



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Búsqueda mediante *virtual screening* de moléculas capaces de interaccionar con Lox-1 para su potencial uso terapéutico.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Marjorie Morales Concha

Director de Tesis: Claudio Aguayo

Codirector de Tesis: Carlos Felipe Burgos

Marzo/ 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Búsqueda mediante virtual
screening de moléculas capaces
interaccionar con Lox-1 para su
potencial uso terapéutico.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

Marjorie Morales Concha

**Director de Tesis: Claudio Aguayo
Codirector de Tesis: Carlos Felipe Burgos**

FECHA: 06 de marzo del 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Búsqueda mediante virtual screening de moléculas capaces interaccionar con Lox-1 para su potencial uso terapéutico.”

Alumno

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Claudio Aguayo en el laboratorio de Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología Universidad de Concepción y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dra. Karina Oyarce
Presidente Comisión

Dr. José Martínez
Profesor Informante

Dr. José Luis Bucarey
Profesor Informante

Dr. Claudio Aguayo
Director de Tesis

**Concepción, Chile
2023**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Agradecimientos:

Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología Universidad de Concepción, Dr.

Claudio Aguayo

Departamento de Fisiología Universidad de Concepción, Dr. Carlos Felipe Burgos

A mis hijos Martina y Gaspar

ABREVIATURAS

LDL: Lipoproteína de baja densidad/low-density lipoprotein

OX-LDL: Lipoproteína de baja densidad oxidada/oxidized low-density lipoprotein

LOX-1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein (LDL) receptor-1

CTLD: Dominio C-terminal

VS: Virtual screening

LBVS: *Ligand-based virtual screening*

SBVS: *Structure-based virtual screening*

ADMET: *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity.* Absorción, distribución, metabolismo excreción y toxicidad son criterios de selección de fármacos.

Glide: *Grid-Based Ligand Docking with Energetics.* Software usado en Screening virtual

MM-GBSA: *Molecular Mechanics Generalized-Born Surface Area.* Aproximación mecánico estadística para el cálculo de ΔG de unión.

PDB: *Protein Data Bank.* Base de datos de estructuras cristalográficas de proteínas o fragmentos resueltos

ZINC: *Zinc Is Not Comercial.* Librería de moléculas de libre acceso.

ÍNDICE

PORTADA	3
DEDICATORIA	5
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE	7
RESUMEN	8
INTRODUCCION	
<i>Enfermedad cardiovascular</i>	9
<i>LDL oxidada (OxLDL)</i>	10
Receptores scavenger	12
Lox-1	14
Estructura del receptor Lox-1	17
Virtual screening	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
METODOLOGÍA	24
Preparación de estructura y adecuación para el docking	24
Generación librería	25
Docking proteína – ligando	26
RESULTADOS	28
Selección de estructura Lox-1	28
Preparación de librería	29
Screening Virtual	30
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	59

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es un proceso inflamatorio crónico que implica la interacción compleja entre lipoproteínas modificadas, monocitos-macrófagos, linfocitos T y componentes de la pared vascular. Una de las principales causas de disfunción vascular observada en la aterosclerosis y en las enfermedades cardiovasculares es el aumento en los niveles extracelulares de formas oxidadas de lipoproteínas de baja densidad (ox-LDL) y a la activación del receptor 1 de ox-LDL similar a la lectina, denominado **Lox-1**. Lox-1 tiene un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis, la progresión de la placa aterosclerótica y ha sido implicado en la desestabilización de lesiones ateroscleróticas.

Recientemente se demostró que la sobreexpresión del gen LOXIN es capaz de inactivar Lox-1 y prevenir la aterosclerosis en un modelo murino. Esta evidencia sugiere que la inhibición selectiva de Lox-1 puede inhibir la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Se propone identificar moléculas capaces de interaccionar con Lox-1 mediante docking molecular masivo ("*Structure-based virtual screening*", SBVS). Por ello, nuestra hipótesis es: **El uso de la herramientas *in silico* de SBVS permitirá identificar nuevas moléculas que se unan a la espina básica de LOX-1 e interfieran con la unión de Lox-1 y ox-LDL.**

Se identificaron 6 moléculas que interactúan de manera estable con ΔG de unión entre -39,34 y -31,24 Kcal/mol. Estas interactúan con el área de la espina básica de Lox-1, lo cual podría impedir la unión de ox-LDL con el receptor reduciendo los daños causados por la aterosclerosis y contribuir al tratamiento de enfermedades mediadas por el receptor Lox-1.

PALABRAS CLAVE: Aterosclerosis, Ox-LDL, Lox-1, docking molecular, virtual screening.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular y la aterosclerosis son las mayores causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (1). Estas comprenden una serie de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos (OMS, 2017), entre los cuales se encuentran: enfermedad coronaria (infarto agudo al miocardio, angina estable/inestable, antecedentes de angioplastia o cirugía de revascularización miocárdica), enfermedad cerebrovascular (accidente cerebrovascular o ataque cerebral isquémico transitorio), enfermedad arterial periférica, enfermedad aórtica aterosclerótica, enfermedad renovascular y enfermedad carotídea (MINSAL, 2017,P:7). Se conoce que la base patogénica común a la mayoría de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis (2).

En los últimos años se han producido grandes avances en la comprensión de las interacciones moleculares y celulares en la aterosclerosis. Así, la arteriosclerosis es el término general que se utiliza para abarcar diversas enfermedades caracterizadas por el remodelado y engrosamiento de las paredes arteriales que pierden su elasticidad. Actualmente, se la considera como una enfermedad multifactorial, la cual se caracteriza por la alteración del metabolismo de los lípidos generando una respuesta inflamatoria sistémica (3). Por otro lado, la inflamación arterial asociada con la aterosclerosis se inicia por la lesión endotelial que conduce a la activación de las células endoteliales y al reclutamiento de células inflamatorias hacia la pared vascular (4).

Las lesiones ateroscleróticas tienden a ocurrir en regiones de la arteria que se expone a un flujo turbulento de sangre, este flujo modifica la funcionalidad de células endoteliales e incrementa la permeabilidad de moléculas, a causa de este aumento se acumulan lipoproteínas en la íntima las cuales interactúan con glucosaminoglicanos formando agregados que pueden ser químicamente modificados, por ejemplo la oxidación de las lipoproteínas (5).

En este sentido, la lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL) induce lesión endotelial y participa en la formación y progresión de la placa aterosclerótica, favoreciendo el almacenamiento de lípidos y la inflamación local. La placa aterosclerótica no solo estrecha la luz de los vasos sanguíneos si no también pueden romperse y generar aterotrombosis, ambas vinculadas a complicaciones cardiovasculares graves (6,7)

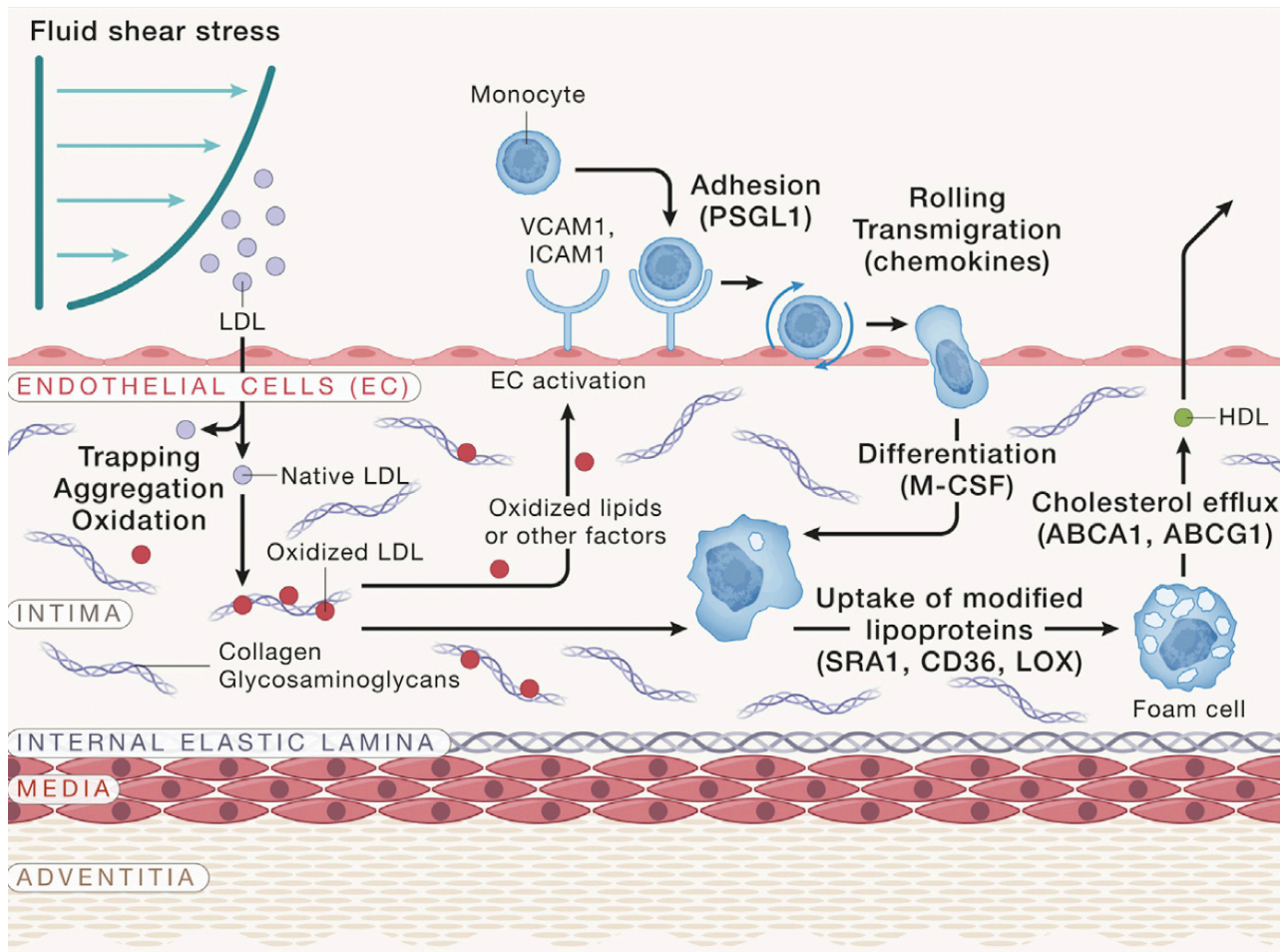


Figura 1.Desarrollo de lesión aterosclerótica. Las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) entran en la íntima. Las lipoproteínas se agregan y se oxidan (ox-LDL), lo cual promueve la activación de las células endoteliales expresando VCAM1, ICAM1. Los monocitos entran en la íntima, se diferencian en macrófagos, los cuales expresan SRA1,CD36, LOX(2).

LDL oxidada (ox-LDL)

El origen y las causas de la enfermedad aterosclerótica han intentado ser explicados a lo largo del tiempo mediante diferentes teorías o hipótesis, entre las que destacan las hipótesis trombogénica y lipídica. De estas la hipótesis la asociada a una respuesta crónica al daño formulada por Ross y Glomset en 1976 es la más extendida. Esta hipótesis explica la aparición de las lesiones ateroscleróticas como consecuencia de la oxidación de las LDL y una lesión en el endotelio vascular (8).Dentro de las LDL

modificadas de importancia en la aterogénesis se encuentran la LDL acetilada (AcLDL) y LDL oxidada (OxLDL)(26).

Ox-LDL contribuye a los inicios de la aterogénesis y se considera un indicador temprano de disfunción endotelial (DE) (9). Existen evidencias que sugieren que la mayoría de la oxidación de las LDL ocurre en el espacio subendotelial de las arterias, donde dichas partículas pueden ser retenidas por los proteoglicanos y debido a la menor concentración de sustancias antioxidantes, esta se oxida. La oxidación de la LDL es un proceso complejo durante el cual tanto la fracción proteica y la lipídica sufren cambios oxidativos y originan productos complejos. Los ácidos grasos pueden originar peróxidos, hidroperóxidos, productos similares a las prostaglandinas (isoprostanos), aldehídos e hidrocarburos. También se pueden originar productos de oxidación del colesterol, como la lisofosfatidilcolina y otras modificaciones oxidativas de los fosfolípidos. La oxidación proteica origina fragmentos proteicos, carbonilos proteicos, modificaciones en diversos aminoácidos (cisteína, metionina, histidina, lisina, arginina, triptófano y tirosina), productos o aductos lípido-proteína que pueden ser catalogados como lipofuscinas. A su vez los cambios oxidativos generan cambios en algunas propiedades de la partícula: densidad aumentada, aumento de la carga negativa(10).

La Disfunción Endotelial (DE) se ha definido como una condición patológica caracterizada por alteraciones en la respuesta antiinflamatoria, anticoagulantes, y en la capacidad de regular el tono vascular (11–13). Existe evidencia que describe cómo ox-LDL se asocia con un aumento en la producción de iones superóxido, disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) o en la expresión y/o actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (14–19). Además, se ha descrito que ox-LDL induce la muerte de las células endoteliales a través de la activación de vías metabólicas, altera su función y promueve la progresión de las placas ateroscleróticas (20,21).

Estudios adicionales demostraron que la ox-LDL afecta a otros tipos de celulares, los cuales contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis. Es así como ox-LDL: activa las plaquetas, aumenta la proliferación y migración de células de músculo liso (SMC), activa la generación de colágeno dependiente de fibroblastos y aumenta la migración de monocitos/macrófagos y su diferenciación a células espumosas y/o fenotipo M1 proinflamatorio (22–25).

Esto implica que, **ox-LDL promueve la activación endotelial y la formación células de espuma, procesos que son cruciales en el desarrollo de la aterosclerosis.** Por eso es relevante conocer los receptores que internalizan estas moléculas a la célula.

Receptores scavenger

Los receptores scavengers son un grupo heterogéneo de proteínas de membrana que se caracterizan por su capacidad de unir lipoproteínas de baja densidad (LDL) en su forma nativa y/o modificada.

Se ha descrito que los receptores *scavenger* clásicos, como SR-AI/II, CD36, SR-BI, CD68 y SREC, son responsables de la internalización de partículas de ox-LDL en macrófagos y células de músculo liso (27). De hecho, SR-A y CD36 captan del 75 % al 90 % de LDL acetilado (ac-LDL) y ox-LDL en monocitos/macrófagos (27). A pesar de que la eliminación de SR-A y CD36 no evita la formación de células espumosas de macrófagos de ratones ApoE^{-/-}, CD36^{-/-} y Msr1^{-/-}, la pérdida de estas vías reduce la inflamación, la muerte celular apoptótica y la formación de núcleos necróticos en las lesiones vasculares de esos ratones (26,28).

Esta familia de receptores incluye 8 clases diferentes de proteínas solubles y de membrana, las cuales son codificadas por genes distintos. Su clasificación está basada en la similitud de sus dominios y por su capacidad de unir partículas lipídicas modificadas y ligando polianiónicos (29).

Las moléculas de LDL modificada puede interaccionar con:

Receptor scavenger tipo A:

Dentro de éstos encontramos al menos 4 receptores: receptor scavenger tipo A (SR-A), receptor de macrófagos con estructura de colágeno (MARCO), receptor scavenger con lectina tipo-C (SRCL) y el receptor scavenger A-5 (SCARA5) (30). De esta familia solo el receptor SR-A, ha sido relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha postulado que el SR-A es proaterogénico debido a su capacidad de mediar la incorporación de oxLDL en macrófagos. Sin embargo, este receptor conduce a la formación de lesiones ateroscleróticas de menor tamaño (29)

Receptor scavenger tipo B.

Contiene al menos 4 miembros: CD36, SR-B, LIMPII y CD163. Dentro del desarrollo de la aterosclerosis podemos relacionar a los receptores CD36 y SR-B. En humanos,

CD36 se encuentra en el cromosoma 7 y se expresa en células linfoides, hematopoyéticas, células endoteliales, adipocitos y células musculares lisas vasculares, estando principalmente expresado en macrófagos (31). Los ratones doble knock out SR-A^{-/-} CD36^{-/-} muestran una disminución en la formación de células de espuma y en el tamaño de la lesión aterosclerótica (32) El receptor SR-B, se localiza en el cromosoma 12 humano codifica para dos isoformas (SR-BI/II), se expresa en monocitos, macrófagos, tejido adiposo y es esteroideogénico. SR-BI aumenta su expresión por estimulación con testosterona y ácidos grasos poli-insaturados y disminuyen por oxLDL, TNF- β e IL-1 (29) . A diferencia de los otros receptores scavenger, SR-BI posee funciones protectoras contra la aterosclerosis, mediante el incremento del eflujo de colesterol de las partículas de HDL, permitiendo el aclaramiento y excreción hepática (30)

Receptor Scavenger tipo C.

En esta categoría encontramos sólo un receptor, dsR-C1, el cual se ha identificado en *Drosophila melanogaster*. Su función principal es reconocer bacterias, por lo que juega un papel fundamental en la regulación del sistema inmune innato del insecto (33)

Receptor Scavenger tipo D.

Dentro de este grupo encontramos el receptor CD68 (macrosialin en ratones) y la glicoproteína lisosomal de membrana (Lamp). CD68 se localiza en el cromosoma 17 humano y se expresa en macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas, con un patrón de distribución similar a los receptores scavenger tipo B (34). Su expresión puede aumentar por la incubación con OxLDL y ésteres de forbol, pero es inhibida por TNF- α y lipopolisacáridos (34).

