

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“RELACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DEL PORO DE
UCP-3 CON EL PASO DE PROTONES Y LA INTERACCIÓN CON
DHA”**

Presentada por:

JOSÉ CARLOS ESTANISLAO MÁRQUEZ MONTESINOS

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGÍSTER
SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima - Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“RELACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DEL PORO DE
UCP-3 CON EL PASO DE PROTONES Y LA INTERACCIÓN CON
DHA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentado por:

JOSÉ CARLOS ESTANISLAO MÁRQUEZ MONTESINOS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Víctor Hidalgo Lozano
PRESIDENTE

Dra. María Elena Villanueva Espinoza
PATROCINADORA

Dra. Wendy González Díaz
CO-PATROCINADORA

Ph.D. Carlos Vilchez Perales
MIEMBRO

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
MIEMBRO

DEDICATORIA

Dedico este gran esfuerzo, a esa inmensurable fuerza que originó todo, la que me susurró al oído que me dedicara a la ciencia y la que acaricia mi cabeza suavemente para inspirarme. A esta fuerza que inunda todo y cada uno de los rincones del aún desconocido universo y que cada mañana nos invita a entenderla más. Algunos le ponen nombre dependiendo de su religión, yo prefiero no definirla en palabras, sólo sentirla y abrazarla.

También dedico este trabajo a mi familia en general ya que todos me han apoyado mucho, pero en particular a mi madre Graciela Montesinos y a mis tíos Jimmy Montesinos, Luis Márquez y Javier Bustinza, ya que están muy pendientes de mi desarrollo personal y profesional y tienen la certeza que saldré triunfante frente a cada reto. Adicionalmente, deseo que mis primos menores, sobrinos y ahijados sientan que esta dedicatoria los incluye de una manera muy especial, porque tengo la seguridad de que mis logros serán opacados por los de ellos.

En adición, quiero dedicarle mi esfuerzo a todos mis amigos que me han acompañado desde mi infancia y tengo la suerte de tenerlos a mi lado hasta estos días, a las amistades que he hecho en este último periodo de mi vida y a mi Zeremita que recobró en mí la sensibilidad.

Por último, quiero dedicarle encarecidamente mi tesis a una persona muy especial, alguien que me ha acompañado desde hace casi diez años y que sin su nombre, la frase te amo carece de sentido: Sadith Astola.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al programa de becas CONCYTEC CIENCIA ACTIVA por la subvención y manutención en el periodo de la maestría.

A los tres doctores que pusieron su confianza en mí otorgándome las cartas de recomendación para la postulación a la Maestría de Nutrición: Eduardo Fuentes Navarro, Carolina Hurtado Marcos y Juan Chávez Cossio.

A la Dra. María Elena Villanueva Espinoza por confiar en mí y trabajar un tema novísimo en la UNALM.

A la Dra. Wendy González Díaz por su espléndida y esencial labor como co-asesora, ya que no sólo brindó el apoyo académico, sino que me permitió acceder al servidor del Centro de Bioinformática y Simulación Molecular (CBSM) de la Universidad de Talca (Talca, Chile) para realizar la metodología de la tesis y a su asistente Ivana Orellana por su valiosa colaboración.

Por último, agradezco mucho la gestión del Mg.Sc. Víctor Hidalgo en el programa de maestría y a la Sra. Amelia por la toda la ayuda brindada en mis trámites.

Sin la ayuda y el apoyo de ellos no hubiera sido posible este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Fisiología mitocondrial	3
2.1.1 Macroestructura y función mitocondrial	3
2.1.2 Composición de membranas mitocondriales	3
2.1.3 Función de los componentes mitocondriales	4
2.2 El sistema de fosforilación oxidativa en la mitocondria de mamíferos	4
2.2.1 El ciclo de la Coenzima Q10	5
2.2.2 Estados respiratorios mitocondriales	5
2.2.3 Teoría quimiosmótica	6
2.3 Proteínas desacoplantes mitocondriales	6
2.3.1 Secuencia, topología y estructura y de las UCPs de humanos	6
2.4 Mecanismos de las UCPs	8
2.4.1 Grupo carboxilo de los AGLs como donadores	9
2.4.2 Transportador de AGLs	9
2.4.3 AGL como cofactor alostérico	10
2.4.4 Congruencia entre los modelos	10
2.5 Proteínas desacoplantes y su relación funcional con los AGPIs	11
2.5.1 Proteína desacoplante 1 (UCP-1)	11
2.5.2 Proteína desacoplante 2 (UCP-2)	12
2.5.3 Proteína desacoplante 3 (UCP-3)	13
2.6 Modelado y simulación <i>in silico</i> de proteínas	14
2.6.1 Modelado estructural <i>in silico</i>	15
2.6.2 Análisis <i>in silico</i> estructural de proteínas	17
2.6.3 Dinámicas moleculares de proteínas	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Modelado estructural por homología de UCP-3 de humanos	22
3.2 Generación de mutantes estructurales de UCP-3	22
3.3 Ensayo de dinámicas Moleculares	23
3.4 Análisis de poro y dinámica de agua en el poro de UCP-3 y mutante	24

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Modelo estructural del fenotipo silvestre de UCP-3 (UCP-3_WT)	26
4.2 Mutantes estructurales de UCP3_WT	29
4.3 Dinámicas moleculares	32
4.4 Análisis de poro y dinámica de agua en el poro de UCP-3 y mutantes	35
4.5 Interacción proteína ligando (docking) de UCP-3 y mutantes con el ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (omega 3 DHA)	50
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES	55
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
VIII. ANEXOS	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Descripción de los factores en los diferentes estados.	5
Cuadro 2:	Residuos relevantes en la actividad de transporte de UCP-1.	30
Cuadro 3:	Residuos que forman puentes de hidrógeno (PH).	39
Cuadro 4:	Residuos que interactúan con DHA.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estereoquímica de las proteínas.	17
Figura 2:	Estructura UCP3_WT.	27
Figura 3:	Alineamiento estructural del modelo de UCP-3 versus UCP-2	28
Figura 4:	Residuos identificados relevantes para el estudio.	31
Figura 5:	Sistema de UCP-3 con membrana, agua e iones en condiciones iniciales.	33
Figura 6:	Parámetros de validación de la DM.	34
Figura 7:	Análisis de área de superficie accesible al solvente (ASAS) por residuo mutado.	42
Figura 8:	Comparación morfológica del poro entre estructuras.	43
Figura 9:	Perfil morfológico del poro de las estructuras.	44
Figura 10:	Símil de la presencia de agua en el poro.	45
Figura 11:	Perfiles de presencia de agua en el poro.	46
Figura 12:	Puentes de hidrógeno formados entre las estructuras y el agua.	47
Figura 13.	Posición de residuos formadores de puentes de hidrógeno.	49
Figura 14.	Acoplamiento molecular (molecular docking) con DHA.	53

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	Alineamiento múltiple de las proteína UCP-1, 2 y 3 de diferentes especies.	68
ANEXO 2:	Parámetros de la simulación aplicados a cada estructura.	70
ANEXO 3:	Gráficos de Ramachandran de las estructuras de UCP-3 y mutantes.	73
ANEXO 4:	Parámetros de validación de las DM.	76

ABREVIATURAS

AGL/AGLs: Ácido graso libre/ácidos grasos libres

AGPI/AGPIs: Ácido graso poliinsaturado/ácidos grasos poliinsaturados

AHA: Alfa hélices anfipáticas

ASAS: Análisis del área superficial accesible al solvente

ATP: Adenosina-trifosfato

CASP: Evaluación crítica de técnicas para predicción de la estructura proteica (del inglés *Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*)

DHA: Ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico

DM: Dinámicas Moleculares

EROs: Especies reactivas de oxígeno

GDP: Guanosina-difosfato

GM: Grasa marrón

M_D215N: Estructura de la proteína mutante D215N

M_D28N: Estructura de la proteína mutante D28N

M_E173Q: Estructura de la proteína mutante E173Q

MACF: Familia de Transportadores Aniónicos Mitocondriales (del inglés *Mitochondrial Anion Carrier Family*)

MEM: Membrana externa mitocondrial

MH: Modelado por homología

MIM: Membrana interna mitocondrial

MRP: Modelado por reconocimiento de plegamiento

PH: Puentes de hidrógeno

POPC: Fosfatidil oleoilfosfatidilcolina (del inglés *phosphatidyl oleoylphosphatidylcholine*)

RMSD: Raíz cuadrada del promedio de la desviación cuadrática (del inglés *Root Mean Square Deviation*)

UCP/UCPs: Proteína desacoplante/proteínas desacoplantes (del inglés *uncoupling proteins*)

UCP3_WT: Estructura de UCP-3 del fenotipo silvestre

RESUMEN

Las proteínas desacoplantes (UCPs) pertenecen a la Familia de Transportadores Aniónicos Mitocondriales (MACF) y se caracterizan por transportar protones del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial, disminuyendo la capacidad de generar nucleótidos trifosfato, los cuales son usados en procesos dependientes de energía (actividad desacoplante). Por ello, repercuten notablemente en el metabolismo energético. Se postulan tres posibles mecanismos de transporte de protones: (1) la utilización del grupo carboxilo de ácidos grasos libres (AGLs) para transportar protones, (2) como transportador de AGLs aniónicos que difunden por la membrana al neutralizarse con un protón del espacio intermembranal y (3) utilizando los AGLs como cofactor alostérico. En adición, es ampliamente reconocido que estas UCPs son activadas por los AGLs y ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs). Se detectaron mediante búsqueda de literatura, mutantes que presentan reducida la actividad desacoplante de UCP-1 y se modelaron las respectivas estructuras teóricas homólogas en UCP-3 para ser comparadas con el fenotipo silvestre de UCP-3. Aplicando un enfoque biofísico computacional e información estructural de UCP-1 y UCP-2, este estudio encontró una explicación a nivel molecular de fenómenos macroscópicos. El modelado y dinámicas moleculares de la estructura del canal de UCP-3 determinaron que las propiedades del poro repercuten en el transporte de protones y el mecanismo podría estar mediado por cables de agua. En adición, el acoplamiento molecular del AGPI DHA sugiere que el mecanismo de activación de UCP-3 mediado por AGPIs se da debido a que estos interaccionan con UCP-3 de la misma manera que los AGLs de cadena larga que se ha probado que aumentan la actividad de la proteína.

Palabras claves: UCP-3, actividad desacoplante, dinámicas moleculares, acoplamiento molecular, DHA.

ABSTRACT

Uncoupling proteins (UCPs) belong to Mitochondrial Anion Carrier Family (MACF) and they are characterized by their proton transport capacity from intermembrane space to mitochondrial matrix, reducing triphosphate nucleotides production that is used in energy-dependent processes (uncoupling activity). Hence, these proteins directly affect energy metabolism. Three possible proton transport mechanisms are proposed in the literature: (1) free fatty acids (FFAs) carboxyl group are used for proton transport, (2) a proton flow as a result of FFAs membrane diffusion after FFAs have been neutralized by intermembrane space protons and (3) an allosteric cofactor role of FFAs in UCPs. Moreover, FFAs and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are well known as a UCPs activator, and there is no FFA-independent activity of UCPs. UCP-1 mutants with a decreased uncoupling activity were identified through literature and their UCP-3 homologous theoretical structures were modeled to compare them with UCP-3 wild type structure. Applying a computational biophysics approach and structural information of UCP-1 and UCP-2, this study found an explanation of macroscopic events at a molecular level. Molecular modelling and dynamics of UCP-3 pore structure displayed that proton flux was affected by structural UCP-3 pore properties and water wires could mediate that phenomenon. In addition, molecular docking between the DHA-PUFA and UCP-3 suggested that UCP-3 activity is increased by PUFAs because they interact in the same way that long-chain FFAs that have been proven to enhance UCP-3 performance.

Keywords: UCP-3, uncoupling activity, molecular dynamics, molecular docking, DHA.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas desacoplantes (UCP, del inglés *Uncoupling proteins*) son un grupo de proteínas ubicadas en la mitocondria que pertenecen a la familia de transportadores aniónicos mitocondriales (MACF, del inglés *Mitochondrial Anion Carrier Family*) y presentan cinco tipos en los humanos: UCP-1, 2, 3, 4 y 5 (también llamada BMCP1). Esta familia se encarga de transportar metabolitos a través de dominios transmembrana y utiliza, directa o indirectamente, el gradiente electroquímico de protones generado por la respiración.

