos, fenilalanina (54).

Además, las diferencias estructurales entre flecainida, anestésicos locales y sus análogos se evidencian en sus poses de unión al canal Na_v1.7. Las estructuras que son más grandes tienden a estirarse cerca de la superficie de ciertos dominios que forman el poro interno, como se muestra en los resultados de las poses de unión de acoplamiento del estudio, en el que 22578003, 92367865 y flecainida se encuentran más cerca de las cadenas A y B en vez ubicarse más centralmente al poro, como lidocaína y dibucaína que interactúa también con las cadenas C y D. Este hallazgo concuerda con los resultados experimentales de Gamal y col entre flecainida y lidocaína, en donde la flecainida se extiende hacia las paredes de la cavidad central del canal Na_vAb (13).

Con respecto al análisis de trayectorias de RMSD, se observa que los complejos de lidocaína, dibucaína y 22578003 se presentan en un estado de plegamiento intermedio, mientras que el complejo 92367865 mantiene un estado plegado con los valores de RMSD más bajos en general (55). Por lo que, cuanto más convergente es un ligando a la proteína, cuanto más cerca está intermolecularmente, más plegado está y menores valores de RMSD tendrá. Por el contrario, el complejo de flecainida tiende a permanecer en un estado desplegado durante toda la trayectoria, afectando la convergencia de las trayectorias hacia la estructura nativa. Sin embargo, todas las proteínas no siempre mantienen los estados de plegamiento durante toda la trayectoria, sino que pueden tener transiciones plegadas/desplegadas que se pueden ver en el gráfico RMSD (56).

Además, el comportamiento de plegamiento de todos los complejos converge en el mismo rango de valores de RMSD, entre 2 y 3 Å, mostrando menos dispersión a medida que aumenta el tamaño de la proteína y el tiempo de simulación. Es habitual ver un estrechamiento de la distribución de RMSD para proteínas de más de 200 aminoácidos, especialmente después de 20ns, lo que concuerda con nuestros resultados teniendo en cuenta que el tamaño del canal Na_v1.7 consta de 980 residuos de aminoácidos y después de 50ns de trayectoria los valores de RMSD de todos los complejos son muy similares entre sí (57).

Según los resultados de RMSF, se evidenciaron altos picos de fluctuación en varios complejos, sin embargo, esos desplazamientos de residuos no se encuentran en la tríada catalítica para los complejos de lidocaína, flecainida y 92367865. Teniendo en cuenta el sitio de unión específico de los ligandos al canal Na_v1.7, los residuos Met185, Thr186, Leu187 en la cadena A y Leu432, Thr462 en la cadena B de los complejos 92367865 y 22578003 fueron los que tuvieron el menor desplazamiento durante la trayectoria de simulación con valores de RMSF entre 0,7 y 0,85 Å y un Δ RMSF -5.6 Å. Estos resultados de Δ RMSF son inferiores a 0,5 Å, por lo cual no generarán cambios estructurales significativos debido a que estos residuos son los que tienen la menor fluctuación individual que conferirá estabilidad de unión y los

valores de RMSD más bajos en general (58). Por lo tanto, estos residuos de aminoácidos de la tríada catalítica están altamente conservados y presentan baja movilidad con o sin ligandos en el canal $\text{Na}_v 1.7$.

De la misma manera que en los resultados del análisis RMSF, el complejo 92367865 tuvo los puntajes SASA, RMSD y RMSF más bajos, lo que sugiere que es una proteína encogida con gran estabilidad y perfil de baja movilidad que causa los menores cambios en el canal $\text{Na}_v 1.7$ humano, pareciéndose casi a la misma simulación de trayectoria de la estructura nativa en comparación con todos los resultados obtenidos de la dinámica molecular (59). Además, en los resultados de SASA, los complejos de flecainida, 92367865 y 22578003 tienden a disminuir con el tiempo, lo que implica el aumento de la contracción de la proteína y confiere mayor estabilidad debido a perfiles de movilidad más bajos (60). Por el contrario, los complejos de dibucaína y lidocaína aumentan los valores de SASA en el canal $\text{Na}_v 1.7$, causando expansión de proteínas, en lugar de contracción, mayor flexibilidad como se encuentra en los resultados de RMSF y mayor inestabilidad como se muestra en los valores de RMSD.

Por otro lado, el radio de giro es un parámetro que describe la reorganización de las estructuras en la región desplegada (55), de esa manera, los estados de plegamiento son inversamente proporcionales a los valores de R_g , lo que significa que los estados plegados tienen un valores de R_g menor. Por lo tanto, a valores más bajos de R_g es más compacta la proteína, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en el estudio, donde dibucaína y 22578003 presentan bajo grado de compactación con altos puntajes de R_g , mientras que el complejo 92367865 fue el más compacto y consecuentemente generó conformaciones más rígidas en un estado plegado en el canal $\text{Na}_v 1.7$, tal como se obtuvo en los puntajes de RMSD, RMSF y SASA donde fue el complejo con el mejor comportamiento en general (61).