Receptor Scavenger tipo F

Dentro de éstos encontramos el receptor SREC, el cual es expresado en células endoteliales de mamíferos y macrófagos. Sus niveles aumentan en células tratadas con lipopolisacáridos y disminuyen por IL-1 α , IL-1 β y TNF- α . (35)

Receptor Scavenger tipo G

En este grupo encontramos al receptor de quimioquinas CXCL16, el cual une fosfatidilserina y lipoproteínas oxidadas (SR-PSOX). Se encuentra localizado en el cromosoma 17 humano y es altamente expresado en macrófagos y células musculares lisas, mientras que presenta una baja expresión en células endoteliales. La expresión

del receptor SR-PSOX en monocitos aumenta al ser expuestos a TNF- α , IFN- γ , LPS y oxLDL. (33) . Esto ha permitido sugerir que la activación de este receptor puede estar relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis mediante la activación de señales inflamatorias (34,35)

Receptor Scavenger tipo H

En este grupo se encuentra FEEL-1 y FEEL-2, ubicados en el cromosoma 14 y 12 humano respectivamente. Ambos están altamente expresados en tejido hepático. FEEL-1 se encuentra expresado en monocitos, macrófagos y células endoteliales, mientras que FEEL-2 ha sido detectado en bazo y ganglios linfáticos. FEEL-1 es el principal receptor para la captación de lipoproteínas de baja densidad acetiladas (acLDL), demostrado mediante la expresión transitoria del gen en células CHO (células de ovario de hámster)(36)

Además, de los receptores scavenger anteriormente descritos, se ha reportado la existencia de otro receptor para la OxLDL, llamado receptor de lectina tipo-1 para lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Lox-1) (33,36) que corresponde a un receptor scavenger tipo E. (29,37).

Lox-1

Lox-1 es un receptor presente en células endoteliales, plaquetas y células musculares lisas, que capta ox-LDL circulante, y ha sido estudiado en varias patologías tales como aterosclerosis, diabetes, enfermedad cardíaca arterial coronaria e hipertensión (38,39).

Respecto a su localización, se ha descrito que Lox-1 se ubica en las caveolas, zonas ricas en colesterol en la membrana plasmática. Se ha comprobado que su función es modulada por colesterol, ya que frente a una depleción de colesterol se pierde la localización de Lox-1 en las caveolas, lo que se traduce en una disminución en la interacción oxLDL/Lox-1. Esto sugiere que los *clúster* de Lox-1 en los microdominios de la caveola son necesarios para que exista una interacción entre oxLDL y su receptor (40). Se sabe que la interacción entre oxLDL y Lox-1 se produce mediante la atracción entre cargas de ambas moléculas, por la cual Lox-1 no se une a LDL nativa (41). Por otro lado se conoce que la funcionalidad del receptor Lox-1 depende de la formación de

un homodímero que aumenta su afinidad por las cargas positivas de la ox-LDL (42). Lox-1 se une a ox-LDL deslipidada, sugiriendo una interacción con la proteína Apo B100 de la LDL. Sin embargo, se ha determinado que Lox-1 se une con mayor afinidad a LDL mínimamente oxidada más que a ox-LDL altamente oxidada, esto sugiere que Lox-1 tiene la capacidad de interactuar con lípidos oxidados mediante la unión a la proteína apoB100, los cuales no son removidos por deslipidación (40).

Lox-1, inicialmente fue descrito como el receptor que se une oxLDL en células endoteliales, pero luego se descubrió que también se expresa en macrófagos y células musculares lisas (40). Si bien la expresión de este receptor es constitutiva, puede inducirse por varios estímulos aterogénicos y proinflamatorios, tales como: TNFalfa, angiotensina II, Lisofosfatidilcolina (LPC), homocisteína, estrés por flujo, altas concentraciones de glucosa y ox-LDL. Además, estudios *in vivo* han demostrado que estímulos fisiopatológicos como diabetes e hipertensión también estimulan la expresión de este receptor (43)

En las células endoteliales, Lox-1 está implicado en la captación de LDL modificada y la desregulación de la función endotelial (44). La activación de Lox-1 desencadena una serie de procesos biológicos y respuestas celulares que son resumidos en la figura 2.

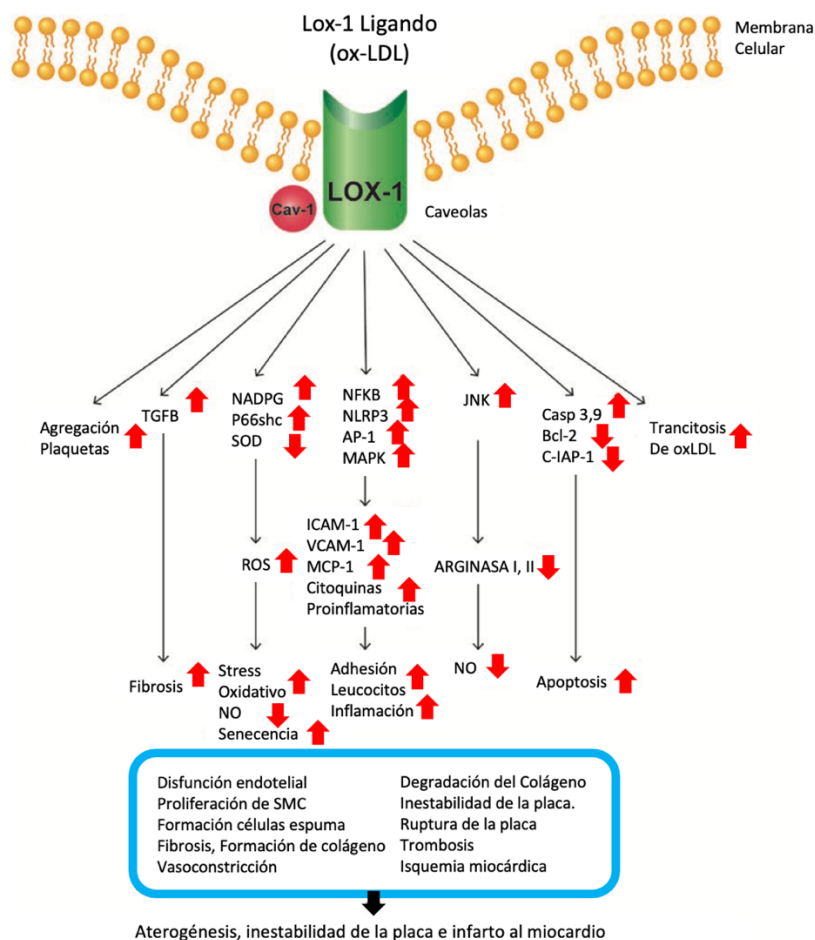


Figura 2. Vía de señalización desencadenada por la activación de Lox-1. JNK indica janus quinasa; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; MCP, proteína quimioatrayente de monocitos; NF-κB, factor nuclear κB; NO, óxido nítrico; SMC, células de músculo liso; y TGF-β1, factor de crecimiento transformante β1 (45,46).

La expresión basal de Lox-1 en las células endoteliales *in vitro* es baja, pero se ha observado que su expresión es altamente estimulada por estímulos proinflamatorios y pro-oxidativos (45,47). Además, en estudios en ratones *knockout* para Lox-1 muestran reducción del espesor de la íntima y de la inflamación endotelial (48), demostrando que la eliminación de Lox-1 disminuye la formación de colágeno en las regiones ateroscleróticas en comparación con el control. Estas evidencias apoyan la hipótesis que Lox-1 juega un papel perjudicial clave en la respuesta metabólica e inflamatoria durante la aterosclerosis (49).

Por otro lado, estudios epidemiológicos recientes reportan que Lox-1 no solo está relacionado con lesiones ateroscleróticas, sino que también en cáncer. Se ha demostrado

que varias líneas celulares tumorales tiene una sobre activación del metabolismo lipídico; en donde juega un rol importante Lox-1 (50). Específicamente, se sabe que Lox-1 está sobre-expresado en el 57 % de las células de cáncer de vejiga y cuello uterino, en el 11 % de las células de cáncer de glándula mamaria, el 10 % de las células de cáncer de pulmón y el 20 % de las células de cáncer colorrectal (CCR), como se informó en el metaanálisis de perfiles de expresión génica de alrededor de 950 líneas de células cancerosas. Por lo tanto, **Lox-1 está directamente implicado en el desarrollo de los procesos proinflamatorios y sería un potencial blanco para contrarrestar dichos efectos y prevenir las patologías en las cuales participa, tales como aterosclerosis y cáncer.**

Estructura del receptor Lox-1

Lox-1 es una proteína transmembrana tipo II de 273 aminoácidos, codificada por el gen OLR1, perteneciente estructuralmente a la familia de las lectinas de tipo C. El gen OLR1 tiene más de 7000 pb y está formado por 6 exones y 5 intrones, ver figura 3. Lox-1 se caracteriza por tener un dominio tipo lectina, y formar un homodímero. El exón 1 codifica para la región citoplasmática, el exón 2 codifica para el dominio transmembrana, el exón 3 codifica para el cuello y el exón 4,5 y 6 codifican para el dominio tipo lectina. Se han descrito 7 mutaciones de nucleótido simple (SNP): uno de ellos en la región codificante, es decir, en el exón 4 y los restantes 6 en regiones no codificante, es decir, en los intrones 4, 5 y 3'UTR. Estos 6 polimorfismos de la región no codificante se han denominado "bloque de desequilibrio". Así, esta región determina un genotipo de riesgo que promueve la susceptibilidad a infarto agudo al miocardio (IAM) (32). Si bien, los SNP no afectan la secuencia codificante del gen OLR1, existe una posibilidad que estén formando un producto alternativo, es decir, isoformas del ARNm como consecuencia de un splicing alternativo. Efectivamente, en el año 2005 se demostró que esta región da origen a un splicing alternativo generando una variante trunca del gen OLR1, el transcrito NM_001172633, que tiene un tamaño de 1008 pb y carece del exón 5. Por lo tanto, a nivel de proteína, se traduce en una alteración del dominio extracelular que no permite unir ox-LDL. A esta proteína truncada se le denominó LOXIN y carece del dominio de lectina tipo-C, lo cual impide la unión a su ligando, formando un heterodímero inactivo con Lox-1 (51).

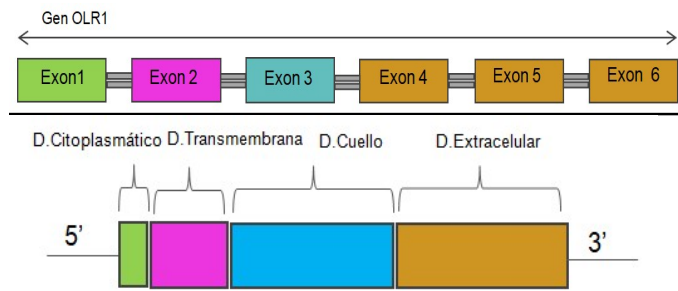


Figura 3. Representación del gen de Lox-1. Arriba, Estructura de gen OLR1. Abajo, transcritor Lox-1

A nivel estructural, Lox-1 está compuesto por 4 dominios: un dominio N-terminal citoplasmático corto, un dominio transmembrana, un dominio de cuello y un dominio C-terminal (CTLD) extracelular encargado de interaccionar con ox-LDL (52,53). Si bien, Lox-1 interacciona con ox-LDL, también tiene la capacidad de unirse a otros factores, tales como productos de glicosilación avanzada, plaquetas y células apoptóticas (22)

La estructura de CTLD de Lox-1 consiste en hojas- β antiparalelas acompañado por hélices α y estabilizadas por 3 enlaces disulfuro intracatenarios que promueve la formación de un túnel hidrofóbico central que se extiende por toda la proteína (54). Los lados de este túnel están formados por aminoácidos polares como tirosina, permitiendo así que el túnel movilice lípidos. La región CTLD de Lox-1 está involucrada en el reconocimiento de ligandos y esta característica se atribuye a un grupo de aminoácidos cargados positivamente involucrados en la unión de ligandos cargados negativamente. Estos residuos conforman una estructura conocida como "espina básica" que proporciona una plataforma apropiada para la interacción y el reconocimiento electrostático de las hélices anfipáticas ubicadas en la superficie de ox-LDL (55-57), mientras que el túnel hidrofóbico es importante para la unión de lípidos (57) (Figura 4).

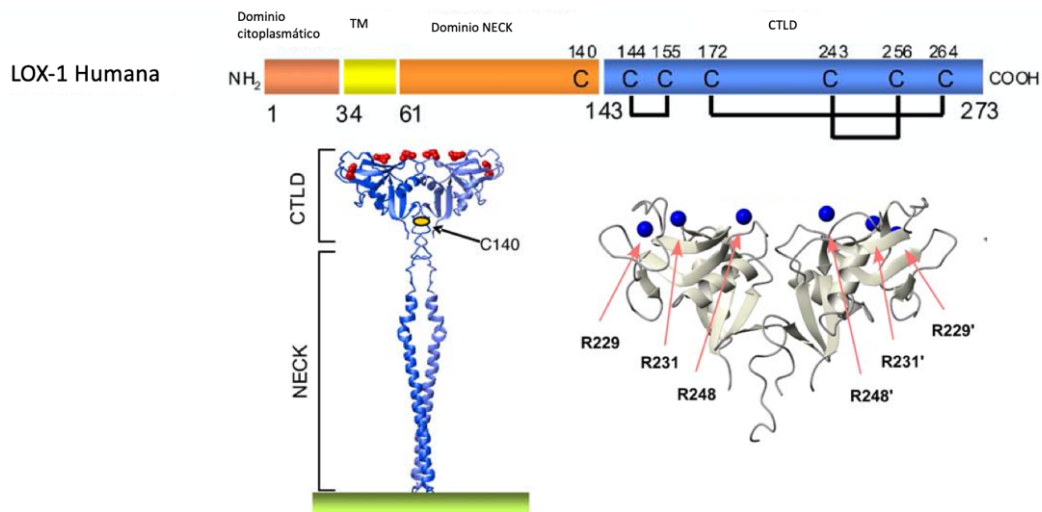


Figura 4. Representación de la estructura proteica de Lox-1. En la parte superior de la imagen se muestran sus cuatro dominios: N-terminal citoplasmático, TM dominio transmembrana, dominio NECK o cuello, CTLD dominio tipo lectina tipo C. Se muestran las cisteínas con sus respectivos enlaces intracatenarios. En la parte inferior, se muestra la estructura proteica completa de Lox-1 en la superficie celular, basada en la estructura cristalina para CTLD y la estructura del modelo para NECK (53)

Se ha observado que mutaciones en la región de interacción del dímero, por ejemplo en el aminoácido Trp150 que es remplazado por una Ala, generan una alteración estructural tanto en el túnel hidrofóbico como en la linealidad de la espina básica (58,59) y reducen notablemente la capacidad de unión de Lox-1 (52,56,60). Además, a través de dinámica molecular se ha observado que el reemplazo de los residuos básicos de arginina por alanina altera la conformación de CTLD y reduce su afinidad por ox-LDL (61). Esta región dentro de la estructura de Lox-1 resulta esencial para la unión de ox-LDL, por lo tanto, bloquear dicha interacción con **moléculas con capacidad de interactuar con esta espina básica podrían reducir su capacidad de interaccionar con ox-LDL y representar un objetivo terapéutico atractivo para inhibir la captación de LDL mediada por Lox-1 y prevenir la formación de placa aterosclerótica.**

Existe un mayor número de evidencias que indican que Lox-1 es un objetivo prometedor para la prevención de la aterosclerosis. Múltiples fármacos, incluidos los antioxidantes naturales como estatinas, antiinflamatorios, antihipertensivos y los fármacos hipoglucémicos presentan una acción inhibitoria sobre la expresión de Lox-1 y su señalización en células endoteliales (44,47,62,63). Además, experimentos *in vivo* mostraron que la administración de anticuerpos anti-Lox-1 disminuye la disfunción endotelial que conduce a una reducción en los lípidos depósitos e inhibición de la aterosclerosis (44,46,63–66). Además, la inyección de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra Lox-1 en ratones apoE KO, redujo la formación de placa aterosclerótica *in vivo* (67). Estudios recientes realizados en el laboratorio, muestran que ratones aterogénicos alimentados con una dieta rica en grasas (4% de colesterol) presentan una alta expresión de Lox-1 en las células endoteliales e inflamatorias presentes en la placa aterosclerótica e interesantemente se confirmó que la inyección de adenovirus que sobre-expresa LOXIN previene la aterosclerosis y la formación de placas en ratones alimentados con una dieta rica en grasas. Por lo tanto, se ha demostrado el rol de Lox-1 en el desarrollo de la placa aterosclerótica y como su inhibición evita la formación de esta, a pesar de mantenerse una dieta alta en grasa. Sin embargo, el uso de esta estrategia es compleja. A pesar de existir evidencia que fármacos como las estatinas reducen la disponibilidad de ox-LDL, no se bloquea la internalización de este ni las vías de señalización activadas por ox-LDL, sin mencionar que Lox-1 no es solo mediador de aterosclerosis (83). Dado lo costoso y complejo de las estrategias existentes el bloqueo farmacológico sería una alternativa a desarrollar mediante la identificación de moléculas guías usando herramientas bioinformáticas.