Todas las UCPs tienen seis segmentos de alfa hélice que traspasan la membrana mitocondrial. Los extremos amino y carboxilo terminal están en el espacio intermembranal y las asas hidrofílicas, en la matriz mitocondrial. Este parentesco estructural se debe a la homología que guardan entre sí. En adición la UCP-3 y la UCP-2 comparten una identidad aminoacídica de un 57 por ciento y 59 por ciento con la UCP-1, mientras que las UCP-2 y 3 tienen un 73 por ciento de identidad en su secuencia; sin embargo, la única UCP que presenta una estructura resuelta experimentalmente es la UCP-2. Debido a que las UCP-2 y UCP-3 guardan un gran parecido a la UCP-1, se cree que cumplen un rol similar.

Las UCP son responsables de la actividad termogénica ya que modifican el gradiente electroquímico de H^+ asociado con la bomba de adenosina-trifosfato (ATP). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en la UCP-1 de la grasa marrón (GM). En este contexto, la UCP-3 se expresa principalmente en GM y músculo esquelético y se ha postulado que tiene un rol termogénico. No obstante, existe evidencia que sugiere que UCP-3 puede no estar directamente implicada en la termorregulación. En adición, esta proteína no sólo está asociada a un papel netamente bioquímico o termorregulador, sino que su comportamiento tiene consecuencias fenotípicas y nutricionales. Por ejemplo, cuando la concentración de UCP-3 está mermada en el músculo esquelético, las mitocondrias de éste son defectuosas en la oxidación de ácidos grasos. También se conoce que en el anterior caso se promueve la acumulación de estos y sus metabolitos, y este fenómeno está asociados con el incremento

del estrés oxidativo y se señala que este incremento guarda estrecha relación con el desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo 2.

Existen otras evidencias que relacionan la UCP-3 y su rol en el metabolismo energético asociado a la nutrición. Por ejemplo, ratones con sobreexpresión de UCP-3 fueron menos eficientes en el metabolismo sin presentar más hambre y presentaban una resistencia a generar obesidad en una dieta alta en grasa. Además, se ha reportado que cuando el gen UCP-3 está sobreexpresado, el músculo imita la condición de ejercicio incrementando la actividad espontánea y el gasto energético.

A pesar que se ha demostrado ampliamente que la UCP-3 tiene un rol protagónico en el metabolismo energético y la nutrición, aún se debate el mecanismo de acción de esta proteína mitocondrial y no se tiene información de cómo interactúan espacialmente los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) con las mismas, ya que incrementan la actividad de UCP-3. Por consiguiente, Este estudio tiene como objetivo encontrar la relación entre la estructura y dinámica del poro de UCP-3 de humanos con el paso de protones y la interacción que presenta con el AGPI ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (DHA) utilizando un enfoque computacional (también llamado *in silico* - expresado en forma latinizada-), ya que pretende aportar en el entendimiento molecular de la función de UCP-3, dando un punto de partida teórico a procedimientos empíricos futuros de tal manera que se integre esta información en el balance energético, la modificación de su protagonismo por medio de dietas, la implementación de terapias y la predicción de su comportamiento con otras sustancias o cambios fisicoquímicos de su entorno.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Fisiología mitocondrial

La mitocondria, en el contexto celular, alberga el poder de respirar y generar energía. Según Papa *et al.* (2012) ésta produce el 80 por ciento del ATP que la célula requiere y el resto, se produce en el citosol. La respiración oxida completamente los compuestos carbonados en agua, dióxido de carbono y amoníaco. Así mismo, es el lugar físico de rutas anabólicas como la elongación de los ácidos grasos o reacciones parciales de la gluconeogénesis.

2.1.1 Macroestructura y función mitocondrial

La mitocondria presenta cuatro estructuras (Gvozdjaková, 2008): Membrana externa mitocondrial (MEM), membrana interna mitocondrial (MIM), espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La MEM es importante porque interactúa con el citosol y la separa del espacio intermembranal. La MIM separa la matriz del espacio intermembranal, lo que hace que el espacio intermembranal está limitado por la MEM (hacia el citosol) y la MIM (hacia la matriz). La MIM se presenta plegada para aumentar su superficie, situación llamada *cristae*.

2.1.2 Composición de membranas mitocondriales

Tzagoloff (1982) muestra que el 40 por ciento de las membranas son de fosfatidil colina, 28.4 por ciento de fosfatidil etanolamina, 22.5 por ciento de cardiolipina y 7 por ciento de fosfatidil inositol. En la membrana interna existen proteínas solubles en agua que se encuentran en la superficie (succinato deshidrogenasa, NADH-deshidrogenasa, F1-ATPase, citocromo C, citocromo C1 y las subunidades 4; 5; 6 y 7 de la citocromo oxidasa) e insolubles que se encuentran embebidas en la misma membrana (citocromo B, subunidades 1;2 y 3 de la citocromo oxidasa, proteína férrica de la coenzima QH2, citocromo C reductasa y las subunidades 5,7 y 9 de la ATPasa sensible al antibiótico oligomicina.

En adición, Pedersen (1993) señala que los MACFs están presentes en la MIM. Éste describe nueve principales transportadores: ADP/ATP, fosfato/piruvato, aspartato/glutamato, oxoglutarato/dicarboxilato, citrato/glutamato y ATPMg/Pi. También, señala que los transportadores MACFs ornitina, carnitina-acil I, carnitina-acil traslocasa y las UCPs se encuentran en dicha membrana.

2.1.3 Función de los componentes mitocondriales

La MEM tiene la función de transportar proteínas del citosol a la mitocondria, en donde las moléculas pequeñas viajan con facilidad en el espacio intermembranal y las moléculas grandes son transportadas de forma activa (Yaffe, 1999). Existen “encuentros” entre la MEM y la MIM en los cuales complejos proteicos de ambas membranas importan proteínas hacia la matriz (Endo *et al.*, 2003 y Ziegelhoffer-Mihalovičová *et al.*, 1998).

La MIM forma la *cristae*. En ésta residen los complejos de transporte de electrones, el complejo ATPsintasa y la adenina nucleótido traslocasa. A través de esta membrana se produce la conocida fuerza protón motriz compuesta por el gradiente de protones y el potencial de membrana (Fleury *et al.*, 2001).

El espacio intermembranal contiene el citocromo C como transportador de electrones y alberga los protones que generarán la fuerza protón motriz. En contraste, la matriz mitocondrial es el espacio físico en el cual se llevan a cabo todas las rutas metabólicas correspondientes a la mitocondria.

2.2 El sistema de fosforilación oxidativa en la mitocondria de mamíferos

Como se ha expuesto líneas arriba, la MIM presenta las proteínas necesarias para la fosforilación oxidativa. Gvozdjaková (2008) comenta que la cadena respiratoria tiene dos proteínas “móviles” que son citocromo C y la coenzima Q10 y cinco complejos (I al V) “No móviles”. Los electrones provenientes viajan entre los complejos I, II, coenzima Q10, III y IV; los complejos I, III y V utilizan la energía de los electrones para bombear protones hacia el espacio intermembranal.

2.2.1 El ciclo de la Coenzima Q10

Esta Coenzima (Ubiquinona) es un componente móvil de la respiración embebido en la MIM. El ciclo mencionado consta de tres fases (Gvozdjǎková, 2008): CoQ oxidada (ubiquinona), CoQH₂ (forma reducida, ubiquinol) y CoQ en su forma radical (ubisemiquinona). La ubiquinona transporta electrones y protones entre los complejos I al III. En adición, se asocia esta coenzima como un punto crítico en el control de las membranas subcelulares, metabolismo energético y funciones antioxidantes (Crane, 2001; Linnanne y Eastwood, 2004).

2.2.2 Estados respiratorios mitocondriales

Se definen cinco estados estables (*steady states*) mitocondriales resumidos en el Cuadro 1 (Chance y Willians, 1955). El estado I refiere a una respiración lenta (estado de privación de sustrato), en un medio isosmótico. Al adicionar al medio adenosina-difosfato (ADP), se aumenta la tasa de respiración levemente y la demanda de ATP es mayor, lo que nos lleva al estado II. El estado III es un estado de alta respiración, al haber agregado sustratos para la respiración mitocondrial. Luego, la tasa disminuye y todo el ADP agregado fue convertido en ATP, estado IV. Al final, cuando el oxígeno se ha consumido se llega al estado V.

Cuadro 1: Descripción de los factores en los diferentes estados.

Factores	Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4	Estado 5
Oxígeno	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
Nivel de ADP	Bajo	Alto	Alto	Bajo	Alto
Nivel de sustrato	Endógeno - Bajo	Cercano a cero	Alto	Alto	Alto
Tasa de respiración	Lenta	Lenta	Rápida	Lenta	Ausente
Factor limitante de respiración	Aceptor fosfato	Sustrato	Cadena resp.	Aceptor fosfato	Oxígeno

Fuente: Chance y Willians (1955)

2.2.3 Teoría quimiosmótica

Mitchell (1961) propuso que la energía de la cadena respiratoria de electrones es utilizada para la generación de ATP a través de un gradiente electroquímico de protones. En esta teoría, los transportadores electrónicos de la cadena transportadora permiten la exportación de los protones de la matriz a través de la MIM generando “trabajo” químico para varios sistemas mitocondriales (Sluse, 2012). Se dice que éstos sólo pueden regresar a través del complejo V produciendo ATP, sin embargo, existen vías alternas que no generan esta molécula de alta energía (Nobes *et al.*, 1990) y se las conoce también como fugas de protones (*proton leak*). Un claro ejemplo para este caso es la vía de UCPs en la MIM (Jastroch *et al.*, 2010).

2.3 Proteínas desacoplantes mitocondriales

En las células, la producción de ATP se da gracias a que se acopla la oxidación de moléculas orgánicas y el paso de protones del espacio intermembranal a la Matriz mitocondrial a través de la ATP-sintasa situada en la MIM. Por ello, se puede definir que la eficiencia de acoplamiento de una célula es el porcentaje de la respiración de la mitocondria que produce ATP. Las proteínas que “desacoplan” esta vía canónica se denominan UCPs o proteínas desacoplantes (Divakaruni y Brand, 2011), y pertenecen a la familia MACF como nos muestra Pedersen (1993); sin embargo, no son las únicas de la familia que producen ese efecto (Brand *et al.*, 2005; Liu y Chen, 2013).

2.3.1 Secuencia, topología y estructura y de las UCPs de humanos

Los transportadores mitocondriales (que incluye a los transportadores de la MACF) tienen como característica que el monómero tiene una estructura tripartita, es decir, la secuencia se puede dividir en tres partes iguales con alrededor de 100 aminoácidos cada una (Kunji, 2004). A su vez, estas porciones presentan una secuencia conservada definida como P-X-[D/E]-X-X-[R/K] (Prosite PS50920 -Sigrist *et al.*, 2012-), donde P es Pro, X cualquier residuo, [D/E] Asp o Glu y [R/K], Arg o Lys; y que todo miembro de los transportadores mitocondriales la posee (Kunji, 2004). En adición, se postula que la topología consenso de los transportadores mitocondriales (Sluse, 1996) presenta seis dominios en alfa-hélice transmembrana (H1 hasta H6) conectados por tres asas hidrofílicas largas en un lado y dos asas hidrofílicas cortas en el otro. Además, los extremos terminales amino y carboxilo están situados en la misma región y opuestos a las tres asas largas. Por otro lado, puede

ocurrir que alguna de las asas largas esté embebida en la MIM (Sluse, 1996). Así mismo, se postula que la prolina de la secuencia conservada induce a una torcedura aguda en las asas de los dominios alfa-hélices impares. Estas estructuras alfa helicoidales cierran el poro en el lado de la matriz y están unidas por puentes salinos y enlaces de hidrógeno, los cuales se forman por los residuos cargados de las secuencias conservadas (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; Dahout-Gonzalez *et al.* 2003). Finalmente, hay evidencia de que la forma activa en esta familia es un homodímero, formado por monómeros independientes estructuralmente (Kunji, 2004). Sin embargo, se ha probado que el monómero por sí sólo también es funcional (Bamber *et al.*, 2007).