Ahora bien, para proponer el uso de un nuevo anestésico local de acuerdo a los resultados obtenidos es necesario evaluar las propiedades fisicoquímicas y de similitud de fármacos mediante predictores de ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) y toxicidad. Es importante ver que no hay violaciones en ninguno de los análogos de anestésicos locales estudiados de acuerdo con la regla 5 de Lipinski, donde debe cumplir tres de los cuatro parámetros porque el aumento del peso molecular reduce la permeabilidad hematoencefálica e intestinal, la lipofilicidad se asocia con la absorción y los donantes o aceptores de enlaces de hidrógeno excesivos afectan la permeabilidad a la membrana (62).

Aunque 92367865 y 22578003 tienen un LogP superior a 5, estos compuestos aún pueden usarse con buena absorción y permeabilidad de acuerdo con las reglas de Lipinski. Este LogP alto se debe a que los compuestos 22578003 y 92367865 son análogos de dibucaína. La dibucaína es conocida como uno de los anestésicos locales amina/amida más potentes y duraderos, debido a su gran anillo de quinolina, el cual es el anillo aromático más hidrofóbico de todos los anestésicos locales, lo que les confiere una alta solubilidad en lípidos y por lo tanto más potencia farmacológica (63). Adicionalmente, en los resultados obtenidos, 92367865 y 22578003 mostraron una variabilidad en los sistemas enzimáticos asociados al metabolismo hepático en comparación con la dibucaína.

Sin embargo, las propiedades y los comportamiento de 22578003 y 92367865 frente al canal Nav1.7 en las fibras sensitivas A delta y C, deben corroborarse en diferentes condiciones con más estudios *in vitro* o *in vivo* para que puedan ser utilizados posteriormente en odontología para controlar el dolor dental en procesos inflamatorios.

7. CONCLUSIONES

Este estudio propone un protocolo *in silico* basado en el cribado virtual de anestésicos locales y análogos estructurales en el canal $\text{Na}_v1.7$ mediante acoplamiento molecular y simulación por dinámica molecular. Por lo tanto, se demostró la interacción molecular de nuevos análogos estructurales y el canal $\text{Na}_v1.7$. El ligando 92367865 tuvo la mejor energía de unión por afinidad en el acoplamiento molecular, lo que sugiere que los enlaces rotativos adicionales y los aceptores de enlaces de hidrógeno probablemente mejoran su clivaje e interacción con este canal de sodio. Los resultados de dinámica molecular demostraron que 92367865 formó un complejo compacto y encogido que mantiene un estado plegado con conformaciones más rígidas a lo largo del tiempo en comparación con los otros complejos del canal $\text{Na}_v1.7$. Por otro lado, todos los ligandos presentaron alta absorción gastrointestinal, permeabilidad de la barrera hematoencefálica, una variabilidad de predicción inhibitoria sobre CYP pero ninguno presentó violaciones de las reglas de Lipinski en las predicciones ADME ni toxicidad *in silico*. Por lo tanto, los resultados sugieren que 92367865 podría ser útil como un potencial fármaco con actividad promisoria sobre el canal $\text{Na}_v1.7$ y podría usarse como nuevo anestésico local en condiciones inflamatorias en la pulpa dental a través del bloqueo de las vías del dolor para la investigación experimental debido a la gran cantidad de literatura que respalda la expresión de este canal en dichas condiciones.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios experimentales *in vitro* para evaluar la actividad biológica del compuesto 92367865 como potencial anestésico local en odontología.
- Evaluar mediante un estudio cuantitativo de relación estructura-actividad el compuesto 92367865 como anestésico local promisorio en odontología.
- Estudiar el clivaje de los anestésicos locales y sus análogos en bolsillos de unión alostéricos encontrados en los servidores en línea.
- Ejecutar nuevos estudios *in silico* sobre la interacción de los anestésicos locales en los distintos tipos de canales de sodio dependientes de voltaje disponibles en las bases de datos como $Na_v1.4$ y $Na_v1.5$ y otros canales vinculados con pulpa dental inflamada.
- Analizar la interacción de los anestésicos locales en el canal $Na_v1.7$ en conjunto con la membrana lipídica mediante simulaciones de dinámica molecular.
- Establecer estudios de cálculo de energía libre de unión, MM-PBSA, el análisis de los componentes principales (PCA) y análisis de clusters mediante los resultados de dinámica molecular del estudio.