Virtual screening

Virtual screening (VS) es una estrategia bioinformática basada en el uso de base de datos de compuestos con estructura conocida para identificar moléculas novedosas frente a un objetivo biológico con estructura conocida. VS tiene una serie de pasos secuenciales donde se comienza con una gran cantidad de moléculas las cuales se reducen sistemáticamente en número en base a las mejores afinidades y capacidad de interacción.

En general, se usan dos enfoques para VS: 1) basado en ligandos (LBVS) que usa información de estructura-actividad de un conjunto de compuestos activos conocidos para identificar nuevas moléculas potencialmente activas, y 2) basado en estructura (SBVS) que usa la estructura del objetivo biológico obtenida mediante técnicas experimentales como cristalografía y difracción rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o modelamiento molecular, para evaluar la capacidad de unión a través de simulaciones de acoplamiento (docking) proteína-ligando y luego clasificar las moléculas según su afinidad de unión predicha y el cálculo de puntajes estructurales (score) (68,69).

El aumento significativo de estructuras proteicas disponibles en los últimos años ha abierto una oportunidad para el desarrollo de SBVS (70–72). Mediante esta estrategia se han identificado múltiples fármacos con propiedades antitrombóticas (73), antiinflamatorias (74) o antiateroscleróticas. En esta última condición, se han generado diversos fármacos tales como moduladores de metaloproteinasa-2 de matriz (71), factor de crecimiento derivado de plaquetas (75), proteína de unión a ácidos grasos 4 (76), la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (77) y la fosfatasa 16 de doble especificidad (13), todos los cuales han mostrado un potencial uso en patologías cardiovasculares.

Estudios recientes muestran que utilizando virtual screening han identificado al menos dos moléculas como posibles inhibidores de Lox-1 de una base de datos que comprende 18 millones de moléculas que podrían inhibir la captación de ox-LDL, disminuir la expresión de Lox-1 e inactivar la señalización de MAPK en células endoteliales humanas (12). Así se han diseñado sustratos naturales miméticos o inhibidores de Lox-1 basándose en la estructura de Lox-1 dirigidas contra el túnel hidrofóbico (12,61). En particular, Thakkar et al., 2015 utilizaron técnicas de diseño de fármacos basadas en la estructura (SBDD) para buscar y encontrar moléculas que bloquean el túnel hidrofóbico y previenen las interacciones ox-LDL/Lox-1. Similares estudios fueron realizados por Falconi et al 2013, quienes diseñaron y sintetizaron una nueva molécula que bloquean el túnel hidrofóbico de Lox-1. Más recientemente, Kumari et al., 2019 informaron la síntesis y evaluación de una serie de nuevos inhibidores de Lox-1, dos moléculas pudieron bloquear la interacción de Lox-1 con ox-LDL. A pesar de que estas moléculas parecen prometedoras aún no se han finalizado ensayos clínicos con resultados exitosos. Además, ninguno de estos trabajos se ha enfocado en bloquear el sitio de interacción directo de ox-LDL, sino que buscan bloquear el túnel hidrofóbico que tiene una mayor dificultad de acceso.

En un trabajo recientemente publicado Akanksha Tomar et al 2022 logró descifrar los posibles sitios de unión a ligando en Lox-1, específicamente en la región CTLD, que puedan ser utilizados como objetivo para nuevas moléculas. En este trabajo se describen dos sitios principales con afinidad nanomolar, uno de ellos se encuentra en la superficie de la región CTLD delimitada en los residuos P20,Y245,E254,W203,L258. Por lo tanto es posible estudiar la interacción de moléculas en este sitios de unión en conjunto a la espina básica de la estructura que presenten una afinidad importante y posiblemente impidan la interacción del receptor a LDL-ox.

En resumen

- 1) La expresión de Lox-1 está aumentada en células endoteliales y macrófagos por acción pro aterogénica, y en condiciones, tales como inflamación vascular, diabetes, hipertensión y dislipidemia.
- 2) Lox-1 media la internalización de ox-LDL, participando en la disfunción y activación endotelial y formación de células inflamatorias (monocitos/macrófagos).
- 3) Lox-1 es una diana terapéutica para prevenir la progresión de la aterosclerosis y cancer.
- 4) La inhibición de la interacción entre Lox-1-ox-LDL impide la captación celular de ox-LDL.
- 5) El diseño basado en estructuras es un enfoque terapéutico que permite buscar y encontrar nuevos inhibidores de Lox-1 para su uso en la aterosclerosis y complicaciones cardiovasculares.

Por todo lo anterior, este trabajo se enfocó en identificar moléculas capaces de interferir con la activación Lox-1 mediante su unión a la **“espina básica”**. Para ello se utilizó la estrategia de virtual screening basado en su estructura y moléculas almacenadas en bases de datos disponibles. Esto constituye un primer paso para el desarrollo de futuros fármacos capaces de prevenir la aterosclerosis u otras enfermedades mediadas por Lox-1.

HIPÓTESIS

El uso de la herramientas *in silico* de "SBVS" permitirá identificar nuevas moléculas que se unan a la espina básica de Lox-1 que potencialmente interfieran con su unión a ox-LDL.

OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante predicciones *in silico* de "SBVS" un grupo de moléculas con capacidad de interaccionar con la espina básica en el sitio de unión para ox-LDL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar, preparar y optimizar la estructura de Lox-1 para los análisis de "virtual screening".
2. Generar una librería de moléculas usando las bases de datos ZINC15.
3. Realizar *Docking* masivo de la proteína Lox-1 con las moléculas seleccionadas y preparadas.

METODOLOGÍA

Preparación de estructura y adecuación para el docking

El primer paso fue la evaluación de las estructuras disponibles para el receptor Lox-1 en el Protein Data Bank. Se utilizó la estructura del receptor humano CTLD Lox-1 (PDB ID:6TL7 obtenida por difracción de rayos X) (72) Previo a su utilización se realizó una minimización energética usando el software MacroModel (Schrödinger 2020, NY) con un gradiente conjugado Polak-Riviere, hasta una convergencia de -52.151 kcal/mol. Además, se adicionaron los hidrógenos correspondientes, formación de puentes disulfuro y el estado de protonación a pH 7 ± 0.2 utilizando Maestro (Schrödinger 2020, NY). Posteriormente se generó una grilla de interacción en la espina básica incluyendo los aminoácidos R229, R231, R248), junto con los residuos Y245, E254, L258, W203, P201 usando la herramienta "Receptor Grid Generation" del software Glide (*Grid-Based Ligand Docking with Energetics*) (Schrödinger 2020, NY). Esta grilla presentaba un volumen cúbico en la superficie de la estructura de 6TL7 (PDB ID),cuyo punto medio fue un centroide creado a partir R229,R231,R248,Y245,E254,L258,W203,P201 las dimensiones fueron $25 \times 35 \times 35 \text{ \AA}^3$ y el centroide $10 \times 20 \times -20 \text{ \AA}^3$.

Esta grilla nos permitir evaluar la capacidad de unión de moléculas pequeñas con el sitio de interacción descrito para ox-LDL en Lox-1, figura 5.

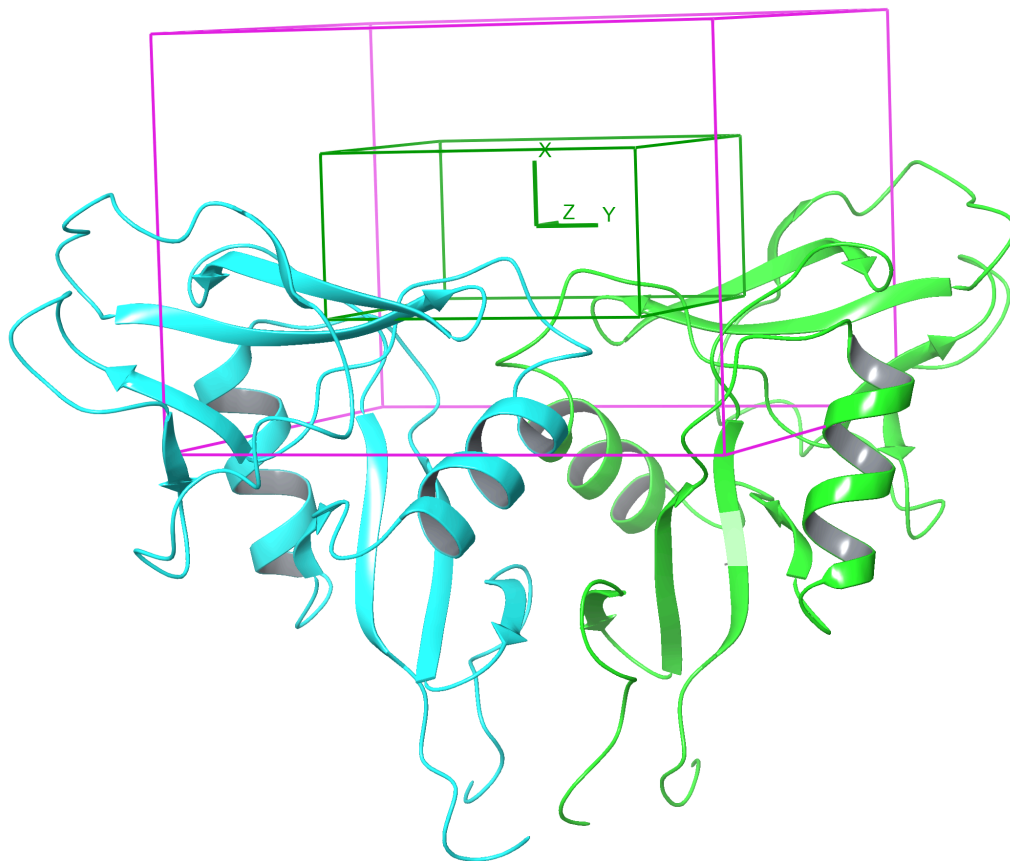


Figura 5. Grilla 6TL7. Grilla de interacción para Lox-1 creada a partir de la estructura PDB ID:6TL7, creada por *Receptor Grid Generation* del software Glide. Caja morada $25 \times 35 \times 35 \text{ \AA}^3$, correspondiente a la grilla. Caja verde de $10 \times 20 \times 20 \text{ \AA}^3$ de centroide.

Generación librería

Se generó una librería de moléculas a partir de los compuestos almacenados en la base de datos ZINC15 (78). Para obtener un archivo que contuviera todas las moléculas de propiedades deseables, en conformaciones minimizadas, con estados de protonación a pH 7. Se descargó el subgrupo de moléculas agrupadas en un subgrupo denominado "in man" el cual contaba con 110.000 moléculas en formato *.sdf. esta librería contiene moléculas que han estado presentes en el cuerpo humano. La librería fue preparada con el software LigPrep versión 2.3 (Schrödinger, LLC, New York, NY), y consideró retener los estados de ionización originales que corresponden a $\text{pH } 7 \pm 2$ y se filtraron aquellas moléculas que no tuvieran ningún grupo guanidino neutro o cargado, ni amino neutro o cargado. El programa también permitió generar múltiples conformaciones para cada

molécula, mediante una búsqueda MCMM (*Monte Carlo Multiple Minimum*) que consiste en introducir cambios al azar en los ángulos diedros de enlaces rotables y minimización de energía, tras lo cual se obtiene una estructura minimizada de cada confórmero. Posteriormente, se determinaron las propiedades de las moléculas de la librería con el programa QikProp versión 3.2. Esta predicción permitió obtener información de una serie de propiedades que tienen relación con la selección de drogas según criterios ADMET (Absorción, distribución, metabolismo excreción y toxicidad son criterios de selección de fármacos), tales como: QPlogBB > -1; RuleOfFive = 0; RuleOfThree = 0; CNS <= 0; metab <= 4. QPlogBB hace referencia al valor predicho para el LogBB o logaritmo del coeficiente de partición cerebro/sangre. RuleOfFive y RuleOfThree indican el número de transgresiones a la regla de cinco de Lipinski y regla de tres de Jorgensen. CNS, es un predictor basado en el LogBB que estima la actividad sobre el sistema nervioso central. #metab, indica el número de grupos funcionales que pudieran ser metabolizados.

Las moléculas ya preparadas se utilizaron para las predicciones de docking proteína-ligando.

Docking proteína – ligando

Para el docking proteína-ligando se utilizaron los archivos obtenidos en la preparación del receptor (*.grd) y la librería de moléculas (*.sdf), usando el software Glide versión 13.4 (Schrödinger 2020, NY). Primero se realizó un docking con la configuración SP del software Glide, donde SP corresponde al algoritmo de docking de precisión media. Se obtuvieron un total de 80212 complejos entre las moléculas y Lox-1. De este primer set de moléculas se seleccionaron las 5000 moléculas con mejor score para realizar un nuevo docking con el algoritmo de alta precisión de Glide (XP), el cual posee una mayor precisión que el anterior, pero tarda más tiempo, dando como resultado una librería de 4783 estructuras rankeadas con nuevo score.

Los 200 mejores complejos generados fueron rankeados según sus docking scores y agrupados para el cálculo de ΔG_{bind} MM-GBSA para predecir la afinidad de cada ligando usando Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY).

Finalmente, se seleccionaron 7 con las afinidades de unión más altas ($\Delta G_{\text{unión}}$) y parámetros favorables predichos (puntuación de acoplamiento, ADME, propiedades similares a fármacos) para futuros estudios funcionales.

$$\Delta G_{\text{union}} = \Delta G_{\text{gas}} - \Delta G_{\text{solv}}^L - \Delta G_{\text{solv}}^P - \Delta G_{\text{solv}}^{LP}$$

Luego se realizó el mismo proceso de docking con el algoritmo de alta precisión de Glide (XP) pero previamente se filtró de acuerdo a los criterios ADMET (masa molecular < 500, Rule5=0, Rule3=0, metab ≤ 4) del cual se obtuvieron 1.815 moléculas de las cuales 228 con mejor docking se les calculó ΔG_{bind} MM-GBSA para predecir la afinidad de cada ligando usando Prime (Schrödinger, LLC, New York, NY).

Para realizar un estudio la interacción químicas entre el receptor y las moléculas candidatas, se realizó un análisis de interacción moléculas (*Ligand interaction*) para las poses obtenidas a través del docking. Utilizando el panel *Ligand Interaction* de Maestro, para esto se consideró la distancia máxima de interacción entre átomos de la proteína con el ligando de 4 Å.

El resumen de la metodología de este trabajo se encuentra en la figura 6.

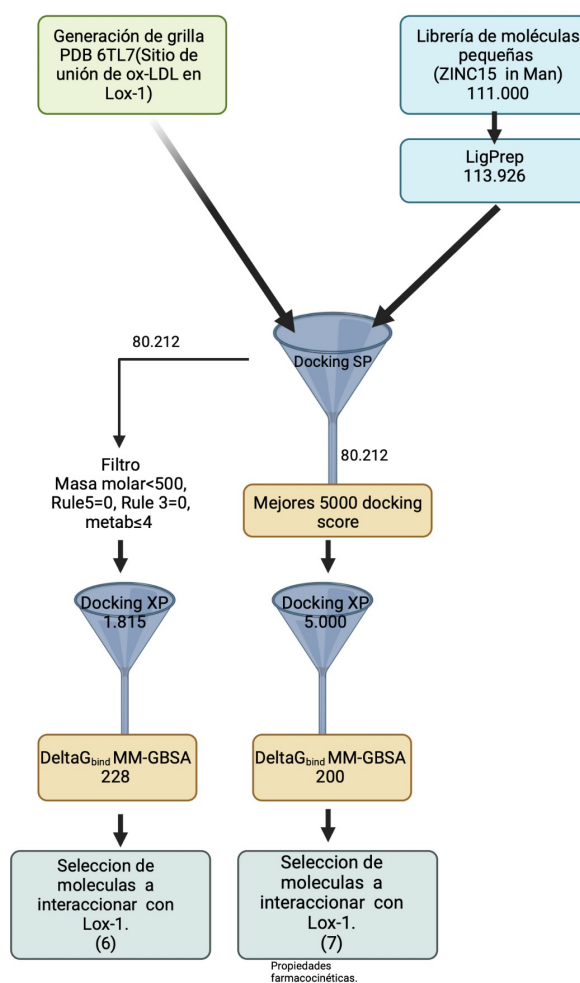


Figura 6. Diagrama de trabajo. Diagrama de flujo que resume la metodología utilizada para el SBVS.

RESULTADOS

Selección de estructura Lox-1

Para preparar la estructura se realizó una búsqueda de las mejores estructuras publicadas en las bases de datos, que presenten los mejores parámetros. Dentro de la totalidad de estructuras publicadas en el Protein Data Bank se seleccionó 6TL7 (Tabla 1) con una resolución de 1.11Å. En esta estructura se identificó y caracterizó la molécula BI-0115, un inhibidor selectivo de Lox-1 que bloquea la captación celular de ox-LDL, el cual fue utilizado como control positivo para las predicciones de docking proteína-ligandos.