Se ha mostrado que la UCP-1 presenta la topología descrita para la familia, con los extremos terminales hacia el espacio intermembranal (Miroux *et al.*, 1993) y Lee *et al.*, (2015) que estructuralmente es un monómero, dando indicios que su estructura y mecanismos son parecidos a los descritos para los otros transportadores. Gracias a estudios de mutaciones, se hipotetiza que los residuos de arginina R83, R182 y R276 en las alfa-hélices pares de la UCP-1 situadas en la parte de la matriz mitocondrial (presentes en todos los homólogos) y junto con el ácido glutámico E190 (Modriansky *et al.*, 1997), son cruciales para la interacción de la base de azúcar del inhibidor guanosina-difosfato (GDP). Así mismo, Echtay y *et al.*, (2000) describieron que los residuos de ácido aspártico D27, D209 y D210 y ácido glutámico E167, en UCP-1 de hámster, son importantes en la actividad de la proteína, la interacción con los nucleótidos y el paso de aniones. Zhao *et al.* (2017) determinaron, mediante protocolos experimentales y de simulación molecular, que los ácidos grasos de cadena larga interactúan en el lado lateral de UCP-1 en el surco formado por las alfas hélices H1 y H6 de la parte más próxima a la matriz mitocondrial.

También, que los residuos de lisina K56 y K269 de la alfa hélice H6 tienen un rol muy importante en la interacción por sus cargas positivas con el grupo carboxilo aniónico de los ácidos grasos libres (AGLs) para que se pueda dar el paso de los protones. Ellos sugieren que esta evidencia respalda los modelos que presentan a los AGLs como cofactores alostéricos así como protonóforo, pero no descartan que el canal de la UCPs pueda transportar AGLs de cadena corta cuando experimenta un gradiente electroquímico.

Berardi *et al.* (2011) determinaron la estructura de la UCP-2 de ratón (codificada como 2lck en el *protein data bank*) mediante la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear presentando las características antes mencionadas, la cual acerca el análisis estructural a las UCPs. Esto permitió que Berardi y Chou (2014) pudieran modelar la interacción estructural de la UCP-2 con los AGLs y su inhibidor por excelencia, GDP. En el estudio se halló que los residuos arginina (R60) y lisina (K271) del surco de H1 y H6 (homólogos a K56 y K269 en UCP1), situados en el lado matricial, son requeridos para que el grupo carboxilo aniónico de los AGLs interactúe de forma lateral con la UCP-2.

Finalmente, como se ha mencionado ya en el texto, no hay datos estructurales de UCP-3 pero se ha descrito que la conjugación con el glutatión (glutathionilación) en las cisteínas C25 y C259 “apaga” la actividad de la UCP-3 y las especies reactivas de oxígeno (EROs) desglutathionilan estos residuos, recuperando la actividad (Mailloux *et al.*, 2011). Así mismo, Musa *et al.* (2012) identifican que las mutaciones de residuos de valina V56 y V192 a metionina (V56M) e isoleucina (V192I), de alanina A111 a valina (A111V) o generando una mutación que trunca la proteína en la glutamina Q252 (Q252X) producen una disminución en la oxidación de ácido palmítico y un aumento en el almacenamiento de triglicéridos. Más aún, los genotipos que presentan un alelo que codifique para V56M y Q252X muestran un efecto de dominancia negativa, es decir, decrece el efecto de la proteína UCP-3.

Por consiguiente, el presente estudio utiliza los datos estructurales generados para UCP-1 y 2 y la estructura de UCP-2 determinada experimentalmente para el modelado estructural y funcional de UCP-3.

2.4 Mecanismos de las UCPs

No se encuentra en la literatura un mecanismo, aceptado con unanimidad, que muestre cómo las UCPs reducen la fuerza protón motriz mediando la fuga de protones a través de la MIM. Las hipótesis que se han presentado en la literatura son que los AGLs actúan como cofactores protonóforos de las UCPs, donando su grupo carboxilo en el interior. En segundo lugar, las UCPs son transportadores aniónicos que importan AGLs reducidos y éstos se difunden pasivamente al espacio intermembranal neutralizando su carga aceptando un protón y regresando a la matriz mitocondrial. Por último, se propone a las UCPs como

transportadores de protones que utilizan como activadores alostéricos a los AGLs. En contraste, no se descarta que coexistan varios mecanismos de acción.

2.4.1 Grupo carboxilo de los AGLs como donadores

Se propuso que los AGLs donan su extremo carboxilo al interior de la UCP aceptando protones del espacio intermembranal y liberándolos a la matriz (Klingenberg y Winkler, 1985), muy probablemente por medio de “cables de agua”, o por su nombre en inglés *water wires* (Nagle y Morowitz, 1978; Cukierman, 2003). Por más plausible que esto parezca, Garlid *et al.* (2001) publicaron una revisión en la cual proponen otro mecanismo llamado el modelo protonóforo (*protonophore model*) en el cual la cabeza aniónica de los AGLs transporta también los protones, sin embargo, utilizando un mecanismo de *flip-flop* en la MIM, lo que significa que las UCPs exponen el grupo carboxilo de los AGLs hacia el espacio intermembranal, permitiendo que estos capturen un H^+ y lo trasladen a la matriz. Es importante resaltar que, a pesar que en ambos casos el grupo carboxilo media el paso de los H^+ a través de la MIM, Klingenberg y Winkler (1985) presentan a las UCPs como un canal catiónico, a diferencia de Garlid *et al.* (2001). Ambos mecanismos, también, se han propuesto como modelos para la UCP-3 (Bézaire *et al.*, 2007). Una visión bastante interesante la propuso el mismo Klingenberg en el 2001, argumentando que la CoQ10 participa en el mecanismo de las UCPs. Expone que esta coenzima participa en la transferencia de H^+ desde el grupo carboxilo de los AGLs que se encuentran en el canal UCP o que ésta recibe los H^+ de los ácidos grasos, sin que estos AGLs entren necesariamente en el canal de la proteína, por ejemplo interactuando lateralmente con las UCPs.

2.4.2 Transportador de AGLs

Se dice que las UCPs se comportan como transportadores aniónicos, en tal caso, transportan AGLs cargados negativamente (Garlid *et al.*, 1996; Goglia y Skulachev, 2003). Esta hipótesis podría dar cuenta de por qué las UCPs pertenecerían a las MACF. En el estudio de Garlid *et al.* (1996), utilizaron el ácido láurico y su análogo undecanosulfonato, de los cuales sólo el primero puede difundir por la membrana. Estos AGLs pudieron ser transportados por las UCPs, pero en el caso del undecanosulfonato, no causó transporte de protones mediado por proteínas desacoplantes. Por lo tanto, plantearon que el flujo de protones es mediado por la difusión de AGLs neutros a través de la membrana y que estos, en su forma aniónica, son transportados de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal

pasando por la UCP. También, Robinson *et al.* (2008) predijeron que las UCP1 tiene la capacidad de transportar ácidos cetónicos y carboxílicos. Finalmente, se presenta respaldo experimental en el cual los ácidos grasos de cadena corta producen una corriente a través de UCP-1, es decir que son transportados (Fedorenko *et al.*, 2012).

2.4.3 AGL como cofactor alostérico

Se ha sugerido que los AGLs pueden cumplir el rol de activadores alostéricos en las UCPs (Shabalina *et al.*, 2004). En este estudio, se obtuvo como resultado que el ácido oleico, AGL que incrementa la actividad de UCPs, competía con el GDP, conocido inhibidor de las mismas, con una cinética de competencia simple. En adición, el ácido oleico se comportaba como activador en una mitocondria con UCPs inhibidas por GDP. Fedorenko *et al.* (2012) muestran en su trabajo que los AGLs aniónicos de cadena larga se unen a la UCP-1 para que se produzca el paso de H^+ , posiblemente por medio de “cables de agua” o *water wires* (Nagle y Morowitz, 1978; Cukierman, 2003), pero no se disocian fácilmente, recordando a un cofactor. Estos resultados respaldan los datos de Zhao *et al.* (2017) y Berardi y Chou (2014) que muestran que los AGLs interactúan en la parte lateral de las UCPs.

2.4.4 Congruencia entre los modelos

Dada la controversia de los estudios realizados con respecto al mecanismo de acción de las UCPs (principalmente realizados en UCP-1) es de vital importancia establecer una congruencia entre estos, es decir, proponer un mecanismo con las evidencias en común. Basándose en los últimos estudios publicados con respecto al tema en cuestión (Fedorenko *et al.*, 2012; Berardi y Chou, 2014 y Zhao *et al.* 2017), el mecanismo propuesto para las UCPs es que la cabeza aniónica de los ácidos grasos saturados de cadena larga (C_{16}) interactúa lateralmente con el surco formado por las partes que dan al lado de la matriz mitocondrial de H1 y H6 gracias a la carga positiva de residuos, ayudando al pasaje de los H^+ , sin que se disocie. Además, las UCPs pueden servir como transportador de ácidos grasos de cadena corta. En contraste, el GDP o algún otro nucleótido fosfato sería un inhibidor que se localiza en el poro e impide que el AGL pueda interactuar con la UCP.

2.5 Proteínas desacoplantes y su relación funcional con los AGPIs

Todas las células eucariotas presentan UCPs. Sin embargo, los mamíferos presentan sólo cinco homólogos: UCP-1,2,3,4 y 5 - esta última también llamada BMCP1 - (Krauss *et al.*, 2005), de los cuales los primeros tres serán tratados en esta revisión por su semejanza en secuencia, estructura y supuesta función molecular. En adición, es claro que estas tres de alguna manera forman parte del mecanismo de “escape” de protones hacia la matriz mitocondrial, pero sus repercusiones fisiológicas son distintas (Erlanson-Albertsson, 2003); por consiguiente, las proteínas UCP-1,2 y 3 serán discutidas en este apartado y la implicancia que los AGLs, en especial los AGPIs, tienen en estas. Finalmente, no se toman en cuenta estudios de expresiones genéticas (se sabe claramente que la expresión de las UCPs es exacerbada por los AGPIs), sino sólo los relacionados a la actividad, ya que son los únicos relevantes en el panorama del presente estudio.

2.5.1 Proteína desacoplante 1 (UCP-1)

Esta es la UCP que primero se descubrió y es en la que los estudios se han centrado más. Sin embargo, ya que no es la UCP a tratar, se describirán sus repercusiones fisiológicas más relevantes.

Esta proteína se encuentra principalmente en la GM y tiene un rol relevante en la termoregulación, es decir que mediante el “desacoplamiento” de la cadena transportadora de electrones, promoviendo la oxidación de sustratos sin generar ATP y por ende, el aumento de la generación calórica celular (Cannon y Nedergaard 2004). Además, se tiene conocimiento que su vida media es de 30 horas (Puigserver *et al.*, 1992). Es importante mencionar que el frío activa a UCP-1 mediante el sistema nervioso simpático y en adultos genera un “pardeamiento” de la grasa blanca para activar a UCP-1 (Nedergaard y Cannon, 2014). En adición, debido a su actividad termogénica, modula de forma periférica el balance energético mediado por hormonas tiroideas, incrementando la tasa de gasto energético, entre otros parámetros antiobesogénicos (Alvarez-Crespo *et al.*, 2016). Finalmente, existen referencias que muestran que la estimulación de esta proteína puede ser importante para el control de la hipergliceridemia e hiperglucemia (Bartelt *et al.*, 2011; Giralt y Villarroya, 2016; Mossenbock *et al.*, 2014).

El impacto de la dieta frente al potencial de esta UCP está documentado ampliamente. Bonet *et al.* (2017) publicaron una excelente revisión al respecto, mencionando a factores como el contenido dietario de macronutrientes, cafeína, resveratrol, vitamina A entre otros. Es importante resaltar, que se ha mencionado en párrafos anteriores, la interacción de AGLs con UCP-1 y su importancia para la función de la proteína. Sin embargo, el trabajo se centrará específicamente en los ácidos grasos polinsaturados (AGPIs).