9. BIBLIOGRÁFIA

1. Närhi M, Bjørndal L, Pigg M, Fristad I, Haug S. Acute dental pain I: pulpal and dentinal pain. *Nor Tannlegeforen Tid.* 2016;126:10–8.
2. Pinto V, Derkach VA, Safronov BV. Role of TTX-Sensitive and TTX-Resistant Sodium Channels in A δ - and C-Fiber Conduction and Synaptic Transmission. *Journal of Neurophysiology.* 2008 Feb;99(2):617–28.
3. Aulestia-Viera PV, Braga MM, Borsatti MA. The effect of adjusting the pH of local anaesthetics in dentistry: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2018 Aug;51(8):862–76.
4. Zhou S, Huang G, Chen G. Synthesis and biological activities of local anesthetics. *RSC Adv.* 2019;9(70):41173–91.
5. Wadlund DL. Local Anesthetic Systemic Toxicity. *AORN Journal.* 2017 Nov;106(5):367–77.
6. Bina B, Hersh EV, Hilario M, Alvarez K, McLaughlin B. True Allergy to Amide Local Anesthetics: A Review and Case Presentation. *Anesthesia Progress.* 2018 Jun 1;65(2):119–23.
7. Baniceru M, Manda CV, Popescu SM. Chromatographic analysis of local anesthetics in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2011 Jan;54(1):1–12.
8. Barletta M, Reed R. Local Anesthetics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 2019 Nov;49(6):1109–25.
9. Noble KA. Local Anesthesia Toxicity and Lipid Rescue. *Journal of PeriAnesthesia Nursing.* 2015 Aug;30(4):321–35.

10. Catterall WA, Lenaeus MJ, Gamal El-Din TM. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020 Jan 6;60(1):133–54.
11. de Lera Ruiz M, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem.* 2015 Sep 24;58(18):7093–118.
12. Suwanchai, A., Theerapiboon, U., Chattipakorn, N., & Chattipakorn, S. C. Expression of sodium channels in dental pulp. *Asian Biomedicine.* 2011;5(6):735–46.
13. Gamal El-Din TM, Lenaeus MJ, Zheng N, Catterall WA. Fenestrations control resting-state block of a voltage-gated sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018 Dec 18;115(51):13111–6.
14. Ahuja S, Mukund S, Deng L, Khakh K, Chang E, Ho H, et al. Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist. *Science.* 2015 Dec 18;350(6267):aac5464–aac5464.
15. Balasco M, Drum M, Reader A, Nusstein J, Beck M. Buffered Lidocaine for Incision and Drainage: A Prospective, Randomized Double-blind Study. *Journal of Endodontics.* 2013 Nov;39(11):1329–34.
16. Tanaka E, Yoshida K, Kawaai H, Yamazaki S. Lidocaine Concentration in Oral Tissue by the Addition of Epinephrine. *Anesthesia Progress.* 2016 Mar 1;63(1):17–24.
17. Moura SU. Análise da Formação de Carbonato de Cálcio pela Reação do Hidróxido de Cálcio com Diferentes Veículos Anestésicos. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2008 Nov 30;8(3):271–6.

18. Wisedchaisri G, Tonggu L, McCord E, Gamal El-Din TM, Wang L, Zheng N, et al. Resting-State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-Gated Sodium Channel. *Cell*. 2019 Aug;178(4):993-1003.e12.
19. Henry MA, Hargreaves KM. Peripheral Mechanisms of Odontogenic Pain. *Dental Clinics of North America*. 2007 Jan;51(1):19–44.
20. Jurcakova D, Ru F, Kollarik M, Sun H, Krajewski J, Udem BJ. Voltage-Gated Sodium Channels Regulating Action Potential Generation in Itch-, Nociceptive-, and Low-Threshold Mechanosensitive Cutaneous C-Fibers. *Mol Pharmacol*. 2018 Sep;94(3):1047–56.
21. Chavarría BD, Rodríguez WL, Pozos GAJ. Comprendiendo y combatiendo el fracaso anestésico en odontología. *Rev ADM*. 2015;72(6):290–8.
22. Hernández-Santoyo A, Yair A, Altuzar V, Vivanco-Cid H, Mendoza-Barrer C. Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. In: Ogawa T, editor. *Protein Engineering - Technology and Application* [Internet]. InTech; 2013 [cited 2021 Jun 23]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/protein-engineering-technology-and-application/protein-protein-and-protein-ligand-docking>
23. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*. 2017 Apr;9(2):91–102.
24. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *IJMS*. 2019 Sep 4;20(18):4331.
25. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc*. 2016 May;11(5):905–19.