ID PDB	AÑO	AUTOR	RESOLUSION Å	R-FREE	R-WORK	CLASHCORE
7R8U	2021	Oganesyan, V., van Dyk, N.	1,9	0,218	0,186	4
6TL9	2020	Nar, H., Fiegen, D., Schnapp, G.	2,7	0,246	0,222	5
6TL7	2020	Nar, H., Fiegen, D., Schnapp, G.	1,11	0,162	0,132	2
6TLA	2020	Nar, H., Fiegen, D., Schnapp, G.	2,16	0,233	0,21	3
1YPQ	2005	Park, H., Adsit, F.G., Boyington, J.C.	1,4	0,192	0,177	8

Tabla 1. Estructuras disponibles en Protein Data Bank. Estructuras candidatas disponible en la base de datos Protein Data Bank para el receptor Lox-1. Se muestran los datos de R-Free, R-Work, Clashcore publicados para cada estructura.

La preparación de Lox-1 se realizó en el Maestro 12.9, y la estructura minimizada se evaluó con los softwares PROSA y Procheck (79), que permite evaluar errores tridimensionales en la estructura de la proteína, y cuyos resultados se presentan en la figura 6. La puntuación z indica la calidad general del modelo, esta se utilizó para comprobar que la puntuación z de la estructura de entrada está dentro del rango de puntuaciones que normalmente se encuentran para proteínas nativas de tamaño similar.

Del análisis obtenido del Procheck el gráfico de *Ramachandran* (ver figura 19 y 20 del anexo), arroja que el 99% de los residuos se encontraban en las regiones más favorables permitidas para la estructura.

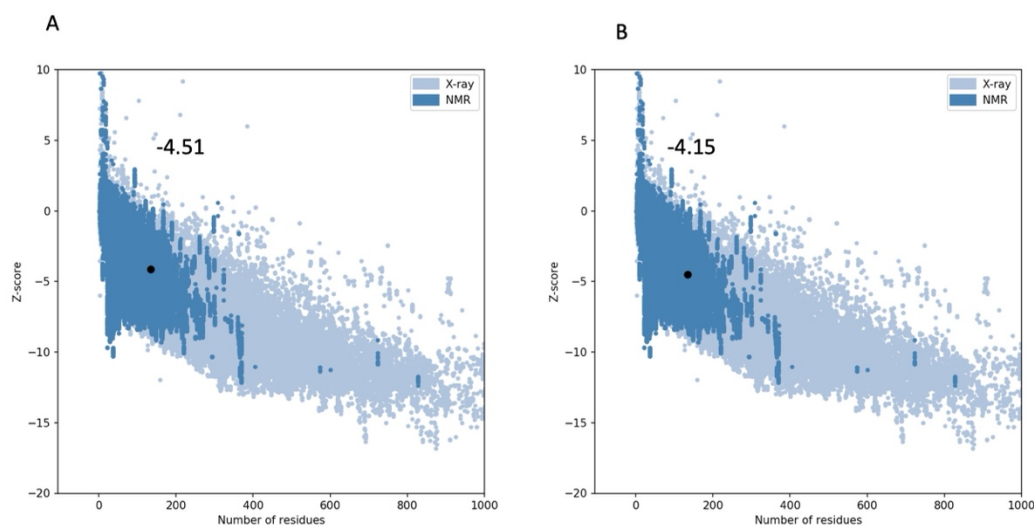


Figura 6. Análisis de estructura 6TL7 por ProSa-web. A: análisis 6TL7 descargado de PDB. B: análisis 6TL7 luego de la minimización energética.

Preparación Librería

Se descargó el subgrupo *In Man* de la base de moléculas ZINC, compuesto por 110.000 moléculas. Esta librería fue procesada con el software LigPrep con lo que se logró obtener distintos conformeros minimizados para cada molécula de la librería alcanzando un total de 113.926 moléculas. A continuación, el software QikProp determinó las propiedades de interés farmacológico y producto de este producto de este análisis se encontró una herramienta para seleccionar moléculas que poseen valores aceptables de permeabilidad y solubilidad. Otro parámetro determinado es la regla de 3 de Jorgensen, que se compone de tres criterios. El primero indica que el logaritmo de la solubilidad debe ser superior a -5, ya que se ha demostrado que valores ideales de solubilidad se encuentran entre -1 y -5. El segundo criterio corresponde a un predictor de transporte no activo como es la permeabilidad aparente en células Caco-2, estas células son un modelo de estudio de la absorción intestinal. Se requiere que la permeabilidad aparente sea superior a los 25 nm/s. El cumplimiento de las 3 reglas de Jorgensen contribuyen a la obtención de moléculas con mejor disponibilidad oral. Toda

la información entregada por QikProp fue analizada al seleccionar las moléculas candidatas.

Screening Virtual

Con la librería y grilla preparada se realizó un docking preliminar con 200 moléculas al azar para evaluar si interactuaban correctamente dentro de las dimensiones de la grilla (Figura 8). Como se observa en la figura, todas las moléculas probadas se mantienen en la superficie de la espina básica y no se observaron moléculas en regiones no deseadas que dieran cuenta de un tamaño incorrecto de la grilla.

Pasada esta evaluación inicial, se realizó el docking masivo usando el algoritmo SP implementados en el software Glide para *screening virtual*. De este docking se obtuvieron 80.212 moléculas alcanzando valores mínimos de docking score de -9,082 y máximos de 10,5972. Del total de moléculas iniciales, el 98% presentó valores favorables para interactuar (docking score menores a 0).

En una segunda etapa, las mejores 5.000 moléculas ranqueadas según su docking score se utilizaron para un segundo docking masivo usando el algoritmo XP, que posee menor rapidez y mayor exhaustividad. De este docking se obtuvieron 4.783 moléculas, (95,7%) de las cuales se seleccionaron las 200 con mejor docking score para calcular su energía libre de unión de estas moléculas a Lox-1.

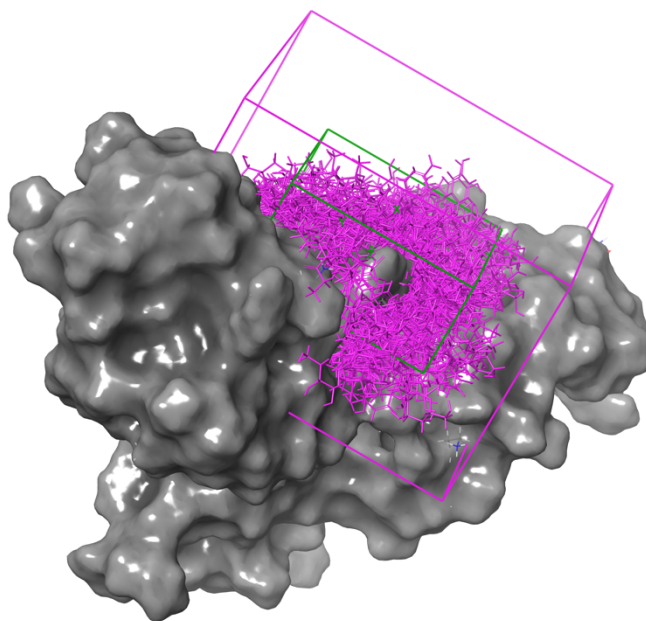


Figura 8. Estructura 6TL7 junto a la grilla y moléculas de librería *In Man* de Zinc15. En gris se representa Lox-1 y en magenta las moléculas de la librería luego del docking de prueba.

Se utilizó la aproximación de MM-GBSA usando el software Prime para determinar la energía libre de unión (ΔG) entre las 200 moléculas pertenecientes a la librería obtenidas del docking con algoritmo XP. Con el ΔG de unión obtenido se creó el gráfico en la figura 9 que muestra la distribución obtenida de las moléculas. A partir del ranking obtenido se seleccionaron 7 moléculas representantes del subconjunto de 200 moléculas que tenían mejor relación, en termino de valores negativos , docking score y ΔG de unión.

En la figura 12 se puede observar la disposición de esta 7 moléculas sobre la superficie del dominio CTLD de 6TL7, se observa en común con estas estructura la presenta de al menos una anillo aromático lo cual le confiere rigidez a dichas estructuras.

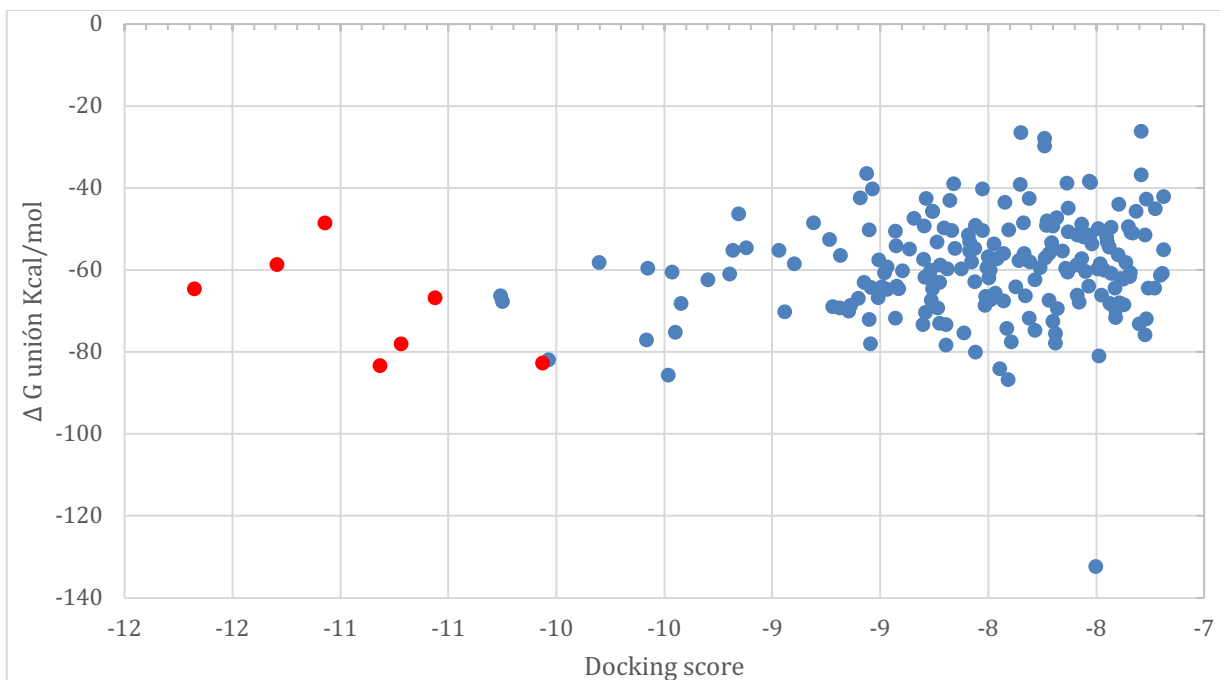


Figura 9. Grafica de correlación entre Puntaje XP y ΔG de unión (kcal/mol) docking con algoritmo XP librería InMan. Se grafico las 200 moléculas mejor rankeadas. Los puntos en rojo corresponden a las 7 mejores moléculas .

Se realizó un docking con las moléculas publicadas el año 2015 por Thakkar et al (12), utilizando la grilla diseñada para la estructura seleccionada para este trabajo, se puede observar la gráfica de los puntaje de docking y ΔG de unión (kcal/mol) de estas moléculas en la figura 10, alcanzado los valores de docking score de -3,22 los valores y los ΔG de unión están entre -30 a -39 Kcal/mol. En la figura 11 se representan las estructuras publicadas por Thakkar et al (12), luego del docking en nuestra grilla.

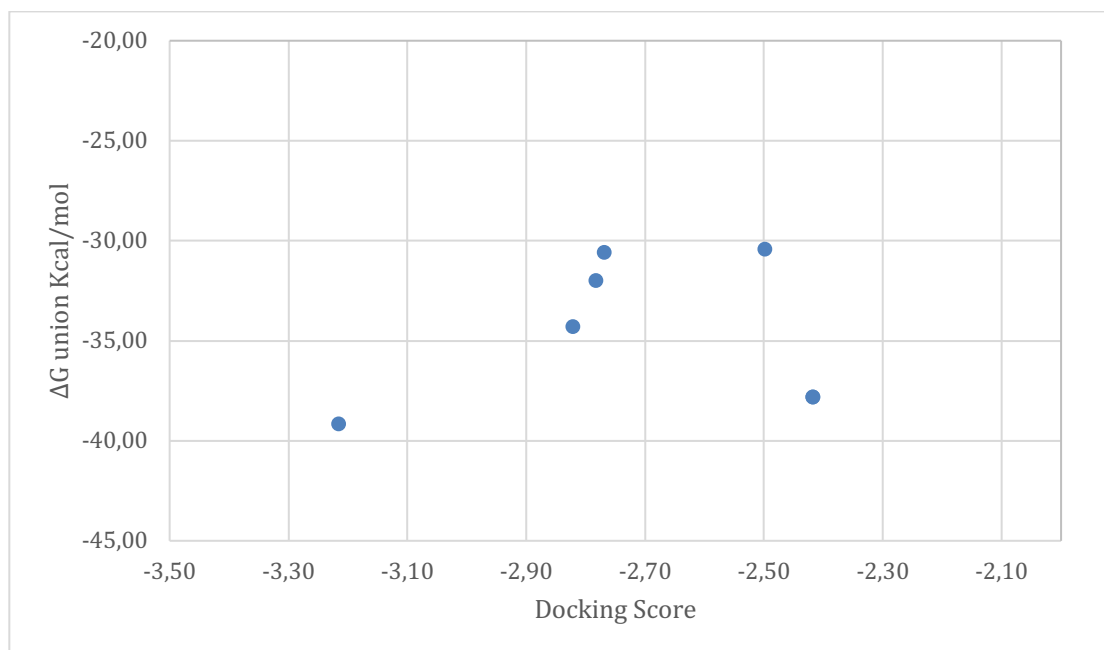


Figura 10. Grafica de correlación entre Puntaje XP y ΔG de unión (kcal/mol) del control. Cálculo del as moléculas de publicadas por Thakkar et al, (12).

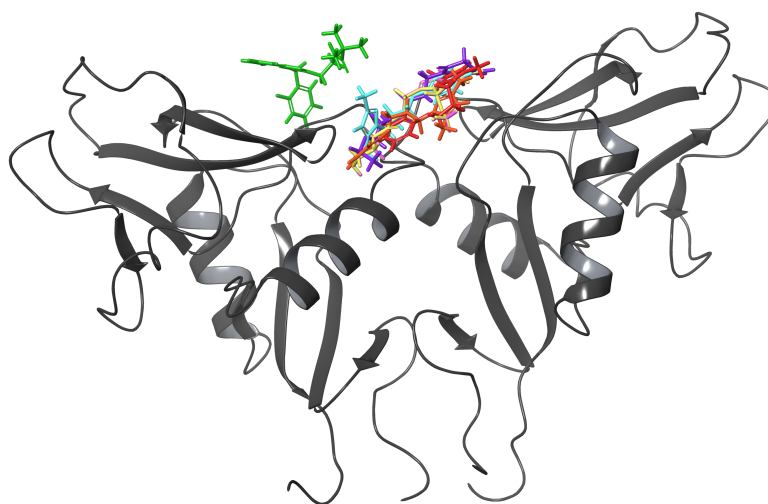


Figura 11. Docking de las 5 moléculas publicadas por Thakkar (12), con grilla generada para 6TL7.

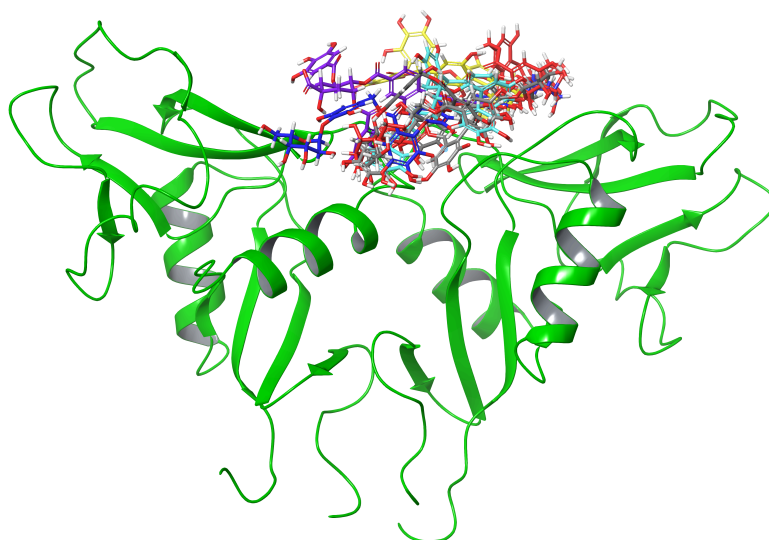


Figura 12. Moléculas seleccionadas. Posición de las 7 mejores moléculas seleccionadas sobre la superficie del dominio CTLD de Lox-1.