Se dice que la actividad de la UCP-1 se incrementa por los ácidos grasos, por ejemplo, se da un aumento de diez veces la termogénesis cuando se suministra AGLs en mitocondrias aisladas de tejido de GM pero no cuando las células no presentan el gen (Matthias *et al.*, 2000). Adicionalmente, Beck *et al.* (2007) muestran que los AGPIs tiene un potente rol activador en la conductividad de protones a través de la UCP-1. Estos investigadores utilizaron proteínas recombinantes y las aislaron en membranas bilipídicas artificiales, probando la corriente del sistema, en presencia de AGLs con alguna clase de insaturación, mostrando que los AGPIs, como el ácido retinoico y el docosahexaenoato (un omega 3) aumentan el paso de protones, especialmente el último.

2.5.2 Proteína desacoplante 2 (UCP-2)

La proteína UCP-2 comparte una identidad aminoacídica de 59 por ciento con UCP-1, siendo su homóloga más cercana y es la única con estructura elucidada mediante una técnica experimental (Berardi *et al.*, 2011), lo que la hace muy atractiva como molde para el modelado estructural de las otras UCPs. Sin embargo, su vida media es mucho más baja que la de UCP-1, siendo de 30 minutos (Rousset *et al.*, 2007; Azzu *et al.*, 2010a). Esta proteína ha sido encontrada en múltiples tejidos, como el cerebro, páncreas, hígado, tejido adiposo, bazo, células inmunes, sistema nervioso central y riñones (Donadelli *et al.*, 2014), a diferencia de UCP-1 y 3, lo que sugiere que su repercusión fisiológica es distinta.

Se dice que la principal función de la UCP-2 puede ser la disminución de la concentración celular de EROs debido al decremento de la fuerza protón motriz y, por ende, producir un efecto citoprotector. Emre *et al.* (2007) y Diao *et al.* (2008) ponen en evidencia dicho efecto al comparar ratones con la proteína *versus* ratones sin ella. En adición, La citoprotección por UCP-2 ha sido avalada por estudios más recientes como los realizados por Jabůrek *et al.* (2018). Por otro lado, cabe mencionar que UCP-2 está involucrada en la prevención de la formación de la placa aterosclerótica, ingestión alimenticia y desórdenes

metabólicos, cáncer y mejora de la respuesta inmune ya que presenta un rol antioxidante (Donadelli *et al.*, 2014).

Es importante resaltar que al igual que UCP-2 tiene como potenciadores a los EROs (Donadelli *et al.*, 2014), se conoce que es activada por los AGLs (Jabůrek *et al.* 1999; Berardi y Chou, 2014) y que los AGPIs como los omega-6 y omega-3 (esencialmente docosahexaenoato) incrementan su actividad considerablemente (Zackova *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2007), como se mencionó para UCP-1, párrafos arriba.

2.5.3 Proteína desacoplante 3 (UCP-3)

La proteína desacoplante UCP-3 fue la última, de estas tres, en ser descrita (Boss *et al.*, 1997) y la menos estudiada (no hay publicaciones respecto a su estructura ni relacionados) expresándose en el músculo esquelético, GM y tejido del corazón (Busiello *et al.*, 2015) y con una vida media de entre 30 minutos a cuatro horas (Azzu *et al.*, 2010b). Krauss *et al.* (2005) manifiestan que tiene un porcentaje de identidad de 73 por ciento con UCP-2 y 57 por ciento con la UCP-1. Esta similitud y ciertas publicaciones (Boss *et al.*, 1997; Garvey, 2003) alientan a pensar en la convergencia de funciones. Sin embargo, hay evidencia contradictoria. Por ejemplo, que una alta expresión del gen no se relaciona necesariamente con un desacoplamiento en la mitocondria (Cadenas *et al.*, 1999) y que los ratones *knock-out* (no presentan el gen) no tienen problemas en termoregulación ni son obesos (Gong *et al.*, 2000; Vidal-Puig *et al.*, 2000).

Son *et al.* (2004), Costford *et al.* (2006) y Fink *et al.* (2007) mostraron que ratones con sobreexpresión de UCP-3 fueron menos eficientes en el metabolismo sin presentar más hambre y presentaban una resistencia a generar obesidad en una dieta alta en grasa. Además, se ha reportado que cuando el gen UCP-3 está sobreexpresado, el músculo imita la condición de ejercicio incrementando la actividad espontánea y el gasto energético (Aguer *et al.*, 2013). Busiello *et al.* (2015) publicaron una revisión bastante completa de la UCP-3, el metabolismo energético y la diabetes tipo 2.

Se conoce que UCP-3 confiere una protección ante el estrés oxidativo disminuyendo la fuerza protón motriz (desacoplamiento), la causa principal de la generación de los EROs (Korshunov *et al.*, 1997), sobre todo en músculo esquelético en condiciones de incremento en la oxidación de AGLs (Bézaire *et al.*, 2007; Cioffi *et al.*, 2009). En adición, Goodpaster

et. al. (2001) y Patti y Covera (2010) muestran que la falta de expresión del gen promueve la acumulación de AG y sus metabolitos, fenómeno asociado con el incremento del estrés oxidativo. Los mencionados investigadores señalan que este incremento guarda estrecha relación con el desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo 2. Sumados a la revisión de Busiello *et al.* (2015), los reportes más recientes no sólo avalan la función protectora, sino que muestran que la UCP-3 está involucrada en la resistencia a hipoxia-reoxigenación (proceso que genera daño oxidativo), como lo menciona Braun *et al.* (2015) en células renales y Chen *et al.* (2014), en células cardíacas.

Goglia y Skulachev (2003) postularon que la protección al daño oxidativo puede estar relacionada a la supuesta función de UCP-3 de transportar peróxidos de AGLs fuera de la matriz mitocondrial, evitando el deterioro de funciones de otros componentes vitales para la mitocondria, siendo validada por Lombardi *et al.* (2010) en ratones con presencia y ausencia del gen. En adición, su rol en el metabolismo puede comprender resistencia a obesidad y protección contra dietas altas en grasas, simulación de una fisiología deportiva gracias a la elevada expresión del gen y una eficiencia mejorada en el metabolismo energético del individuo (Braun *et al.*, 2015).

Finalmente, Jabůrek *et al.* (1999) demostraron que los AGLs son responsables del flujo de protones a través de la MIM en UCP-3, determinando que las tres UCPs se activan y comportan de manera similar. Además, al igual que los reportes de las otras UCPs, los AGPIs tiene una repercusión positiva en la actividad de UCP-3, como los omega-6 y 3, (Zackova *et al.*, 2003). La falta de publicaciones al respecto resalta la necesidad del presente estudio.

2.6 Modelado y simulación *in silico* de proteínas

En la actualidad, y gracias al poder computacional creciente, las herramientas *in silico* para el análisis y modelado de sistemas biológicos son cada vez más usadas en la literatura y por los profesionales especialistas o usuarios. En esta sección, se pretende introducir la teoría necesaria para entender los métodos de este trabajo. Si se desea ahondar en el tema, se recomienda revisar los libros de Kukol (2008) y Gromiha (2010).

2.6.1 Modelado estructural *in silico*

El modelado estructural de proteínas tiene como objetivo poder predecir la estructura por medio de su secuencia, de tal manera que la resolución o exactitud alcanzada sea comparable con la experimental, de tal manera que estudios funcionales, evolutivos y demás puedan ser correctamente realizados. Esto puede obtenerse por tres enfoques: modelado por reconocimiento de plegamiento (MRP), desde el principio (*ab initio*) y comparativo o por homología (MH).

El modelado por MRP se basa en encontrar relaciones entre las secuencias y las estructuras ya existentes, pero que no necesariamente sea obvia dicha relación (Godzik, 2005). Es decir, proteínas poco relacionadas pueden adoptar conformaciones o plegamientos muy similares.

Las técnicas que usan el enfoque *ab initio* toman como premisa que las conformaciones ideales de las proteínas pueden ser establecidas sólo por la secuencia aminoacídica que presentan y las leyes físicas que determinan el plegamiento, tratando de lograr la estabilidad energética (Chivian *et al.*, 2005). Expresado de esta manera, se podría pensar que son muchas las posibilidades de conformación que se deben calcular, sin embargo hay evidencia de los ángulos de torsión más comunes de ciertos residuos en determinadas estructuras.

Por último, MH es el método o enfoque más simple que se basa principalmente en dos observaciones (Krieger *et al.*, 2003). La primera es que la estructura de las proteínas está determinada solamente por su secuencia aminoacídica; y la segunda asunción argumenta que la estructura es mucho menos cambiante que la secuencia a lo largo de la evolución. Lo que quiere decir que secuencia similares producen plegamientos y, por ende, estructuras similares.

En la práctica, estos tres enfoques se utilizan en determinados pasos del modelado automatizado, mejorando el alineamiento entre homólogos con los métodos MRP y el enfoque *ab initio* para predecir bucles en la estructura. Más aun, el uso de Dinámicas Moleculares (DM) para perfeccionar el resultado.

Con la finalidad de poder evaluar qué tan preciso ha resultado el modelo, se pueden utilizar comparaciones topológicas o de posición (Kufareva y Abagyan, 2012) con respecto a la estructura de referencia. Por ejemplo, la raíz cuadrada del promedio de la desviación cuadrática (RMSD del inglés *Root Mean Square Deviation*) de las posiciones de los carbonos alfa del esqueleto entre dos moléculas:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

donde n es el número de pares de átomos y d_i es la distancia entre los átomos del par i -ésimo. Se dice que dos secuencias que tengan entre el 50% y el 90% de identidad podrán tener una estructura que no difiera más del 1.5Å en el RMSD (Krieger *et al.*, 2003), por ejemplo, en el caso de modelar una estructura basada en otra.

En adición, el gráfico de Ramachandran es un indicador visual que permite verificar la calidad estereoquímica de una estructura proteica (Sasisekharan, 1962; Hollingsworth y Karplus, 2010). Asumiendo que los átomos son esferas con radio definido y tomando en cuenta que toda proteína tiene un esqueleto definido por sus carbonos alfa, todos estos carbonos presentan dos ángulos diedros que se obtienen de medir el ángulo que existe entre los enlaces del carbono alfa con el carbono y el nitrógeno del enlace peptídico con el plano imaginario que forman los átomos de este enlace (peptídico). Estos ángulos pueden tomar valores entre -180 a 180 grados (excluyendo los residuos extremos), ϕ (*phi*) y ψ (*psi*), como muestra la Figura 1A. Estos valores son graficados en un plano cartesiano de dos dimensiones de tal manera que las ordenadas corresponden a los valores de ψ y las abscisas a ϕ (Figura 1B), sin contar con los residuos prolina o glicina. Cuando se toman un gran grupo de estructuras con una resolución no mayor a 2Å, se generan regiones en las que los puntos (ϕ, ψ) se agrupan, concibiendo a estas regiones como las “permitidas” estereoquímicamente. Contrastando con datos teóricos, se pueden generar regiones que son cercanas a las permitidas, tomando los radios de los átomos como los mínimos posibles. Una estructura excelente debería tener el 90% o más de los puntos (ϕ, ψ) en las zonas permitidas (Laskowski *et al.*, 1993).

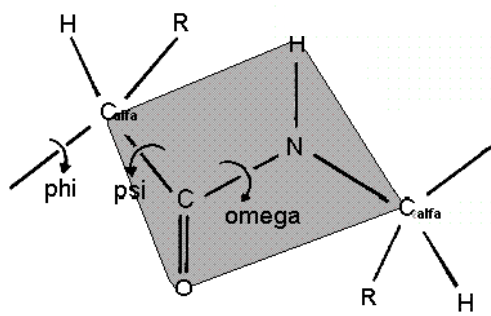
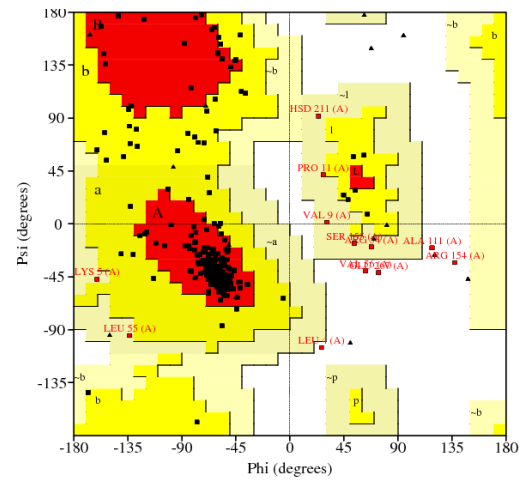
A**B**

Figura 1: Estereoquímica de las proteínas.