26. Kalyaanamoorthy S, Chen Y-PP. Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discovery Today*. 2011 Sep;16(17–18):831–9.
27. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2009;NA-NA.
28. Pereira JC, Caffarena ER, dos Santos CN. Boosting Docking-Based Virtual Screening with Deep Learning. *J Chem Inf Model*. 2016 Dec 27;56(12):2495–506.
29. Lozano-Aponte J. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 45(1):86–8.
30. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*. 2018 Sep;99(6):1129–43.
31. BUEREN-CALABUIG JA. Dinámica molecular. 2014;1066360. Available from: URL <https://doi.org/10.5281/zenodo>
32. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D1202–13.
33. Contreras-Puentes N, Mercado-Camargo J, Alvíz-Amador A. In silico study of ginsenoside analogues as possible BACE1 inhibitors involved in Alzheimer's disease. *F1000Res*. 2019 Jul 23;8:1169.
34. Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, et al. Structural Basis for Molecular Recognition at Serotonin Receptors. *Science*. 2013 May 3;340(6132):610–4.

35. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018 Jul 2;46(W1):W296–303.
36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605–12.
37. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785–91.
38. Jendele L, Krivak R, Skoda P, Novotny M, Hoksza D. PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*. 2019 Jul 2;47(W1):W345–9.
39. Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*. 2018 Jul 2;46(W1):W363–7.
40. Hussein HA, Borrel A, Geneix C, Petitjean M, Regad L, Camproux A-C. PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jul 1;43(W1):W436–42.
41. Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System. 2019.
42. Dassault Systèmes BIOVIA. Discovery Studio Visualizer. 2016.
43. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2011 Oct 24;51(10):2778–86.
44. Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem*. 2005 Dec;26(16):1668–88.

45. Alviz-Amador A, Galindo-Murillo R, Pérez-González H, Rodríguez-Cavallo E, Vivas-Reyes R, Méndez-Cuadro D. Effect of 4-HNE Modification on ZU5-ANK Domain and the Formation of Their Complex with β -Spectrin: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J Chem Inf Model*. 2020 Feb 24;60(2):805–20.
46. Roe DR, Cheatham TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*. 2013 Jul 9;9(7):3084–95.
47. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017 May;7(1):42717.
48. Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. Wren J, editor. *Bioinformatics*. 2019 Mar 15;35(6):1067–9.
49. Lagunin A, Zakharov A, Filimonov D, Poroikov V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. *Mol Inf*. 2011 Mar 14;30(2–3):241–50.
50. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*. 2008 May 19;36(Web Server):W5–9.
51. Bordogna A, Pandini A, Bonati L. Predicting the accuracy of protein-ligand docking on homology models. *J Comput Chem*. 2011 Jan 15;32(1):81–98.
52. Mak K-K, Pichika MR. Artificial intelligence in drug development: present status and future prospects. *Drug Discovery Today*. 2019 Mar;24(3):773–80.

53. Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. 2011 Jul;475(7356):353–8.
54. Buyan A, Sun D, Corry B. Protonation state of inhibitors determines interaction sites within voltage-gated sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Apr 3;115(14):E3135–44.
55. Deng N, Dai W, Levy RM. How Kinetics within the Unfolded State Affects Protein Folding: An Analysis Based on Markov State Models and an Ultra-Long MD Trajectory. *J Phys Chem B*. 2013 Oct 24;117(42):12787–99.
56. Garcia AE, Onuchic JN. Folding a protein in a computer: An atomic description of the folding/unfolding of protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Nov 25;100(24):13898–903.
57. Sargsyan K, Grauffel C, Lim C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Theory Comput*. 2017 Apr 11;13(4):1518–24.
58. Dong Y, Liao M, Meng X, Somero GN. Structural flexibility and protein adaptation to temperature: Molecular dynamics analysis of malate dehydrogenases of marine molluscs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Feb 6;115(6):1274–9.
59. Durham E, Dorr B, Woetzel N, Staritzbichler R, Meiler J. Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. *J Mol Model*. 2009 Sep;15(9):1093–108.
60. Junaid Md, Alam MdJ, Hossain MdK, Halim MA, Ullah MO. Molecular docking and dynamics of Nickel-Schiff base complexes for inhibiting β -lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *In Silico Pharmacol*. 2018 Dec;6(1):6.

61. Lobanov MYu, Bogatyreva NS, Galzitskaya OV. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Mol Biol.* 2008 Aug;42(4):623–8.
62. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1997 Jan;23(1–3):3–25.
63. Kuroda Y, Ogawa M, Nasu H, Terashima M, Kasahara M, Kiyama Y, et al. Locations of local anesthetic dibucaine in model membranes and the interaction between dibucaine and a Na⁺ channel inactivation gate peptide as studied by 2H- and 1H-NMR spectroscopies. *Biophysical Journal.* 1996 Sep;71(3):1191–207.

10. ANEXOS

- Resultados asociación anestésicos locales-canales de sodio.
- Resultados búsqueda predictiva de bolsillos de unión.
- Resultados acoplamiento molecular del cribado virtual.
- Resultados predicción propiedades ADME y toxicidad.
- Carta de aceptación ponencia SLOC2-181.
- Envío de artículo- Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.