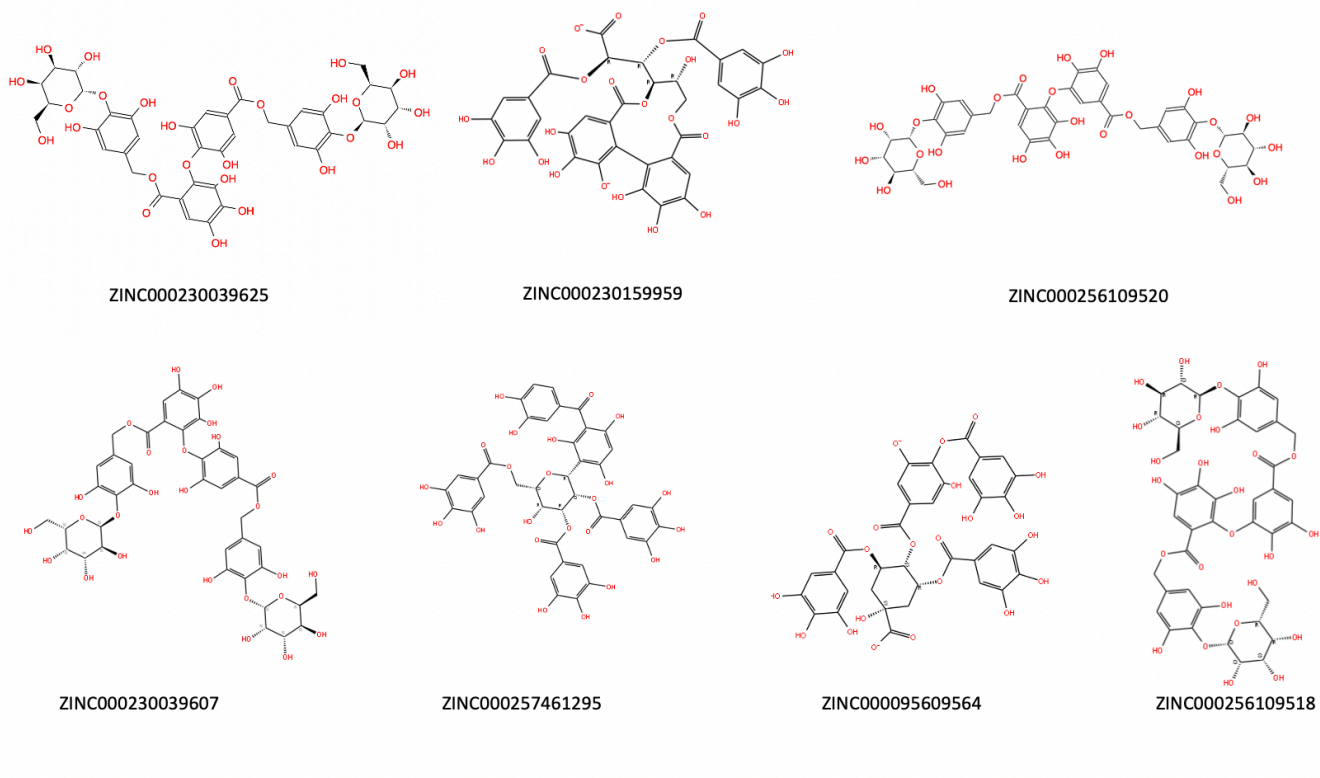


Figura 13. Vista 2D de 7 moléculas seleccionadas. Representación de las 7 mejores moléculas que interactúan con Lox-1.

En la figura 13 es posible ver la estructuras en 2D de las 7 moléculas seleccionadas. La Tabla 2 muestra las propiedades predichas mediante QikProp, donde destacan valores apropiados de ΔG de unión y los parámetros de interés farmacológicos para estas.

ID	Molécula	MMGBSA dG Bind	docking score	#rtvFG	CNS	mol MW
ZINC000230039625	mol1	-64.64	-11.675	4	-2	938.756
ZINC000230159959	mol2	-58.67	-11.293	4	-2	802.566
ZINC000256109520	mol3	-48.51	-11.073	4	-2	938.756
ZINC000230039607	mol4	-83.37	-10.817	4	-2	938.756
ZINC000257461295	mol5	-78.02	-10.719	3	-2	880.679
ZINC000095609564	mol6	-66.83	-10.562	4	-2	800.593
ZINC000256109518	mol7	-82.65	-10.063	4	-2	938.756

ID	Molécula	QPlogPo/w	QPlogS	QPlogHERG	QPPCaco	QPlogBB
ZINC000230039625	mol1	-4.763	-0.966	-6.557	0.007	-9.051
ZINC000230159959	mol2	-3.308	-3.529	-4.911	0.000	-9.998
ZINC000256109520	mol3	-5.139	-2.934	-7.945	0.001	-12.609
ZINC000230039607	mol4	-4.691	0.136	-5.196	0.016	-7.316
ZINC000257461295	mol5	-1.768	-5.230	-7.987	0.000	-11.317
ZINC000095609564	mol6	-2.039	-4.544	-5.642	0.000	-10.371
ZINC000256109518	mol7	-4.750	-0.471	-5.852	0.006	-8.468

ID	Molécula	QPPMDCK	QPlogKhsa	HOA	RuleOfFive	RuleOfThree
ZINC000230039625	mol1	0.001	-2.406	1	3	2
ZINC000230159959	mol2	0.000	-1.512	1	3	2
ZINC000256109520	mol3	0.000	-2.598	1	3	2
ZINC000230039607	mol4	0.003	-2.113	1	3	2
ZINC000257461295	mol5	0.000	-0.930	1	3	2
ZINC000095609564	mol6	0.000	-1.243	1	3	2
ZINC000256109518	mol7	0.001	-2.223	1	3	2

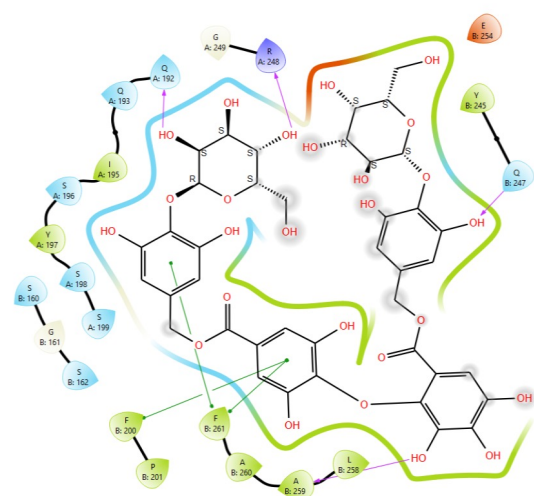
Tabla 2. Propiedades ADMET de moléculas candidatas. Propiedades determinadas mediante QikProp, Glide y Prime para las 7 mejores moléculas candidatas que interaccionana con Lox-1 post docking con algoritmo XP. **#rtvFG**: Número de grupos reactivos. **CNS**: Posible actividad en el SNC (baja=(-2); alta=(2)). **Masa molar**: masa molar de la molécula (g/mol). **QPlog Po/w**: Predicción del coeficiente de partición

octanol/agua. **QPPCaco**: Predicción de la permeabilidad en células Caco-2 (<25 pobre; >500 bueno). **QPlogBB**: Predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre. **QPPMDCK**: Predicción de permeabilidad en células MDCK (<25 pobre; >500 bueno). **#metab**: Número de grupos que pudieran ser metabolizados (1-8). **QPlogKhsa**: Predicción de la unión a seroalbumina humana (-1.5 – 1.5). **HOA**: Absorción oral humana (1=baja; 2=media; 3=alta). **Regla de cinco**: Transgresiones a la regla de 5 de Lipinski. **Regla de tres**: Transgresiones a la regla de 3 de Jorgensen. **XP**: Puntaje del docking mediante XP. **MM-GBSA ΔG unión**: ΔG energía libre de unión (kcal/mol).

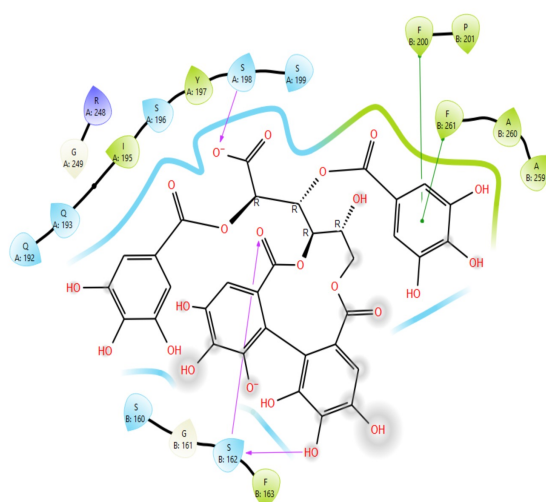
Las principales interacciones entre las moléculas y el receptor muestran una sección de la cavidad más hidrofóbica (región verde) y otra más hidrofílica (región celeste), donde se observa la presencia de puentes hidrógenos entre serinas 198,162,199, 160 y arginina 248 con las moléculas candidatas. Además, entre los residuos con cadenas laterales aromáticas como fenilalanina presenta interacción de tipo π - π stacking con los anillos aromáticos de las moléculas candidatas, principalmente P261. (Figura 14). Se detectaron además la formación de enlaces salinos que involucran al aminoácido R231 en la molécula 6. Se observan puente hidrógenos que involucran los residuos de glutamina 192 y 247.

Las interacciones más relevantes parecen ser los puentes hidrógenos que involucra los residuos R248, S162 y de tipo π - π stacking que involucran los residuos F200, F261.

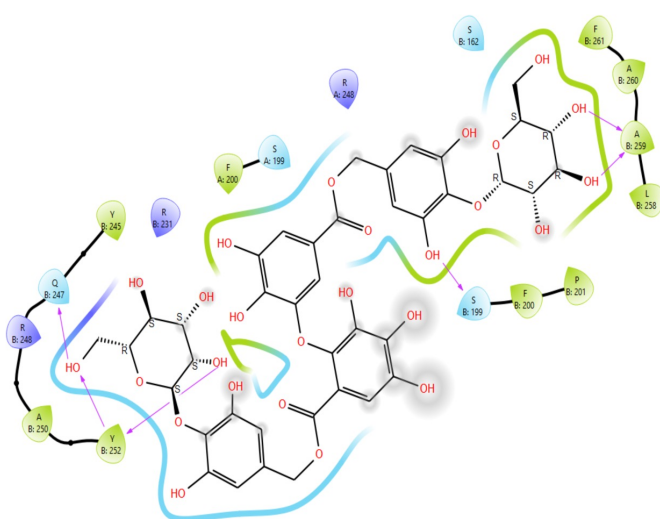
Molécula 1



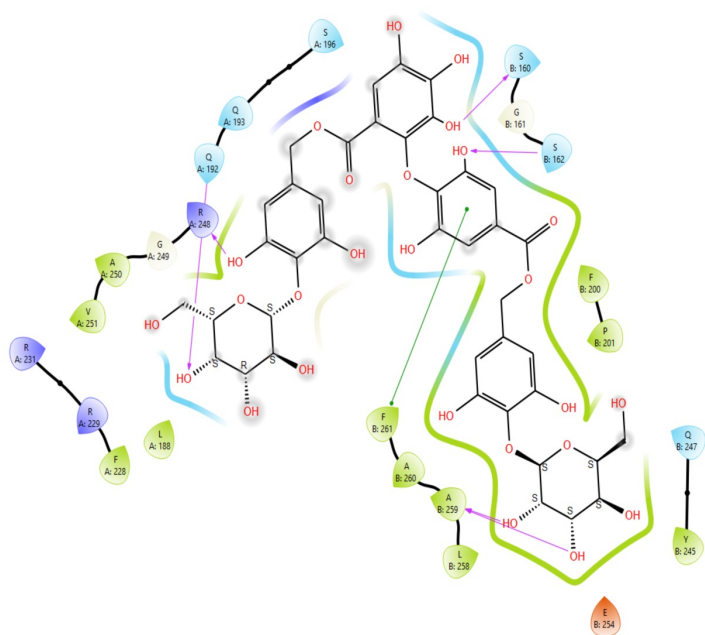
Molécula 2



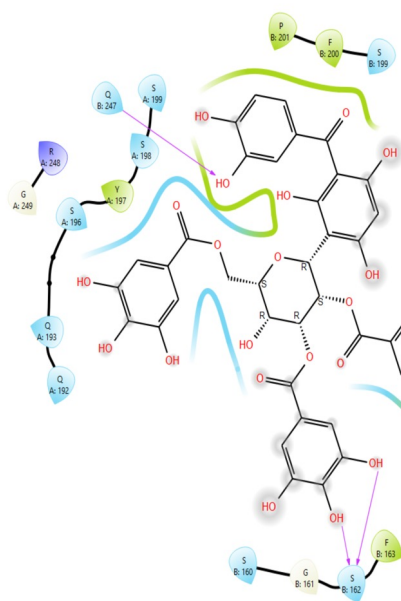
Molécula 3



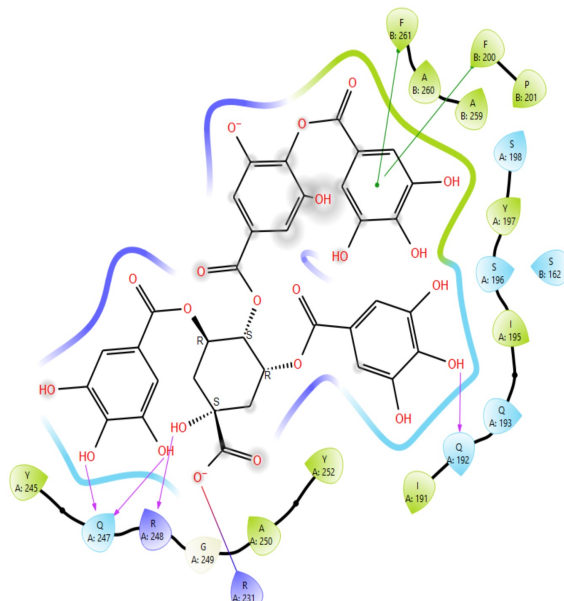
Molécula 4



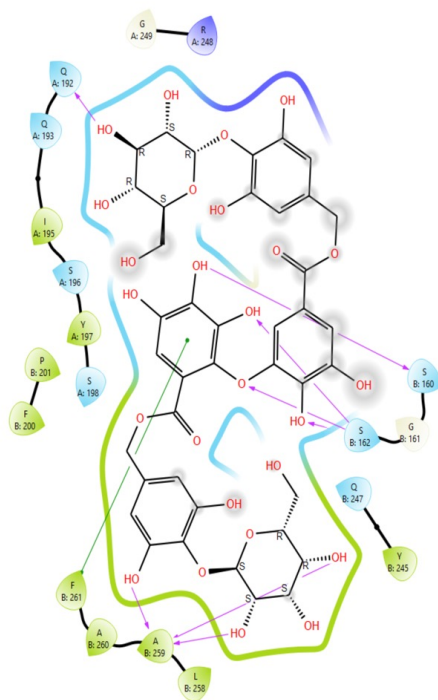
Molécula 5



Molécula 6



Molécula 7



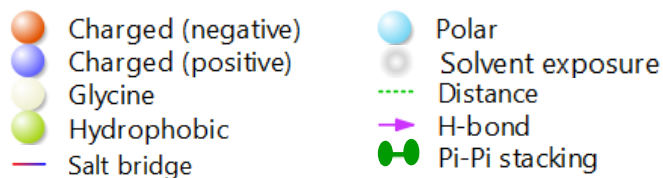


Figura 14. Interacciones específicas de las 7 moléculas candidatas. Las moléculas con mejor predicción para interaccionar con Lox-1. Los residuos cargados negativamente se indican en rojo, los residuos polares están en calipso (sitio activo). Los residuos hidrofóbicos se muestran en verde, se presentan interacciones de hidrógeno (enlaces H) como flechas rosas/púrpuras, el apilamiento pi-pi se muestra como una línea verde.

Luego se filtraron las moléculas obtenidas del *docking* realizado con el algoritmo SP según lo descrito en la metodología, obteniéndose 1.815 moléculas a las cuales se le realizó un docking XP a las moléculas con docking score menor a -4 un total de 228, se les calculó ΔG de unión utilizando la aproximación de MM-GBSA del software Prime. En la figura 15 se observa la gráfica el ΔG de unión obtenido de las 228 moléculas junto con los valores de docking score. A partir de la distribución se rankearon las moléculas lo cual permitió seleccionar 6 moléculas representantes del subconjunto de 228 moléculas que tenían mejor relación, en términos de valores negativos, docking score y ΔG de unión.