En A, el carbono alfa se une al carbono unido al oxígeno del enlace peptídico formando un ángulo psi (ψ) y al nitrógeno del enlace peptídico formando el ángulo phi (ϕ). El plano sombreado esquematiza que el enlace peptídico forma un plano, por lo que el ángulo omega (ω) es, en valor absoluto, 180° . B muestra el gráfico de Ramachandran que se crea gracias a las coordenadas (ϕ, ψ). En él, existen regiones en las cuales los valores de las coordenadas (ϕ, ψ) pueden caer sin que existan aberraciones estereoquímicas en la estructura (zonas coloreadas) y regiones (sin color) en las que no debería haber ningún punto (ϕ, ψ).

2.6.2 Análisis *in silico* estructural de proteínas

Existen diversos análisis computacionales que se pueden hacer partiendo de la estructura para obtener información sobre un objetivo en particular, el objetivo de la investigación. Se expondrán dos métodos que permiten entender la metodología de la presente investigación y cumplen con el objetivo de dilucidar el comportamiento del poro en los canales de membrana, así como la interacción proteína-ligando.

El análisis del área superficial accesible al solvente (ASAS) nos muestra qué tanta superficie de la proteína estaría en contacto con un solvente determinado (Lee y Richards, 1997). Entonces, asumiendo que los átomos del sistema son esferas de van der Waals, los átomos de la proteína presentan radio r_p (distinto para cada tipo de átomo) y que una molécula de solvente con radio r_s “rueda” por toda la superficie, ASAS se define como la superficie de la esfera de radio $R = r_p + r_s$ en todo punto en el que el solvente está en contacto con un átomo de la proteína sin superponerse con otro (Gromiha y Ahmad, 2005).

Por ejemplo, si se calcula el área de residuos hidrofílicos, se sabría qué tan “disponible” está la molécula para interactuar con el agua.

Otro análisis estructural muy útil es el análisis de la cavidad del poro, tanto en sus dimensiones como en su dinámica. El algoritmo HOLE (Smart *et al.*, 1996) es utilizado para predecir poro en proteínas de canales y calcular el radio a lo largo de su trayectoria; tomando también los átomos como esferas con sus respectivos radios de van der Waals. Este procedimiento comienza buscando la esfera con el radio más amplio al inicio de la proteína, para después “desplazar” esa esfera a lo largo de todas las coordenadas de la trayectoria. Gracias a ello, se pueden visualizar diferencias en el radio del poro, así como otros parámetros de interés para los investigadores. En adición, si el objetivo de la investigación lo amerita, pueden realizarse, por medio de otras técnicas, análisis de presencia de agua o puentes de hidrógeno, que no hubieran sido posibles sin haber establecido previamente la estructura del poro. Entonces, establecer el radio a lo largo de la trayectoria del poro nos permite estimar la dinámica del mismo y su relación con otras moléculas, es decir, lo que ocurre en él.

Por último, el estudio de la proteína y su interacción con algún ligando de interés es crucial en estudios funcionales. El método de acoplamiento molecular predice el sitio de unión y la conformación más favorable del ligando en la proteína objetivo (López-Vallejo *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011). La identificación de la conformación de acoplamiento o unión más favorable se realiza en dos pasos: la exploración del espacio conformacional que representan varios modos o conformaciones de acoplamiento y la predicción de la energía de interacción asociada a los estados de conformación (Ferreira *et al.*, 2015). Por consiguiente, se puede saber la interacción entre los átomos del ligando y los residuos de la proteína y su estructura y posición, esclareciendo la interacción.

2.6.3 Dinámicas moleculares de proteínas

Gracias al avance en poder de cómputo, los cálculos de ecuaciones complejas se han resuelto con aproximaciones de métodos numéricos. Este progreso se ha reflejado en la resolución de modelos relacionados a la biología o química (o física) estructural. La DM no es más que la resolución de la física de Newton (segunda Ley de movimiento) aplicada a un sistema de átomos tomados como esferas rígidas. Este enfoque tiene muchas aplicaciones prácticas como diseño de fármacos basados en la estructura, refinamiento de

modelos estructurales, resolución de mecanismos enzimáticos, entre otros (Hospital, *et al.*, 2015).

La literatura clásica de la DM nos remite al libro escrito por Allen y Tildesley (1987). En este trabajo se muestran las bases de este enfoque, las cuales se introducirán en esta sección. Si se conoce la fuerza que repercute en cada átomo, se puede hallar la aceleración de los mismos. Luego, al conocer la aceleración, se puede integrar la ecuación de movimiento arrojando la trayectoria y velocidades de cada átomo. La fuerza F de cada átomo se describe como el negativo de la variación de la energía potencial (gradiente V), como sigue:

$$F = -\Delta V$$

Entonces, el gradiente puede utilizarse para determinar la posición de cada partícula de masa m_i y posición r_i

$$\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

de tal manera que se calculan por cada paso de simulación que se da, una y otra vez.

De esta manera, para calcular los campos de fuerzas de sistemas biológicos comprendidos por miles y miles de átomos se utilizan ecuaciones semi-empíricas. Si bien, hay disponibles varias aproximaciones de campos de fuerza, se describirá principalmente el campo de fuerza CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*), ya que se ha usado en este trabajo, tiene más de 25 años y se actualiza constantemente (MacKerell *et al.*, 1998).

Dado el número de átomos de un sistema biológico (como mínimo, más de 1000) se necesita una función para poder calcular la energía potencial, de tal manera que nace el concepto de la función de energía potencial. Esta es la suma de dos términos, energía potencial asociada a los enlaces o energías enlazantes y las no asociadas a los enlaces (energías no enlazantes):

$$V = V_{\text{enlaces}} + V_{\text{sinenlaces}}$$

De modo que el resultado se considera la suma de estas dos energías.

La energía potencial asociada a los enlaces de los átomos está descrita por la suma de las energías potenciales de los enlaces, de los ángulos y ángulos diedros, modelados los átomos como si fueran esferas unidas por resortes:

$$V_{\text{enlaces}} = \sum_{\text{pares}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{ángulos diedros}} K_\varphi (1 - \cos(n\varphi))$$

En donde K_b es la constante de rigidez asociada a la posición inicial o ideal b_0 con respecto a la final b (desplazamiento), K_θ la constante asociada al movimiento del ángulo θ de un tres de átomos contiguos y K_φ es la constante de rigidez de la torsión de los ángulos diedros, es decir, el ángulo φ que se forma entre dos átomos de un grupo de cuatro, unidos por tres enlaces covalentes consecutivos.

Por otro lado, se contemplan, también, términos no asociados a los enlaces, como son la energía de van der Waals y la electrostática, en la ecuación siguiente:

$$V_{\text{sin enlaces}} = \sum_{\text{pares sin enlaces}} 4 \epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ik}}{r_{ik}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ik}}{r_{ik}} \right)^6 \right] + \sum_{\text{pares sin enlaces}} \frac{q_i q_j}{Dr_{ij}}$$

El primer término es la ecuación general del potencial de Lennard-Jones y el segundo el potencial electrostático de Coulomb. En adición, el campo de fuerza CHARMM contempla dos términos más, la energía asociada a los ángulos diedros impropios o planos y la energía potencial de Urey-Bradley, tomando en cuenta la flexión de un átomo respecto de otro cuando están unidos a través de dos enlaces covalentes consecutivos.

$$E_{\text{impropios}} = \sum K_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

$$E_{\text{Urey-Bradley}} = \sum K_u (u - u_0)^2$$

En donde K_ω es la constante de rigidez de la formación del ángulo ω cuando se desvía del plano y K_u la constante de fuerza de flexión asociada a la posición u .

Es muy importante resaltar que los archivos proporcionados por CHARMM tienen los datos para cada átomo como el tipo de enlace, el largo del enlace en equilibrio, los radios de van der Waals, las constantes y las cargas. También, los sistemas biológicos se suelen simular en condiciones constantes de moléculas, temperatura y presión y generalmente se utiliza el parámetro de condiciones de límite lo cual repite el sistema completo infinitamente por el espacio tridimensional, evitando que los átomos de los linderos lleguen a “salir” del sistema por sus mismos movimientos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelado estructural por homología de UCP-3 de humanos

Se utilizó la secuencia de aminoácidos AAC51367.1 del NCBI de la proteína UCP-3 de humanos y se modeló por homología utilizando la estructura de UCP-2 de ratón (PDB ID: 2LCK). El servidor de modelado automático I-TASSER fue utilizado como herramienta para construir la estructura de UCP-3 ya que tiene un amplio uso, aceptación y su precisión es equivalente a los resultados obtenidos por científicos expertos (Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015). En adición, tiene el primer puesto como software de modelado de proteínas en la última reunión de evaluación crítica de técnicas para predicción de la estructura proteica (CASP: *Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*), así como en ediciones anteriores. Estas reuniones tienen el aval del centro de predicción de estructura proteica (*Protein Structure Prediction Center*), disponible en la página oficial <http://predictioncenter.org/>.

La validación *in silico* del modelo fue realizada por medio de RMSD de la estructura de UCP-3 versus la de UCP-2. Se utilizó la primera alfa hélice como criterio de alineamiento (del residuo 16 al 41) ya que es una región común, estructuralmente hablando, en ambas moléculas, facilitando que puedan superponerse y optimizando el alineamiento y el cálculo del RMSD. Este procedimiento fue llevado a cabo en el programa VMD v1.9.3 para GNU/Linux (Humphrey *et al.*, 1996). En adición, se generó el gráfico de Ramachandran, con el programa PROCHECK v3.5.4 (Laskowski *et al.*, 1993) para determinar si la estructura resultante del modelado fue adecuada.

3.2 Generación de mutantes estructurales de UCP-3

Se alinearon las secuencias de las UCPs de humano, ratón, rata y hámster (Anexo 1) utilizando el algoritmo Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) y el visualizador SeaView v4.5.4 (Galtier *et al.*, 1996; Gouy *et al.*, 2010), para determinar los residuos que

correspondería reemplazar en UCP-3, basados en el trabajo de Ehtay *et al.* (2000). El modelo estructural de UCP-3 fue reemplazado en los aminoácidos identificados previamente, usando el programa VMD v1.9.3 para GNU/Linux (Humphrey *et al.*, 1996) a través del complemento MUTATOR v1.3. Adicionalmente, la estructura de las proteínas mutantes se validó *in silico* como se explica en el punto 3.1.

3.3 Ensayo de dinámicas Moleculares

La estructura proteica obtenida del modelado por homología de la UCP-3 fue embebida en una membrana bilipídica de fosfatidil oleoilfosfatidilcolina (POPC del inglés *phosphatidyl oleoylphosphatidylcholine*) para después agregar moléculas de agua de acuerdo al modelo propuesto por Jorgensen y *et al.* (1983) y neutralizar el sistema con cloruro de sodio bajo condiciones periódicas de borde, utilizando VMD v1.9.3 para GNU/Linux (Humphrey *et al.*, 1996).

El campo de fuerza CHARMM22 optimizado para evaluar mejor la interacción de los contraiones con los oxígenos de los grupos carbonilos, por Noskov *et al.* (2004) fue utilizado en condiciones de límites periódicos y NPT (número de moléculas, presión y temperaturas constantes). Se utilizó, además, NAMD v2.9 (Phillips *et al.*, 2005) para aplicar una minimización al sistema en dos tiempos. Primero se procedió a minimizar en 1000 pasos el sistema con la proteína fija y luego se procedió a minimizar 20000 pasos con una restricción armónica en la proteína, es decir, simular que está cristalizada. Luego, se sometió al sistema a 10 nanosegundos (ns) de simulación de DM, liberando gradualmente las estructuras secundarias de la UCP-3, ya que se restringieron con una fuerza de 0,5 kcal/molÅ². El proceso del cálculo de la DM fue llevado a cabo en el Cluster HP del Centro de Bioinformática y Simulación Molecular de la Universidad de Talca (Talca, Chile). Todos los pasos anteriores fueron replicados en los mutantes. Los detalles de los parámetros de la simulación se encuentran en el Anexo 2.

Para la validación *in silico* de la DM, se tomaron los parámetros de energía total, temperatura, promedio de la presión acumulada y RMSD generados en VMD. En el caso de los cálculos del RMSD para la DM, los resultados se obtienen al comparar la estructura en un momento de la simulación (t=i) con ella misma pero en la conformación inicial de la dinámica molecular (t=0).

3.4 Análisis de poro y dinámica de agua en el poro de UCP-3 y mutantes

Para este análisis, se tomó el último 75% de los datos, que equivale a 7,5 nanosegundos en las dinámicas moleculares, de cada estructura para los análisis posteriores. El ASAS fue calculado para los residuos cambiados. El perfil de dimensión del poro se estableció utilizando el algoritmo HOLE (Smart *et al.*, 1996) aplicado a la proteína silvestre y a cada mutante cada 0,5ns del 75% de la simulación, Para analizar el perfil de la dimensión del poro (radio) a través de un vector *coor* (concebido como el eje o línea que recorre el poro) se promedió los valores del radio (en Å) de la simulación que correspondían al mismo valor del vector *coor* (cada paso de simulación arrojó un valor de radio en un punto *i* del vector *coor* y estos se promediaron, así para cada valor de *i*) de tal manera que se sitúa el lado del espacio intermembranal de la proteína en el extremo negativo de *coor* y la matriz mitocondrial en el extremo positivo.

En adición, al analizar la dinámica del agua, se anotaron las frecuencias de los puentes de hidrógeno con los residuos del poro de UCP-3 y el número promedio de moléculas de agua presentes en el eje del mismo en un radio de 5Å de distancia, también, cada 0,5 ns del 75% de la simulación.

3.5 Simulación de la interacción proteína ligando (*docking*) de UCP-3 y mutantes con el ácido graso omega 3 DHA (ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico)

La estructura del ácido graso omega 3 DHA (ligando) fue extraída de la base de datos *Protein Data Bank* y corresponde al identificador de HXA. Este archivo de coordenadas fue transformado a formato PDB con el recurso openbabel v2.3.2 (O'Boyle *et al.*, 2011) y se generó la ionización eliminando el hidrógeno del grupo carboxilo con el programa de edición molecular Avogadro v1.1.1 (Hanwell *et al.*, 2012). En adición, los archivos estructurales de las proteínas fueron tomados del último marco de simulación de cada una, es decir la última “foto” del sistema. Entonces, tanto las macromoléculas como el ligando fueron “preparados” para los procesos posteriores con AutoDockTools (Morris *et al.*, 2009). Finalmente, se usó AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), programa que usa el algoritmo genético en ligandos flexibles, para encontrar el mejor acoplamiento proteína-ligando, tomando los archivos anteriores (cada proteína con el DHA).

Se estableció un número máximo de diez conformaciones para el DHA obtenidas con AutoDock Vina, tomándose el mejor acoplamiento, es decir, la conformación con menor energía de acoplamiento (termodinámicamente más favorable). El volumen molecular del receptor (parte de la molécula) en donde se realizaron los cálculos de acoplamiento fue establecido tomando como referencia a los residuos arginina R59 y lisina K274 de UCP-3. Esto se determinó ya que son homólogos a los residuos lisina K56 y K269 en UCP1 y arginina R60 y lisina K271 en UCP-2, descritos como muy importantes en la interacción con los AGLs (Berardi y Chou, 2014 y Zhao et al., 2017).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Modelo estructural del fenotipo silvestre de UCP-3 (UCP-3_WT)

Se obtuvo un modelo estructural de UCP-3 de humanos (nombrado UCP3_WT, Figura 2) utilizando como patrón o molde la estructura establecida experimentalmente de UCP-2 (Berardi *et al.*, 2011). La UCP3_WT, al ser comparada con el patrón, tuvo un RMSD de 0.3189 Å, lo cual sugiere una estructura muy parecida (Krieger *et al.*, 2003), como se muestra en la Figura 3.

Por consiguiente, se puede apreciar (Figura 2 y 3) que efectivamente UCP3_WT tiene seis dominios alfa hélices conectados por tres asas de un lado y dos del otro, como señala Sluse, (1996). En adición, los extremos de la secuencia se encuentran al mismo lado y opuestos a las tres asas largas con la presencia de tres alfa hélices pequeñas (anfipáticas) en la cara matricial, como se observó para UCP-2. Además el modelo de UCP3_WT presenta otras características estructurales de la MACF, como la presencia de seis dominios en alfa-hélice transmembrana conectados por tres asas hidrofílicas largas en un lado y dos asas hidrofílicas cortas en el otro (Sluse, 1996), una torcedura aguda de las hélices impares generadas por la prolina de la secuencia conservada P-X-[D/E]-X-X-[R/K] y que las alfa hélices cierran ligeramente el poro en el lado matricial del canal (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; Dahout-Gonzalez *et al.* 2003).

El gráfico de Ramachandran generado por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) para la estructura de UCP3_WT, presenta el 81% de los residuos que no son prolina ni glicina en las regiones más favorecidas, más aún, el 98,1% se encuentran en las regiones permitidas. En contraste, el 1,9% se encuentra en regiones prohibidas (no permitidas), resultando en una estructura estereoquímicamente aceptable (Laskowski *et al.*, 1993). El análisis detallado se encuentra en el Anexo 3.

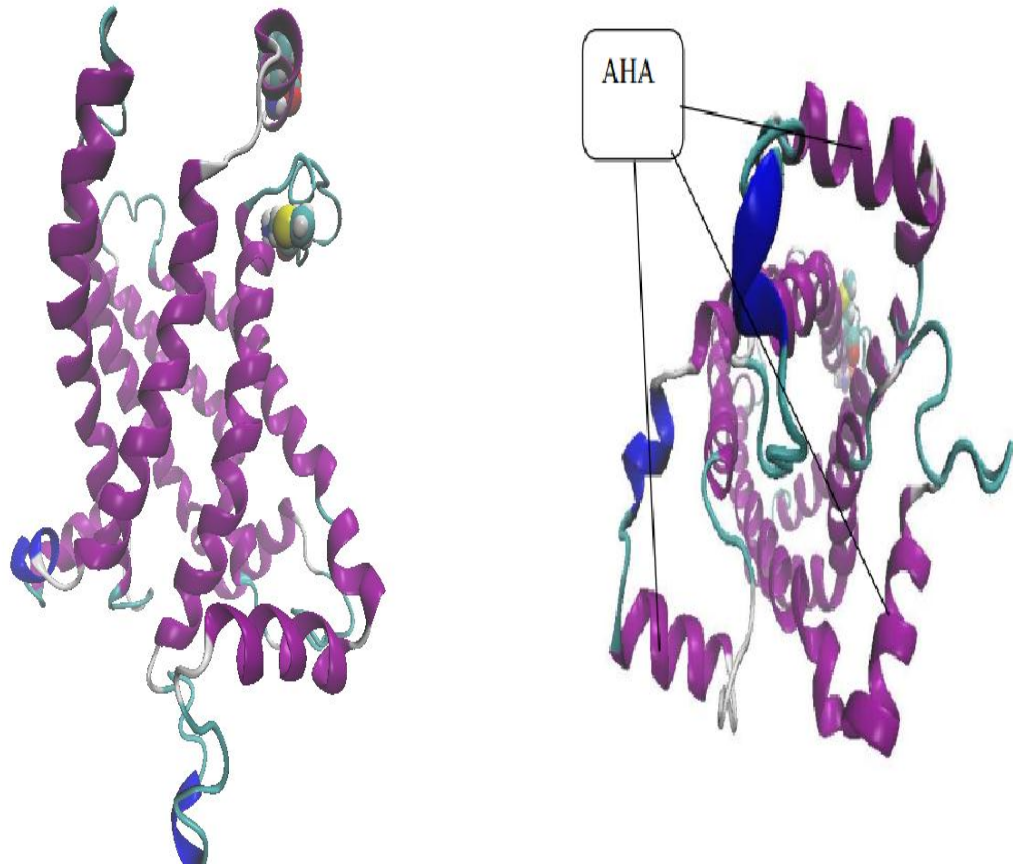


Figura 2: Estructura UCP3_WT.

El modelo estructural obtenido del modelado por homología, coloreado de acuerdo a su estructura secundaria, tomando a las alfa hélices como moradas, hélices 3_{10} en azul, giros en celeste y bobinas en blanco (giros y bobinas no presentan estructura secundaria). Los residuos resaltados y coloreados por elementos corresponden al primero y último, señalando que esa parte está orientada a la zona intermembranal. A la izquierda se muestra la imagen de frente y la derecha, el lado que da hacia la matriz mitocondrial. AHA: Alfa hélice anfipática.

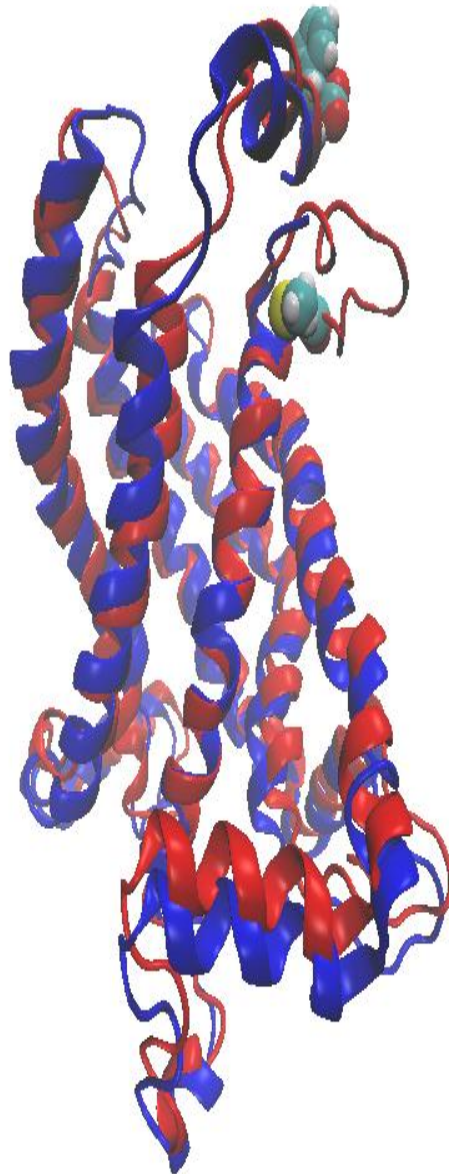


Figura 3: Alineamiento estructural del modelo de UCP-3 versus UCP-2.

Alineamiento entre 2LCK (UCP-2) en azul versus UCP3_WT en rojo que corresponde a una raíz cuadrada del promedio de la desviación cuadrática (RMSD) de 0.3189\AA . Los residuos resaltados y coloreados por elementos corresponden al primero y último, señalando que esa parte está orientada a la zona intermembranal de UCP3_WT.

4.2 Mutantes estructurales de UCP3_WT

Se identificaron los residuos relevantes para el estudio (Figura 4) y, por consiguiente, los residuos a cambiar. Siguiendo la nomenclatura de mutantes [RS1][num][RS2], en donde RS1 es el residuo presente en el fenotipo silvestre, num el número del residuo y RS2 el residuo al cual se ha mutado, las proteínas mutantes fueron: D28N, E173Q, D215N. Las estructuras mutantes resultantes fueron nombradas con la “M” seguido de la nomenclatura del cambio de residuo (M_D28N, M_E173Q, M_D215N).

Los residuos cambiados se basaron en los hallazgos de Ehtay *et al.* (2000), los cuales se resumen en el Cuadro 2. Estas mutaciones modificaron el flujo tanto de H⁺ como de iones Cl⁻ y están conservadas en todos los homólogos de las UCPs y entre especies (Anexo 1, Ledesma *et al.*, 2002), resaltando su relevancia en la función de las mismas. Así, los cambios de los residuos realizados en UCP-3 (Figura 4) se localizan en la misma región que en UCP-1 (Cuadro 2).