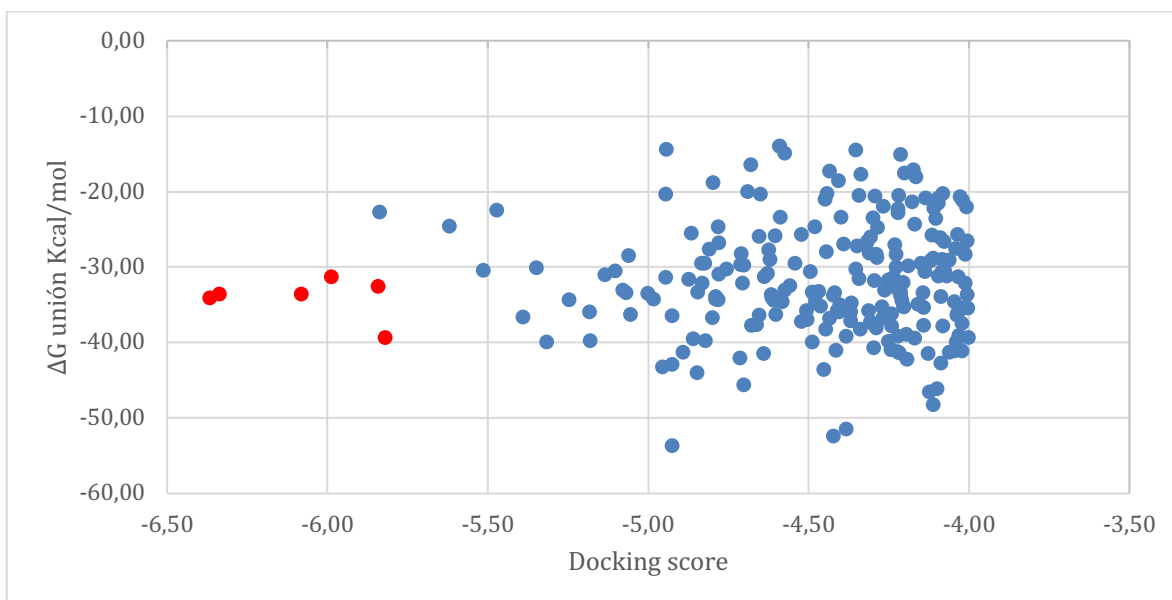
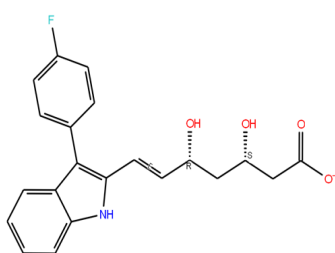
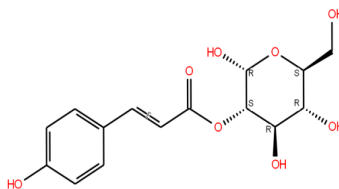


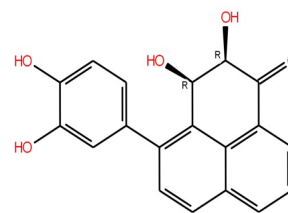
Figura 15. Grafica de correlación entre Puntaje XP y ΔG de unión (kcal/mol) docking con algoritmo XP luego del filtro. Se muestran las 228 moléculas mejor rankeadas luego de los filtros ADME. Los puntos en rojo corresponden a las 6 mejores moléculas .



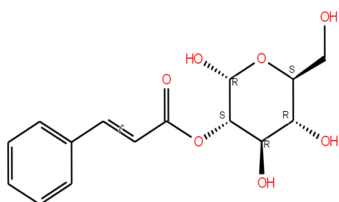
ZINC000095617673



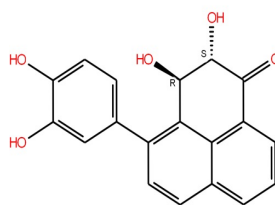
ZINC000257533585



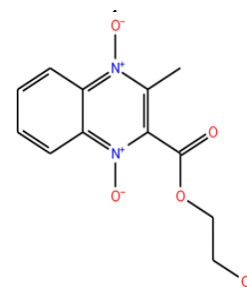
ZINC00010082502



ZINC000257514345



ZINC000013462473



ZINC000004217520

Figura 16. Vista 2D de las 6 mejores moléculas que interaccionan con Lox-1, post docking con algoritmo XP luego del filtro aplicado (Masa molar<500, Rule5=0, Rule 3=0, metab≤4).

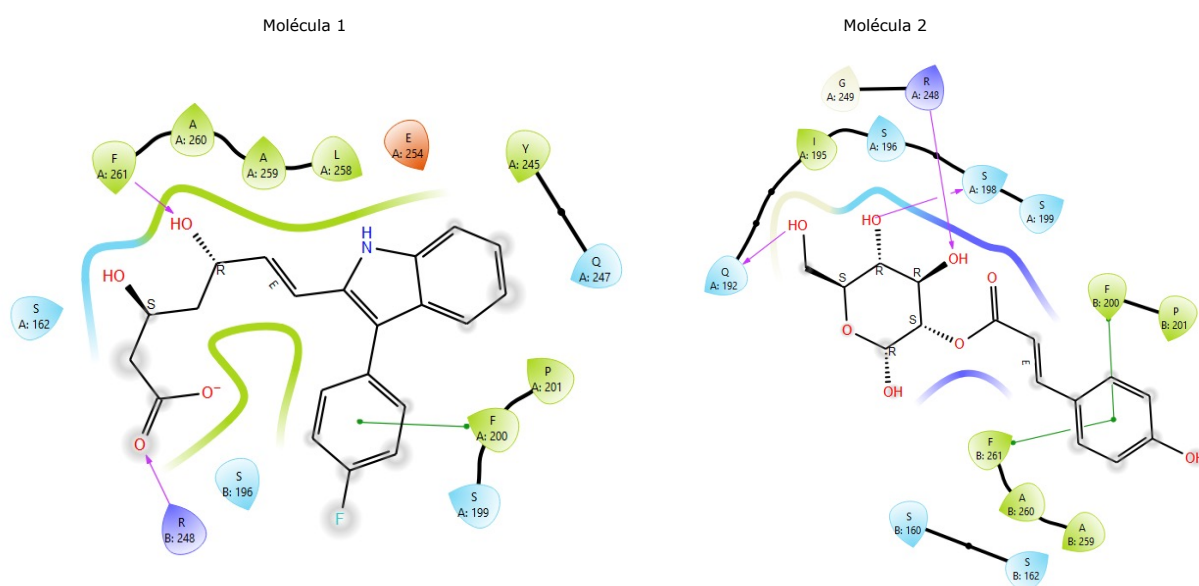
Las 6 moléculas seleccionadas se representan en la figura 16. La Tabla 3 muestra las propiedades predichas mediante QikProp, donde destacan valores apropiados de ΔG de unión y los parámetros de interés farmacológicos para estas.

ID	Molécula	MMGBSA dG Bind	docking score	#rtvFG	CNS	mol MW
ZINC000095617673	mol1	-39,34	-5,82	0	-2	369.392
ZINC000257533585	mol2	-34,08	-6,37	2	-2	326.302
ZINC000100825024	mol3	-33,61	-6,08	0	-2	322.317
ZINC000257514345	mol4	-33,55	-6,34	2	-2	310.303
ZINC000013462473	mol5	-32,59	-5,84	0	-2	322.317
ZINC000004217520	mol6	-31,24	-5,99	1	-2	264.237

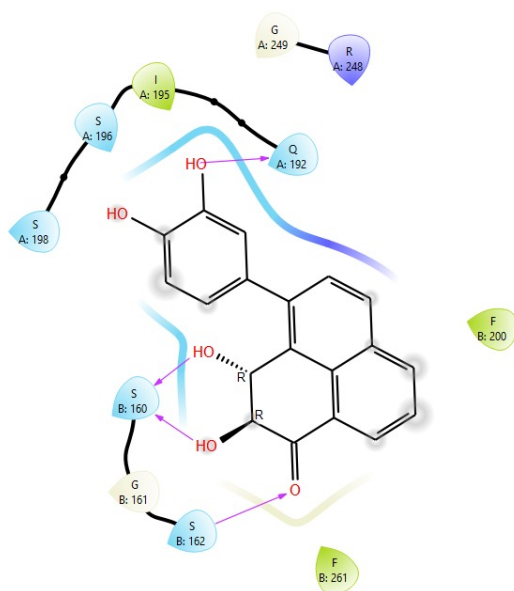
ID	Molécula	QPlogPo/w	QPlogS	CIQPlogS	QPlogHERG	QPPCaco	QPlogBB
ZINC000095617673	mol1	4.191	-5.492	-5.664	-4.537	43.262	-1.746
ZINC000257533585	mol2	-0.852	-2.104	-2.041	-5.260	32.579	-2.612
ZINC000100825024	mol3	0.864	-3.003	-3.953	-5.200	81.114	-1.721
ZINC000257514345	mol4	-0.188	-2.196	-2.024	-5.378	107.333	-1.991
ZINC000013462473	mol5	0.904	-2.879	-3.953	-4.962	90.185	-1.618
ZINC000004217520	mol6	1.215	-2.853	-2.963	-4.792	248.287	-1.228

ID	Molécula	QPPMDCK	QPlogKhsa	HOA	RuleOfFive	RuleOfThree
ZINC000095617673	mol1	38.112	0.279	3	0	0
ZINC000257533585	mol2	12.218	-0.977	2	0	0
ZINC000100825024	mol3	32.750	-0.326	3	0	0
ZINC000257514345	mol4	44.329	-0.889	3	0	0
ZINC000013462473	mol5	36.726	-0.311	3	0	0
ZINC000004217520	mol6	109.741	-0.345	3	0	0

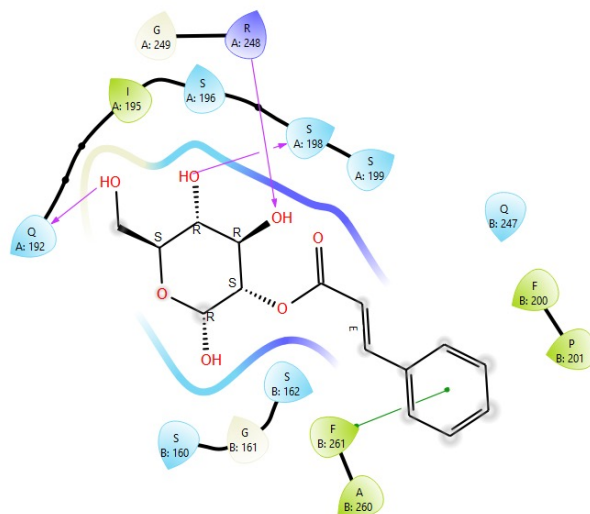
Tabla 3. Propiedades ADMET de las 6 moléculas obtenidas. Fueron determinadas mediante QikProp, Glide y Prime para las 6 mejores moléculas candidatas que interaccionan con Lox-1 post docking con algoritmo XP luego del filtro aplicado (Masa molar<500, Rule5=0, Rule 3=0, metab≤4). **#rtvFG**: Número de grupos reactivos. **CNS**: Posible actividad en el SNC (baja=(-2); alta=(2)). **Masa molar**: masa molar de la molécula (g/mol). **QPlog Po/w**: Predicción del coeficiente de partición octanol/agua. **QPPCaco**: Predicción de la permeabilidad en células Caco-2 (<25 pobre; >500 bueno). **QPlogBB**: Predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre. **QPPMDCK**: Predicción de permeabilidad en células MDCK (<25 pobre; >500 bueno). **#metab**: Número de grupos que pudieran ser metabolizados (1-8). **QPlogKhsa**: Predicción de la unión a seroalbumina humana (-1.5 – 1.5). **HOA**: Absorción oral humana (1=baja; 2=media; 3=alta). **Regla de cinco**: Transgresiones a la regla de 5 de Lipinski. **Regla de tres**: Transgresiones a la regla de 3 de Jorgensen. **XP**: Puntaje del docking mediante XP. **MM-GBSA ΔG unión**: ΔG energía libre de unión (kcal/mol).



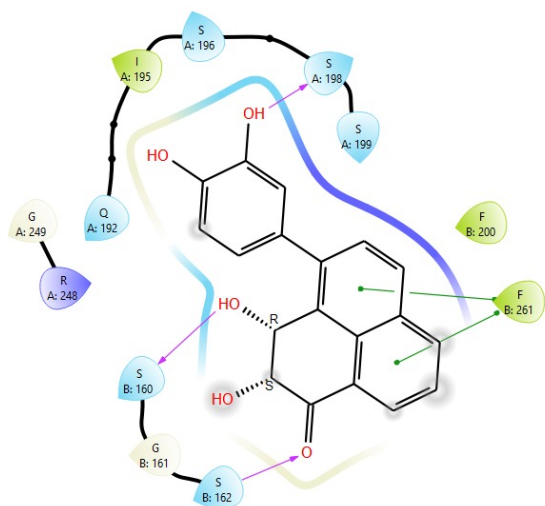
Molécula 3



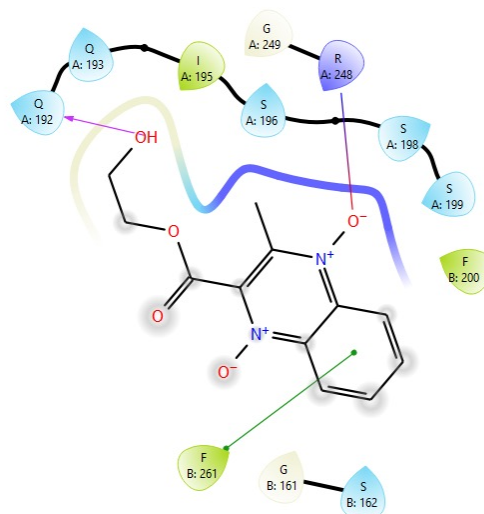
Molécula 4



Molécula 5



Molécula 6



● Charged (negative)
● Charged (positive)
● Glycine
● Hydrophobic
— Salt bridge

● Polar
● Solvent exposure
--- Distance
→ H-bond
⌢ Pi-Pi stacking

Figura 17. Interacciones específicas de las 6 moléculas con mejor predicción para interaccionar con Lox-1; post docking con algoritmo XP luego del filtro aplicado (Masa molar<500, Rule5=0, Rule 3=0, metab<=4). Los residuos cargados negativamente se indican en rojo, los residuos polares están en calipso, sitio activo. Los residuos hidrofóbicos se muestran en verde, se presentan interacciones de hidrógeno (enlaces H) como flechas rosas/púrpuras, el apilamiento pi-pi se muestra como una línea verde.

Las principales interacciones entre las moléculas y el receptor están representadas en la figura 17, muestran una sección de la cavidad con carga positiva donde se observa la presencia de puentes hidrógenos entre serinas 198, 162, 199, 160, glutamato 192 y arginina 248 con las moléculas seleccionadas. Además entre los residuos con cadenas laterales aromáticas como fenilalanina presenta interacción de tipo π - π stacking con los anillos aromáticos de las moléculas candidatas, principalmente fenilalanina 261 y 200. (Figura 16). Se detectó además la formación de un enlace salino que involucran al aminoácido R248 con la molécula 6.

Las interacciones más relevantes observadas parecen ser los puentes hidrógenos que involucra los residuos R248, S162, S160 y de tipo π - π stacking que involucran los residuos F200, F261.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio progresivo, el cual comienza con la aterogénesis, etapa cumple un rol fundamental el receptor Lox-1. La internalización de oxLDL en estadios tempranos promueve la disfunción endotelial. En estadios intermedios esta interacción se ha descrito que promueve la proliferación y migración de células musculares lisas que posteriormente van a migrar a la íntima del vaso, luego se generará la formación de células espuma y en etapas más tardías de la aterosclerosis hay apoptosis y la generación de un core necrótico. Este rol tan importante de Lox-1 sugiere que bloquearlo podría ser una idea muy atractiva para tratar la aterosclerosis y otras patologías que estén asociada a la internalización de ox-LDL.

Dada la estructura de este receptor la principal estrategia ha sido buscar moléculas que bloqueen el túnel hidrofóbico de Lox-1 (12,59), pero existe evidencia del importante rol que cumple la espina de aminoácidos básicos ubicados en la superficie del receptor, y cómo la disposición tridimensional de estos residuos provee la estructura apropiada para interaccionar con las cargas negativas de las hélices anfipáticas de la apoB 100 asociada la lipoproteínas de baja densidad (53). Recientemente, se ha demostrado que la molécula BI-0115 genera interacciones entre las interfaces del receptor formando un tetramero que impediría la unión de ox-LDL, dando fuerza a la hipótesis que el bloqueo de este receptor en su superficie y no en el bolsillo hidrofóbico como se realizó previamente (12,80), podría ser una nueva estrategia.

En la búsqueda de moléculas con potencial de unirse a Lox-1 la estrategia utilizada fue realizar un screening virtual utilizando la mejor estructura disponible en la base de datos (Tabla 1), la cual presenta parámetros adecuados y no requería de mayor procesamiento y/o refinamiento. La estructura seleccionada fue PDB ID:6TL7, correspondiente a la región CTLD de Lox-1. Al inicio se preparó la proteína, ya que las estructuras tridimensionales deben ser optimizadas, utilizando el módulo Protein Preparation Wizard de Maestro (81). Las estructuras cristalinas de proteínas se preparan antes del docking para agregar átomos de hidrógeno, optimizar los enlaces de hidrógeno, eliminar los choques atómicos y realizar otras operaciones que no forman parte del proceso de refinamiento de la estructura cristalina de rayos X. Luego de la preparación y minimización energética de la estructura (Figura 6) se diseñó la grilla de interacción.

Para el diseño de la grilla la estrategia utilizada fue en base a residuos que conforman la espina básica, pero se ha descrito que existe otros sitios importante de interacción en la región CTLD de Lox-1. En el trabajo de Tomar et al, se describen dos sitios susceptibles a interaccionar con fármacos en el dímero CTLD hLox-1 mediante el método *Mix solvent MD simulation* y luego *virtual screening* (82), aquí se describen dos sitios con eventos de alta afinidad, uno en el túnel hidrofóbico y el otro ubicado entre los residuos Y245,E254,L258,W203,P201. Basados en esta información, se generó una grilla rectangular muy amplia en la superficie de CTLD (Figura 7), que será incluida para el docking, por lo tanto cubre un gran área y se permitió la interacción con moléculas de gran tamaño (Figura 14), a través de puentes hidrógenos que involucra los residuos R248, S162 y de tipo π - π stacking que involucran los residuos F200, F261 los que pueden contribuir a la estabilidad de la unión del ligando.