La validación de las estructuras de los tres mutantes arrojó un RMSD para todas las estructuras de 0.3189Å (igual que en la Figura 3 para el fenotipo silvestre) comparadas con 2LCK, mostrando un buen alineamiento estructural (Krieger *et al.*, 2003). Esto era de esperarse ya que sólo se modificó un residuo por estructura.

Los gráficos de Ramachandran generados por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) a una resolución de 2Å, muestran que las estructuras M_D28N; M_E173Q; M_D215N presentan un porcentaje de residuos en zonas permitidas de 98,1% con la misma distribución que UCP3_WT (Anexo 3). Por ende, se dice que tiene una estereoquímica adecuada para el propósito de la investigación (Laskowski *et al.*, 1993).

Cuadro 2: Mutaciones relevantes en la actividad de transporte de UCP-1.

UCP-1*	Posición	Flujo H ⁺ (%)**	Flujo Cl ⁻ (%)**	UCP-3
D27N	Alfa hélice 1	71,13	86,20	D28N
E167Q	Entre las hélices 3 y 4	96,91	4,00	E173Q
D209N	Entre las hélices 4 y 5	75,26	77,59	D215N

*Organismo estudiado: Hámster **Porcentaje con respecto al fenotipo silvestre

Fuente: Echtay *et al.* (2000)

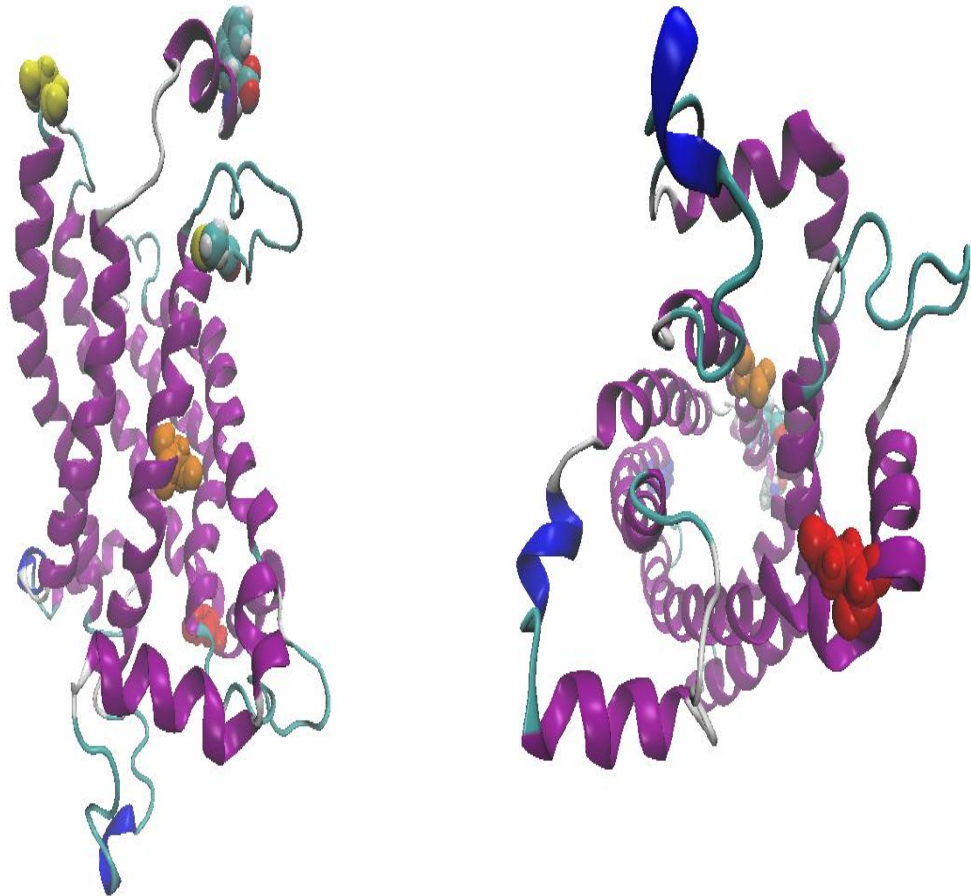


Figura 4: Residuos identificados relevantes para el estudio.

Modelo UCP3_WT en vista de frente (izquierda) y del lado de la matriz mitocondrial (derecha). Los residuos resaltados y coloreados por elementos corresponden al primero y último, mientras que los residuos relevantes D28, E173 y D215 son representados en naranja, rojo y amarillo, respectivamente. La estructura secundaria está coloreada de tal manera que las alfa hélices son moradas; hélices 3₁₀, azules; los giros, celestes y las bobinas, blancas.

4.3 Dinámicas moleculares

Se estableció el sistema previo a la simulaciones que consta de la UCP, membrana bilipídica POPC, agua e iones cloruro para cada estructura (Figura 5). Además, se analizaron los parámetros de RMSD, energía total, temperatura y presión durante los 10ns de simulación (Figura 6).

La medición del RMSD realizada en el esqueleto de la proteína fue en promedio 4.34Å; 4,05Å; 4,36Å y 4,70Å para las estructuras UCP3_WT (fenotipo silvestre), M_D28N, M_E173Q, M_D215N, respectivamente durante la dinámica molecular; con una desviación estándar menor a uno en todos los casos (Figura 6A). Además, en la Figura 6B se puede apreciar que la energía, varía entre valores cercanos y la media de los sistemas es muy parecida, ya que se diferencian en un residuo y en el número de iones que se utilizaron para neutralizar. En adición, la temperatura del sistema (Figura 6C) se mantiene constante en aproximadamente 37 °C (310 K) con una variación muy pequeña. Por último, la presión de los sistemas se mantiene constante en promedio a 1atm a lo largo de la simulación, con desviaciones estándares reducidas (Figura 6D).

En conjunto, estos datos nos muestran que la simulación ha conservado constantes los parámetros que se establecieron y por tanto su validez. La razón es que se asume que la proteína se encuentra en equilibrio termodinámico cuando se calcula (a lo largo de la simulación) que el RMSD promedio es pequeño y tiende a estabilizarse o a fluctuar poco (Anexo 4).

En adición al parámetro anterior, se asume que el sistema está en equilibrio termodinámico porque la energía total del sistema, si bien es muy variable, no muestra una fluctuación caótica, es decir, fluctúa entre límites superiores e inferiores muy parecidos y entre dos valores consecutivos del eje X, siempre cruza por el promedio, lo que sugiere que el sistema se mantiene equilibrado (Anexo 4). De no ser así, si la energía formase una línea con una pendiente descendente, podría decirse que el sistema sigue “buscando” o trata de alcanzar aún el equilibrio, tornándolo como un mal modelo para realizar predicciones.

Finalmente, la validación de DM se concretiza ya que los parámetros de temperatura y presión se mantuvieron como se le indicaron al programa en principio, con 310K de temperatura y 1atm de presión (Anexo 4).

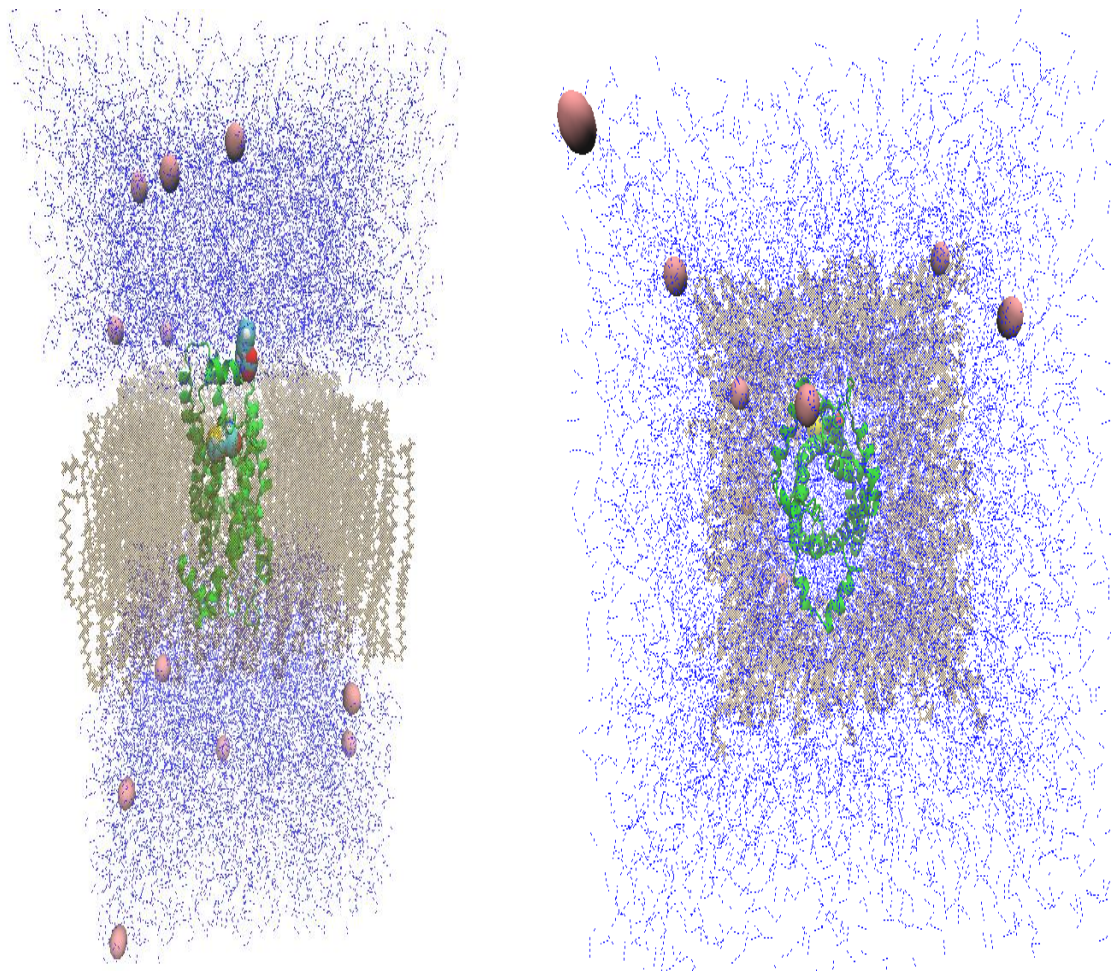


Figura 5: Sistema de UCP-3 con membrana, agua e iones en condiciones iniciales.

Imagen del sistema que se utilizó para las simulaciones, que consta de la UCP-3 (verde), moléculas de agua (azul) membrana bilipídica (marrón translúcido) e iones cloruro (rosado); de manera que cada estructura (UCP3_WT, M_D28N, M_E173Q, M_D215N) tuvo su sistema propio. A la izquierda se muestra una vista frontal del sistema y a la derecha la vista ventral o al lado de la matriz mitocondrial. Los residuos resaltados y coloreados por elementos corresponden al primero y último de la proteína (lado intermembranar).