Además, de realizar un docking control con un número reducido de moléculas como se ve en la figura 8 , para evaluar que realmente convergieran en el sector de la grilla, se realizó un docking de control con las moléculas estudiadas por Thakar et al, pero con nuestra estructura y grilla (Figura 11). Se puede observar cómo se disponen en la parte central de CTLD de Lox-1 hacia el túnel hidrofóbico, posición muy distinta a la descrita por los autores ya que ellos buscaban interacción con el túnel hidrofóbico. En la figura 10 se observa que estas moléculas poseen un docking score mucho mayor al obtenidos por la moléculas mejor rankeadas de la librería utilizada para este estudio. Este análisis permitió tener como control de ΔG de unión comparativo de moléculas descritas como inhibidoras de acuerdo a los resultados obtenidos por Thakkar et al, de acuerdo a los valores para las 7 mejores moléculas seleccionadas de la librería *In Man*, los cuales se encuentran en el rango de -48,51 a -83, 37 Kcal/mol (tabla 2), estas estructuras poseen ΔG de unión mucho más favorables y por lo tanto la hipótesis de que estas se podrán unir efectivamente mediante interacciones fuertes a Lox-1 se fortalece.

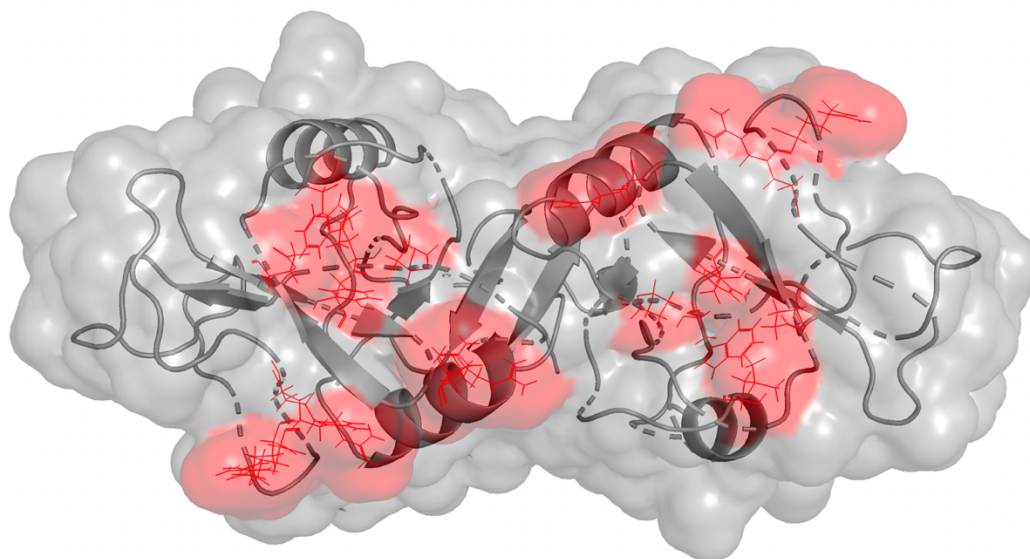


Figura 18. Región de la superficie seleccionada para generar grilla en 6TL7. En rojo residuos para determinar grilla.

Los resultados obtenidos utilizando Glide de la suite de Schrödinger (Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021), permitió obtener 7 moléculas (figura 13), candidatas a tener una interacción favorecida energéticamente con Lox-1, que fueron las cuales presentaron mejor relación de ΔG de unión y docking score; los mejores 200 docking score presentaron ΔG de unión menores -25 Kcal/mol lo que quiere decir que a pesar de ser 7 las mejores rankeadas hay muchas moléculas que posiblemente presenten interacción con Lox -1, y adicionalmente estas moléculas poseen propiedades útiles en el desarrollo farmacológico como absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET).

Las propiedades de estas moléculas están resumidas en la Tabla 2, el peso molecular de esta moléculas es elevado ya que se trata de moléculas de gran dimensión básicamente por el tamaño de la grilla seleccionada para realizar el docking.

Para analizar las interacciones se utilizó el *módulo Ligand interaction diagram* incorporado en el software Maestro. El *módulo* fue configurado para identificar los residuos que se encuentran en un radio de 4,0 Å de los átomos del ligando, los resultados

pueden ser observados en la figura 14. Se encontró la presencia principalmente de interacciones hidrofóbicas al igual que en el trabajo de Schnapp, existe interacción con el residuo R248 de la espina básica en todas las moléculas candidatas, con todas las moléculas se ven interacciones de tipo π - π stacking con residuos F200 y F261. El residuo Q247 posee interacciones de tipo puente hidrogeno en todas las moléculas candidatas, al igual como se observó con el inhibidor BI-0115 publicado el 2020 (72). En este trabajo se comprobó que la unión de esta molécula BI-0115 desencadena la inhibición del receptor mediante la formación de dímeros del dominio de unión del ligando homodimérico; donde se describe la participación en la interacción de los mismos residuos que nuestras moléculas candidatas lo que nos hace presumir que el efecto podría ser similar. En este trabajo ellos concluyen que el complejo tetramérico impide que las ox-LDL se unan al receptor mediante el bloqueo estérico de la interacción de este con la columna básica, ya que ven como el cambio conformacional que desestabiliza la espina impide esta unión, dándole un rol más importante que el túnel hidrofóbico.

Al realizar la selección de acuerdo al ranking del valor del docking score obtenido del docking SP, los mejores valores de score lo obtuvieron moléculas de gran tamaño impidiendo cumplir con los criterios ADME apropiados para el diseño de *drug like*. Las moléculas con peso molecular >500 Kda (50,4 % de la librería); invisibilizó a moléculas con propiedades farmacocinéticas más apropiadas, pero permitió establecer patrones de interacción relevantes entre las mejores moléculas ranqueadas. Por lo tanto se filtraron las moléculas resultantes del docking SP seleccionando aquellas que cumplieran los siguientes criterios: masa molar <500, Rule5=0, Rule 3=0, metab $\leq$ 4. Este filtro permitió realizar docking XP a 1.815 moléculas de las cuales 228 obtuvieron un docking score <-4. La mejor relación entre energía de unión y docking score permitió seleccionar 6 moléculas (figura 15, 16), al igual que en la selección previa destacan los anillos aromáticos en la estructura de estas. Las 6 moléculas alcanzaron los valores de docking score de -6,37 y valores ΔG de unión están entre -31,24 a -39,34 Kcal/mol. Las principales interacciones analizadas con el *módulo Ligand interaction diagram* incorporado en el software Maestro entre las moléculas y los residuos de Lox-1 (figura 17), muestran la participación de los mismos obtenidos en el docking anterior, lo que quiere decir que a pesar de no tener puntajes tan negativos de docking interaccionan con los mismos residuos ya descritos como los más importantes. Por lo tanto los residuos R248, S162, S160 F200 y F261 son los más importantes para generar interacciones favorecidas energéticamente.

Tanto las moléculas seleccionadas en el docking sin realizar filtros como en el segundo docking con los filtros estas se disponen e interaccionan con los residuos seleccionados para el diseño de la grilla (ver figura 21 y 22 del anexo).

Finalmente con estas moléculas guías podrán servir para generar el diseño de un fármaco con la capacidad de interaccionar con Lox-1 e inhibir la captación de ox-LDL. Con este último filtro se espera poder realizar ensayos de inhibición en un modelo ya probado de células H4-II-E-C3 para luego escalarlo a un modelo animal en el Departamento de Bioquímica clínica e inmunóloga de la Universidad de Concepción.

CONCLUSIONES

1. El uso de las herramientas *in silico* de "SBVS" permite identificar nuevas moléculas que se unan a la espina básica de Lox-1.
2. Las moléculas candidatas presenta parámetros energéticos muy favorables para predecir la unión al receptor.
3. Los residuos que participan en la interacción de las moléculas candidatas a interaccionar con Lox-1, son los mismos que las presente en otros inhibidores descritos para este receptor.
4. Estas moléculas serán evaluadas mediante estudios *in vitro* para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo, evaluando la capacidad inhibitoria del receptor Lox-1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. Vol. 209, *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press; 2015. p. 13–22.
2. Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. Vol. 185, *Cell*. Elsevier B.V.; 2022. p. 1630–45.
3. Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2009 Oct;62(10):1161–78.
4. Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. Vol. 27, *Seminars in Immunology*. Academic Press; 2015. p. 184–93.
5. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: A triumph of simplicity. Vol. 27, *Current Opinion in Lipidology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 473–83.
6. Mak A, Kow NY. Imbalance between endothelial damage and repair: A gateway to cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. Vol. 2014, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
7. Moccia F, Tanzi F, Munaron L. Endothelial Remodelling and Intracellular Calcium Machinery. *Curr Mol Med*. 2014 May 8;14(4):457–80.
8. ross1976.
9. Spaans F, Quon A, Rowe SR, Morton JS, Kirschenman R, Sawamura T, et al. Alterations in vascular function by syncytiotrophoblast extracellular vesicles via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in mouse uterine arteries. *Clin Sci*. 2018 Nov 1;132(21):2369–81.
10. Carvajal Carvajal C. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA LDL OXIDADA Y LA ATHEROSCLEROSIS. 2015;32(1).
11. Pharmacology A, Buckley C, Bund3 SJ, Mctaggart4 F, Bruckdorfer2 KR, Oldham4 A, et al. endothelium-dependent relaxations in Oxidized low-density lipoproteins inhibit isolated large and small rabbit coronary arteries. Vol. 16, *Journal*. 1996.
12. Thakkar S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Gokulan K, Mehta JL, et al. Structure-based Design Targeted at LOX-1, a Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Sci Rep*. 2015 Nov 18;5.

13. Park KH, Park WJ. Endothelial dysfunction: Clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. Vol. 30, Journal of Korean Medical Science. Korean Academy of Medical Science; 2015. p. 1213–25.
14. Chen J, Mehta JL, Haider N, Zhang X, Narula J, Li D. Role of Caspases in Ox-LDL-Induced Apoptotic Cascade in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Circ Res*. 2004 Feb 20;94(3):370–6.
15. Searle A, Gómez-Rosso L, Meroño T, Salomon C, Durán-Sandoval D, Giunta G, et al. High LDL levels are associated with increased lipoprotein-associated phospholipase A2 activity on nitric oxide synthesis and reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Clin Biochem*. 2011 Feb;44(2–3):171–7.
16. Ryoo S, Bhunia A, Chang F, Shoukas A, Berkowitz DE, Romer LH. OxLDL-dependent activation of arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling. *Atherosclerosis*. 2011 Feb;214(2):279–87.
17. Wong WT, Ng CH, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY. Relative contribution of individual oxidized components in ox-LDL to inhibition on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011;21(3):157–64.
18. Yamamoto S, Zhong J, Yancey PG, Zuo Y, Linton MF, Fazio S, et al. Atherosclerosis following renal injury is ameliorated by pioglitazone and losartan via macrophage phenotype. *Atherosclerosis*. 2015 Sep 1;242(1):56–64.
19. Yan FX, Li HM, Li SX, He SH, Dai WP, Li Y, et al. The oxidized phospholipid POVPC impairs endothelial function and vasodilation via uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol*. 2017 Nov 1;112:40–8.
20. Li J, Liang X, Wang Y, Xu Z, Li G. Investigation of highly expressed PCSK9 in atherosclerotic plaques and ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis. *Mol Med Rep*. 2017 Aug 1;16(2):1817–25.
21. Chen L, Qin L, Liu X, Meng X. CTRP3 Alleviates Ox-LDL-Induced Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction in Mouse Aortic Endothelial Cells by Activating the PI3K/Akt/eNOS Pathway. *Inflammation*. 2019 Aug 15;42(4):1350–9.
22. Chen X ping, Xun K li, Wu Q, Zhang T tai, Shi J shan, Du G hua. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species. *Vascul Pharmacol*. 2007 Jul;47(1):1–9.

23. Dieudonné A, Torres D, Blanchard S, Taront S, Jeannin P, Delneste Y, et al. Scavenger receptors in human airway epithelial cells: Role in response to double-stranded RNA. *PLoS One*. 2012 Aug 7;7(8).
24. Xu S, Liu Z, Huang Y, Le K, Tang F, Huang H, et al. Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by reducing intracellular superoxide radical generation and NF- κ B activation. *Translational Research*. 2012;160(2):114–24.
25. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko A v., Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. Vol. 95, *Journal of Molecular Medicine*. Springer Verlag; 2017. p. 1153–65.
26. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. Vol. 26, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006. p. 1702–11.
27. Chen M, Sawamura T. Essential role of cytoplasmic sequences for cell-surface sorting of the lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1). *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Sep;39(3):553–61.
28. Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JI, et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(1):19–26.
29. Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*. 2007 Nov;43(3):207–17.
30. Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: Current knowledge and future challenges. Vol. 50, *Journal of Lipid Research*. 2009.
31. Guo L, Chen M, Song Z, Daugherty A, Li XA. C323 of SR-BI is required for SR-BI-mediated HDL binding and cholesteryl ester uptake. *J Lipid Res*. 2011 Dec;52(12):2272–8.
32. Yu X, Guo C, Fisher PB, Subjeck JR, Wang XY. Scavenger Receptors: Emerging Roles in Cancer Biology and Immunology. In: *Advances in Cancer Research*. Academic Press Inc.; 2015. p. 309–64.
33. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease. Vol. 4, *Cells*. MDPI; 2015. p. 178–201.

34. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. Vol. 93, Medical Sciences. 1996.
35. Adachi H, Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. Journal of Biological Chemistry. 2002 Jul 5;277(27):24014–21.
36. Interactions of SR with bacteria.
37. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. The Journal of Immunology. 2017 May 15;198(10):3775–89.
38. Pingfei Jin SC. LOX-1 and atherosclerotic-related diseases. Clinica Chimica Acta. 2019;491:24–9.
39. Sawamura T, KN, AT, MH, HH, AY ,Masaki, T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. Nature. 1997;386:73–7.
40. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. Vol. 2013, Mediators of Inflammation. 2013.
41. Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, et al. Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. Vol. 14, Current Atherosclerosis Reports. 2012. p. 150–9.
42. Biocca S, Filesi I, Mango R, Maggiore L, Baldini F, Vecchione L, et al. The splice variant LOXIN inhibits LOX-1 receptor function through hetero-oligomerization. J Mol Cell Cardiol. 2008 Mar 1;44(3):561–70.
43. Venkata N, Pothineni K, Karathanasis SK, Ding Z, Arulandu A, Varughese KI, et al. LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia Biology, Genetics, and Modulation.
44. Sawamura T, Wakabayashi I, Okamura T. LOX-1 in atherosclerotic disease. Vol. 440, Clinica Chimica Acta. Elsevier; 2015. p. 157–63.
45. Balzan S, Lubrano V. LOX-1 receptor: A potential link in atherosclerosis and cancer. Vol. 198, Life Sciences. Elsevier Inc.; 2018. p. 79–86.
46. Fukui M, Tanaka M, Senmaru T, Nakanishi M, Mukai J, Ohki M, et al. LOX-1 is a novel marker for peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. Metabolism. 2013 Jul;62(7):935–8.

47. Fukui M, Tanaka M, Senmaru T, Nakanishi M, Mukai J, Ohki M, et al. LOX-1 is a novel marker for peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2013 Jul;62(7):935–8.
48. Akhmedov A, Rozenberg I, Paneni F, Camici GG, Shi Y, Doerries C, et al. Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *Eur Heart J*. 2014 Oct 21;35(40):2839–48.
49. Hu C, Dandapat A, Sun L, Chen J, Marwali MR, Romeo F, et al. LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul;79(2):287–93.
50. Murdocca M, de Masi C, Pucci S, Mango R, Novelli G, di Natale C, et al. LOX-1 and cancer: an indissoluble liaison. Vol. 28, *Cancer Gene Therapy*. Springer Nature; 2021. p. 1088–98.
51. Rizzacasa B, Morini E, Pucci S, Murdocca M, Novelli G, Amati F. Lox-1 and its splice variants: A new challenge for atherosclerosis and cancer-targeted therapies. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
52. Ohki I, Amida H, Yamada R, Sugihara M, Ishigaki T, Tate SI. Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2011 Feb;1814(2):345–54.
53. Ohki I, Ishigaki T, Oyama T, Matsunaga S, Xie Q, Ohnishi-Kameyama M, et al. Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure*. 2005 Jun;13(6):905–17.
54. Barreto J, Karathanasis SK, Remaley A, Sposito AC. Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor Mechanistic Insight and Potential Clinical Use. Vol. 41, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2021. p. 153–66.
55. Wang X et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. 2012;
56. Ohki I, Ishigaki T, Oyama T, Matsunaga S, Xie Q, Ohnishi-Kameyama M, et al. Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure*. 2005 Jun;13(6):905–17.

57. Kumari S, Achazi K, Dey P, Haag R, Dervede J. Design and Synthesis of PEG-Oligoglycerol Sulfates as Multivalent Inhibitors for the Scavenger Receptor LOX-1. *Biomacromolecules*. 2019 Mar 11;20(3):1157–66.
58. Iacovelli F, Tucci FG, Macari G, Falconi M. Multiple molecular dynamics simulations of human LOX-1 and Trp150Ala mutant reveal the structural determinants causing the full deactivation of the receptor. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2017 Oct 1;85(10):1902–12.
59. Nakano S, Sugihara M, Yamada R, Katayanagi K, Tate SI. Structural implication for the impaired binding of W150A mutant LOX-1 to oxidized low density lipoprotein, OxLDL. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2012 May;1824(5):739–49.
60. Biocca S, Falconi M, Filesi I, Baldini F, Vecchione L, Mango R, et al. Functional analysis and molecular dynamics simulation of LOX-1 K167N polymorphism reveal alteration of receptor activity. *PLoS One*. 2009 Feb 27;4(2).
61. Falconi M, Ciccone S, D'Arrigo P, Viani F, Sorge R, Novelli G, et al. Design of a novel LOX-1 receptor antagonist mimicking the natural substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Aug 23;438(2):340–5.
62. Shaw DJ, Seese R, Ponnambalam S, Ajjan R. The role of lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor-1 in vascular pathology. Vol. 11, *Diabetes and Vascular Disease Research*. SAGE Publications Ltd; 2014. p. 410–8.
63. Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: Role of LOX-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002;302(2):601–5.
64. Shaw DJ, Seese R, Ponnambalam S, Ajjan R. The role of lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor-1 in vascular pathology. Vol. 11, *Diabetes and Vascular Disease Research*. SAGE Publications Ltd; 2014. p. 410–8.
65. Nakano A, Inoue N, Sato Y, Nishimichi N, Takikawa K, Fujita Y, et al. LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state. *J Hypertens*. 2010;28(6):1273–80.
66. Lund AK, Lucero JA, Harman M, Madden MC, McDonald JD, Seagrave JC, et al. The oxidized low-density lipoprotein receptor mediates vascular effects of inhaled vehicle emissions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jul 1;184(1):82–91.
67. Amati F, Diano L, Vecchione L, Norata GD, Koyama Y, Cutuli L, et al. LOX-1 inhibition in ApoE KO mice using a schizophyllan-based antisense oligonucleotide

- therapy. Vol. 1, Molecular Therapy - Nucleic Acids. Nature Publishing Group; 2012. p. e58.
68. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.
 69. Flexible Ligand Docking with Glide.
 70. Park HJ, Adsit FG, Boyington JC. The 1.4 Å crystal structure of the human oxidized low density lipoprotein receptor lox-1. Journal of Biological Chemistry. 2005 Apr 8;280(14):13593–9.
 71. Ramezani M, Shamsara J. An integrated structure- and pharmacophore-based MMP-12 virtual screening. Mol Divers. 2018 May 1;22(2):383–95.
 72. Schnapp G, Neubauer H, Büttner FH, Handschuh S, Lingard I, Heilker R, et al. A small-molecule inhibitor of lectin-like oxidized LDL receptor-1 acts by stabilizing an inactive receptor tetramer state. Commun Chem. 2020 Dec 1;3(1).
 73. Lee W, Lee S, Choi J, Park JH, Kim KM, Jee JG, et al. Antithrombotic properties of JJ1, a potent and novel thrombin inhibitor. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).
 74. Gurung AB, Laso A, Bhattacharjee A. Identification of potential drug-like molecules for inhibition of the inflammatory activity of cyclooxygenase-2. J Biomol Struct Dyn. 2020 Dec 11;38(18):5293–306.
 75. Zarei O, Sarri N, Dastmalchi S, Zokai F, Papadopoulos N, Lennartsson J, et al. Structure-based discovery of novel small molecule inhibitors of platelet-derived growth factor-B. Bioorg Chem. 2020 Jan 1;94.
 76. Cai H, Wang T, Yang Z, Xu Z, Wang G, Wang HY, et al. Combined Virtual Screening and Substructure Search for Discovery of Novel FABP4 Inhibitors. J Chem Inf Model. 2017 Sep 25;57(9):2329–35.
 77. Liu Q, Huang F, Yuan X, Wang K, Zou Y, Shen J, et al. Structure-Guided Discovery of Novel, Potent, and Orally Bioavailable Inhibitors of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2. J Med Chem. 2017 Dec 28;60(24):10231–44.
 78. Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. J Chem Inf Model. 2015 Nov 23;55(11):2324–37.
 79. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res. 2007 Jul;35(SUPPL.2).
 80. Iacovelli F, Tucci FG, Macari G, Falconi M. Multiple molecular dynamics simulations of human LOX-1 and Trp150Ala mutant reveal the structural

determinants causing the full deactivation of the receptor. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2017 Oct 1;85(10):1902–12.

81. Madhavi Sastry G, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des*. 2013;27(3):221–34.
82. Tomar A, Sahoo S, Aathi M, Kuila S, Khan MA, Ravi GRR, et al. Exploring the druggability of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) receptor, LOX-1, a proatherogenic drug target involved in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Oct 1;623:59–65.
83. Jamialahmadi T, Baratzadeh F, Reiner Ž, Mannarino MR, Cardenia V, Simental-Mendía LE, et al. The Effects of Statin Therapy on Oxidized LDL and Its Antibodies: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 2022, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2022.

ANEXOS

```

+-----<<< P R O C H E C K      S U M M A R Y >>>-----+
| /var/www/SAVES/Jobs/1268418/saves.pdb  1.5                268 residues
+ Ramachandran plot:  89.3% core    9.8% allow    0.9% gener    0.0% disall
+ All Ramachandrans:  2 labelled residues (out of 264)
+ Chi1-chi2 plots:   2 labelled residues (out of 172)
| Side-chain params:  5 better      0 inside      0 worse
+ Residue properties: Max.deviation:    3.2                Bad contacts:    0
+                      Bond len/angle:  4.0      Morris et al class:  1  1  2
| G-factors          Dihedrals:  -0.29  Covalent:   0.10    Overall:  -0.12
* Planar groups:     89.4% within limits  10.6% highlighted      2 off graph
+-----+
| + May be worth investigating further.  * Worth investigating further.

```

Figura 19. Resumen de análisis por Procheck. Corresponde a la estructura PDB ID:6TL7 luego de ser minimizada energéticamente.

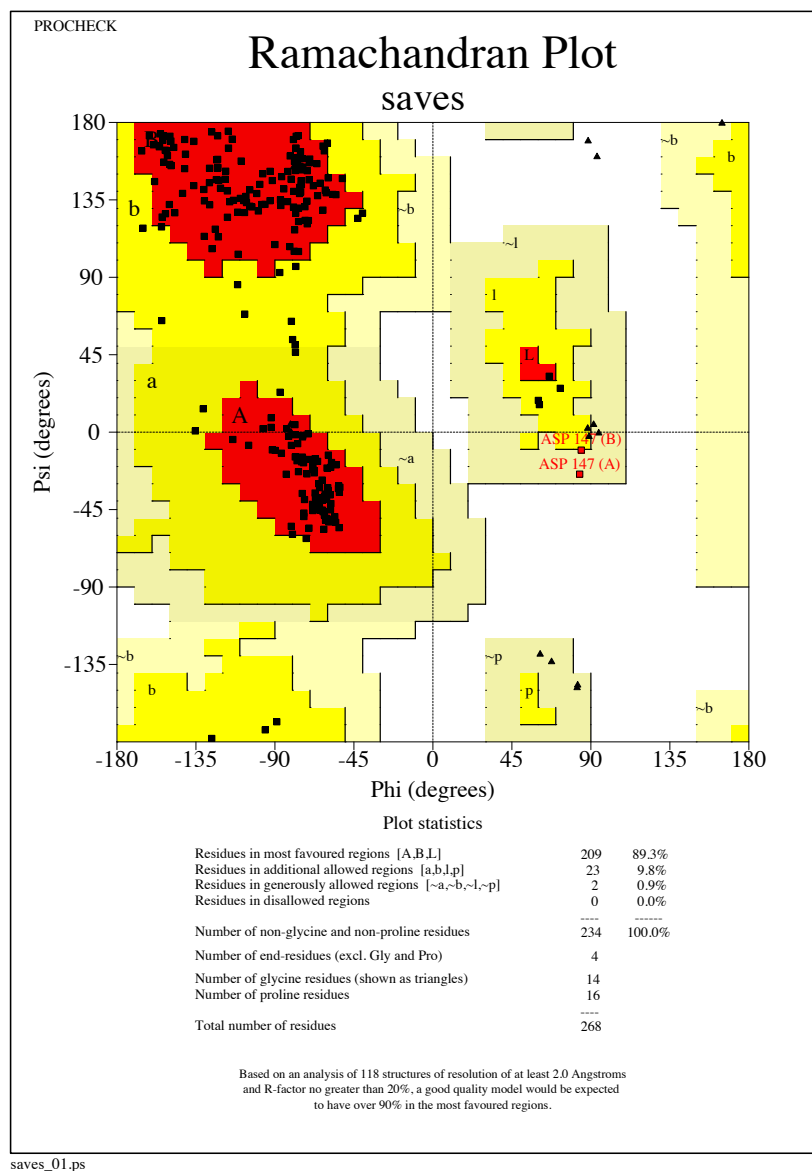


Figura 20. Gráfico de Ramachadran de la estructura PDB ID:6TL7 , luego de ser minimizada energéticamente.

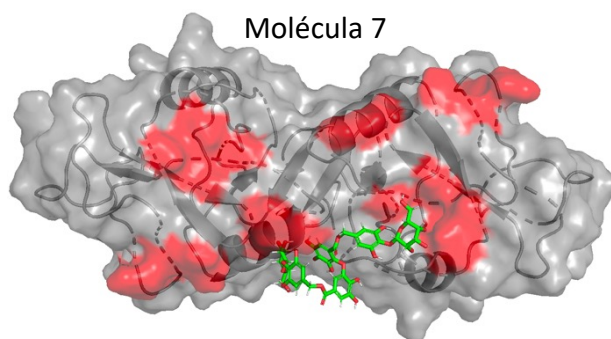
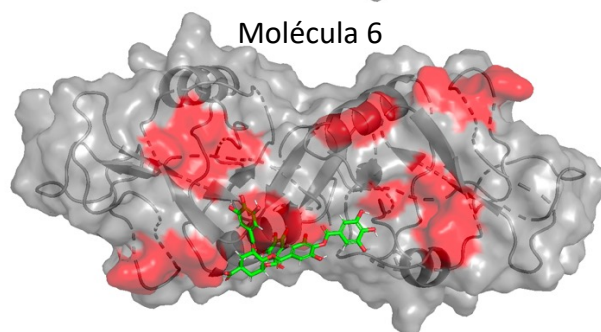
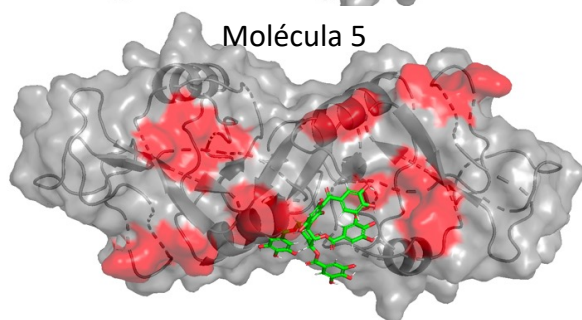
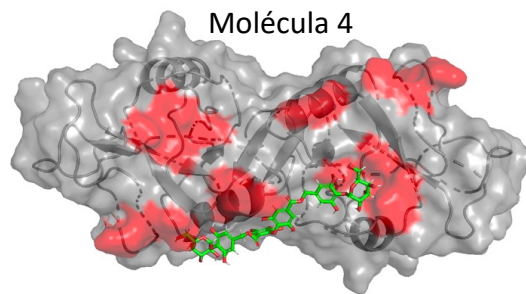
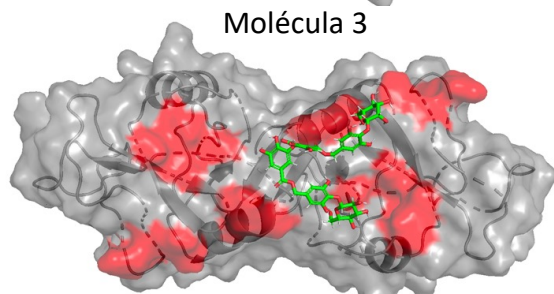
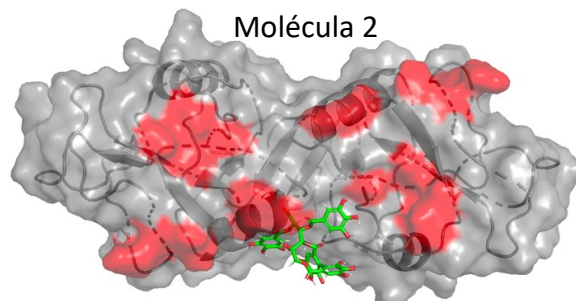
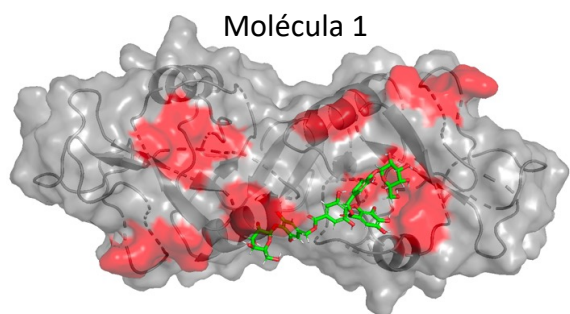


Figura 21. Estructura Lox-1 (6TL7) con las moléculas mejor rankeadas del docking XP sin utilizar filtros de selección. En rojo los residuos seleccionados para generar la grilla.

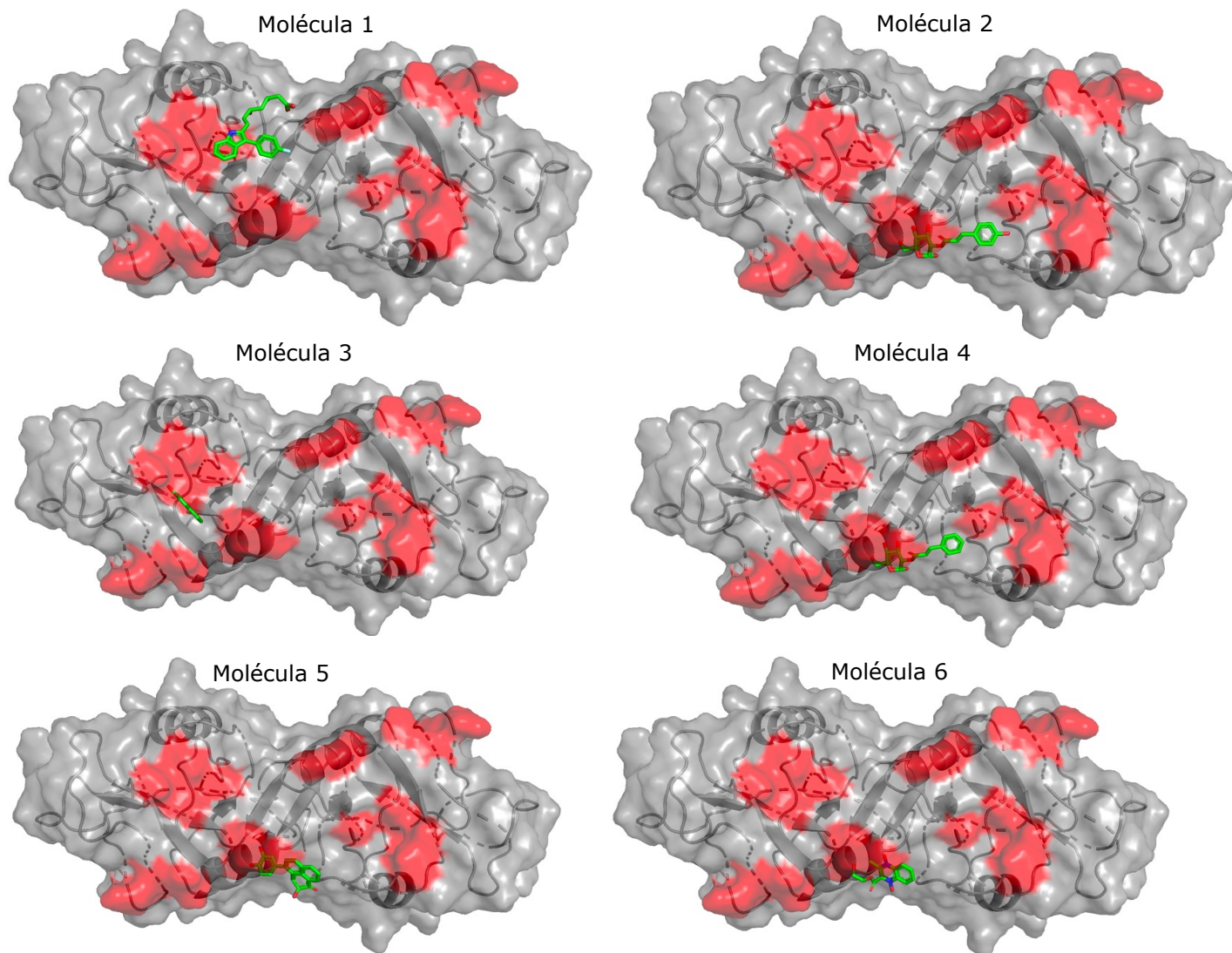


Figura 22. Estructura Lox-1 (6TL7) con las moléculas mejor rankeadas del docking XP utilizando filtros de selección. En rojo los residuos seleccionados para generar la grilla.