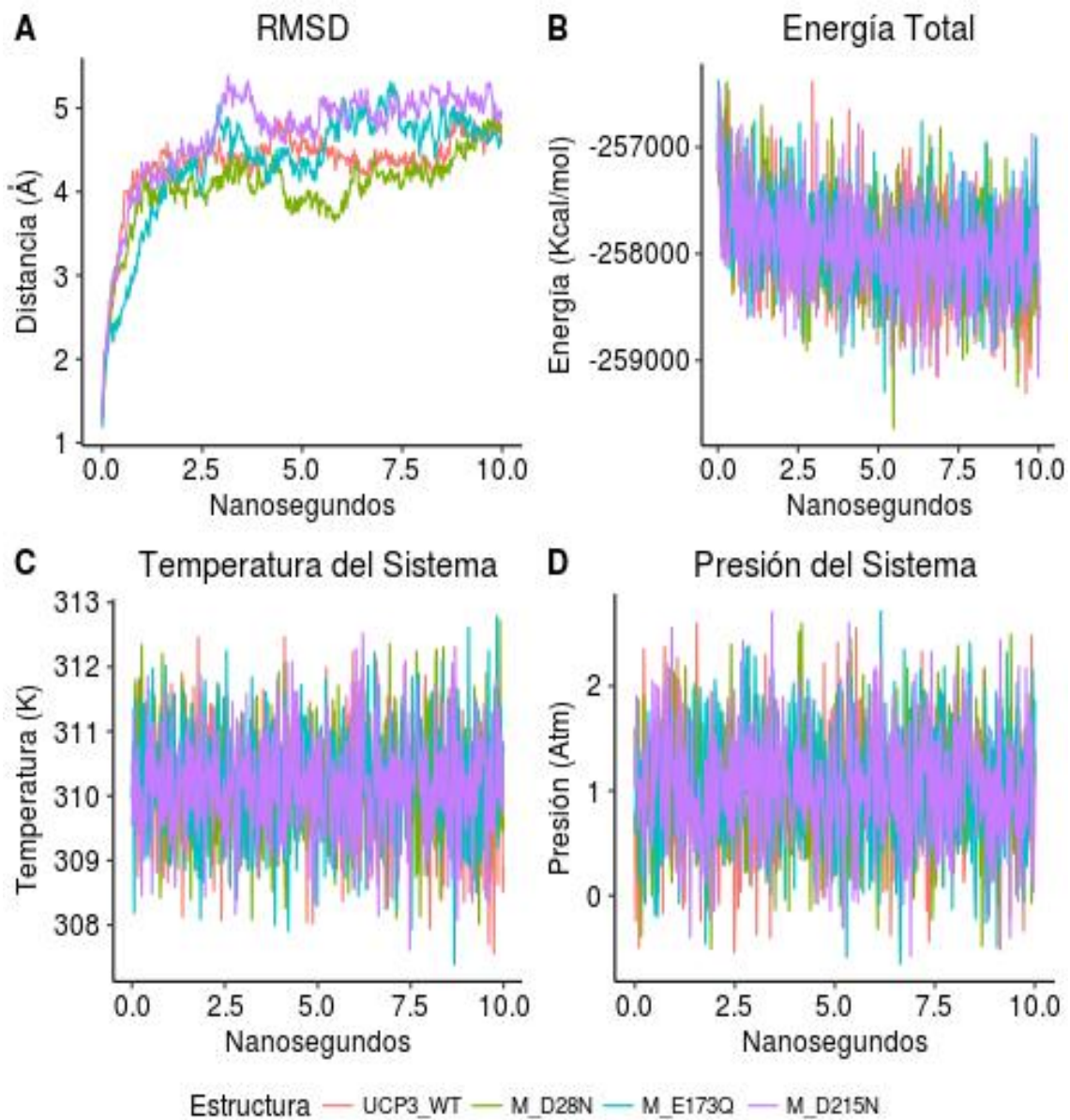


Figura 6: Parámetros de validación de la DM

Parámetros de la simulación para las cuatro estructuras. La estabilidad de la raíz cuadrada del promedio de la desviación cuadrática (RMSD, en A), de la temperatura (C) y presión (D) cumplen con los parámetros establecidos. Por otro lado, la energía del sistema (B) fluctúa entre valores siempre pasando por el promedio, lo cual denota una estabilidad dinámica. UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

4.4 Análisis de poro y dinámica de agua en el poro de UCP-3 y mutantes

El ASAS para los residuos cambiados se muestra en la Figura 7. En a se puede observar cómo en más de la mitad de la simulación la proteína mutante D28N disminuye el ASAS, al igual que el mutante D215N (C), pero este siempre fue menor. El mutante E173Q presenta un patrón de ASAS más parecido al fenotipo silvestre (B). En d de la misma figura, se puede apreciar que el cambio del ácido aspártico (D) por asparagina (N) genera una disminución en el promedio de ASAS (de $62,77\text{\AA}^2$ a $48,52\text{\AA}^2$ y de $118,55\text{\AA}^2$ a $59,80\text{\AA}^2$). Por último, las desviaciones estándares de los mutantes son mayores que en el fenotipo silvestre para cada residuo.

También, se sabe que tanto el aminoácido D como el N son hidrofílicos, pero se cree que la característica ácida de D es importante para acelerar el paso de los protones (Klingenberg *et al.*, 1999; Echtay *et al.*, 2000). Echtay *et al.* (2000) generaron el mutante D27E (mutando el ácido aspártico por el glutámico) y la actividad en el flujo de protones creció en mitocondrias aisladas pero disminuyó ligeramente en UCP-1 reconstituidas en vesículas fosfolipídicas. Cabe resaltar que el ASAS de E es mayor que D en alfas hélices (Lins *et al.*, 2003). Entonces, observando la disminución del valor de ASAS en el mutante, esta característica puede estar, también, relacionada al detrimento en el paso de protones cuando se merma el área de interacción. Así mismo, en el caso de la mutación D215N (homólogo a D209 de hámster en el estudio de Echtay *et al.*, 2000), se presenta una disminución en el flujo (Cuadro 2), lo cual podría ser explicado como se puntualizó para el residuo D28. Con lo que respecta al residuo cambiado E173Q, el valor de ASAS es muy parecido (Figura 7 C y D). El cambio entre residuos hidrofílicos (ácido glutámico a glutamina) representado en los estudios de Echtay *et al.* (2000), para el residuo E167, no tuvo un impacto notorio en el flujo de protones, pero si la mayor reducción en el transporte de cloruro (Cuadro 2). Gracias a esos datos en UCP-1, se cree que el transporte del ión cloruro y de protones tienen vías diferentes, y comparados con los datos de ASAS serían independientes de la superficie expuesta al solvente, pero no de la naturaleza ácida del residuo. En adición, ya que la posición de E173 reside entre las alfa hélices H3 y H4 (Cuadro 2) y que la interacción de los ácidos grasos de cadena larga (C_{16}), de la cual depende el paso de protones, se produce entre las hélices H1 y H6 (Berardi y Chou, 2014 y Zhao *et al.* 2017), la teoría de que el transporte de Cl^- y H^+ se dan por mecanismos o áreas espaciales distintas (Echtay *et al.*, 2000) se ve promisorio.

En el análisis del perfil del poro se obtuvieron promedios (y desviaciones estándares) en Å de 4,98 (3,18); 5,65 (3,54); 4,55 (3,34) y 5,53 (3,36), para el fenotipo silvestre (UCP3_WT), M_D28N, M_E173Q y M_D215N, respectivamente y la comparación morfológica de estas cuatro estructuras salta a la vista en la Figura 8. En un análisis netamente morfológico, se puede decir que el canal más largo es la del fenotipo silvestre, seguido de D28N, D215N, y por último E173Q; sumado a esto, en las regiones menos dinámicas (cerca a cero en coor) el radio más angosto es el de los mutantes D215N y E173Q, mientras que el fenotipo silvestre y D28N presentan el radio más amplio.

En la Figura 9 (A) se puede apreciar como en 12.5 de coor (lado matricial) se presenta el mínimo valor de radio del fenotipo silvestre (1,41Å con DE 0,84Å) representado como la zona más estrecha, y el máximo en el lado intermembranal (14,85Å; DE 0,03Å) con el valor en coor de -47,3, dibujada como la región más holgada (esta correspondencia morfológica se asumirá como tácita en el transcurso de la explicación). Así también, se obtuvieron promedios (y desviaciones estándares -entre paréntesis-) en Å del mutante D215N (d) sigue la misma lógica de orientación pero con valores de mínimo y máximo de 2,36 (0,26) y 14,84 (0,27), para valores de coor de 13,7 y -39,8, respectivamente. Por otro lado, los mutantes D28N (B) y E173Q (C) presentan los mínimos valores (Å) en el lado matricial (1,96, DE 0,97; 1,26, DE 0,47; respectivamente) y los máximos en el lado matricial para D28N e intermembranal para E173Q en Å (14,83, DE 0,01; 14,61, DE 0,25; respectivamente). Estos mínimos se sitúan en los puntos coor de -21,8 y -26,0, mientras que los máximos en -44,5 y 36,0; respectivamente.

Lo más resaltante es que la simple mutación de estos residuos influencia la dinámica y forma del poro, lo cual puede deberse que al modificarse ASAS, la conformación de la proteína varía (Durham *et al.*, 2009). Por ejemplo en el fenotipo silvestre (9A), se aprecia que en el lado intermembranal hay un radio notablemente más grande que en el lado matricial, ya que este se asemeja a una entrada cónica. También, los extremos del gráfico, que se consideran como las asas de la proteína situadas en la superficie de la membrana, son muy activas y la estructura del poro embebida en la membrana es bastante estable, ya que la desviación estándar es casi imperceptible. En el caso del mutante D28N (B), en la parte matricial, esta entrada cónica se pierde, así como el dinamismo en esa zona. La estructura M_E173Q tiene el cambio en el perfil del poro más notorio (C), ya que la región intermembranal comienza abruptamente, la forma del canal es más alargada y el lado

matricial es muy poco dinámico, al igual que M_D28N. Por último, la proteína mutante D215N (D) tiene las regiones menos activas que el resto y presenta una forma parecida a la del fenotipo silvestre, pero con un radio menor.

Sin embargo, si se toma en cuenta la información resumida en el Cuadro 2 (Echtay *et al.*, 2000), el mutante E173Q tendría la capacidad de transportar iones cloruro muy mermada. No obstante, E173Q podría virtualmente conservar el flujo de protones casi igual que el fenotipo silvestre, lo que nos lleva a postular morfológicamente que los residuos cercanos al intervalo -25 y -20 del vector coor y su movilidad (lado del espacio intermembranal) son muy importantes en el flujo de protones, ya que es la región que ha permanecido similar en las estructuras con esta capacidad (Figura 8 y 9A y C), eso explicaría como una mutación en el lado intermembranal disminuye el flujo (mutante D215N, Figura 4 y 9D), poniendo en evidencia el rol del carácter ácido de los residuos.

Con respecto a la cantidad de agua promedio en un radio de 5Å por punto (número entero) del vector coor, es decir del radio, el promedio del fenotipo silvestre y los mutantes D28N, E173Q y D215N es de 185,45 (DE 181,88); 185,59 (DE 171,28); 187,32 (DE 176,75) y 184,54 (DE 165,46), respectivamente, mostrando valores muy parecidos a pesar de su diferencia estructural (Figura 10). En adición, la Figura 10 nos muestra los gráficos comparativos de las curvas para cada estructura. En ese gráfico, se muestra que hay dos máximos locales que corresponden a las regiones no membranales y que los máximos se encuentran en el área matricial con 608,69; 555,50; 624,38 y 549,07 para las respectivas estructuras de UCP3_WT, M_D28N, M_E173Q y M_D215N. El segundo punto con más moléculas de agua promedio para todas las estructuras (según el orden anterior) es de 419,44; 487,00; 409,31 y 460,56, situadas en el extremo intermembranal no embebido en la membrana. Esto nos sugiere que el agua va disminuyendo su concentración conforme se acerca al centro del poro. Estos valores mínimos corresponden a 101,19; 85,75; 86,75 y 84,88 para el fenotipo silvestre, D28N, E173Q y D215N, en este orden. También, la Figura 11 nos da una idea de cuán variable es el número de moléculas de agua en cada estructura a través del eje del poro. Se puede notar cómo las dos estructuras con más flujo de protones (fenotipo silvestre y D173Q) presentan una meseta cerca al valor cero de coor y las variaciones más grandes están focalizadas en los picos de las curvas (Figura 11A y C), a diferencia de D28N que las variaciones están distribuidas por todo el poro y a D215N, que no están focalizadas en los picos (Figura 11B y D).

Los resultados anteriores se pueden complementar con los puentes de hidrógeno formados entre el poro y las moléculas de agua, como se muestra en la Figura 12. Se visualiza en una oscilación en el número de puentes de hidrógeno (PH) a lo largo de la simulación, muy parecida entre las estructuras; es más, los promedios son cercanos (UCP3_WT, 206.99; M_D28N, 205.32; M_E173Q, 204.41; M_D215N, 198.87). Esto se refleja en B y C de la Figura 12, ya que cuando se restan los valores de las mutantes con los respectivos de UCP3_WT, las diferencias fluctúan entre 25 (como valor absoluto) y los gráficos parecen divididos a la mitad. En contraste, las diferencias entre D215N y el fenotipo silvestre son marcadas, observándose que la estructura UCP3_WT genera más PH que el mutante (C).

En adición, el Cuadro 3 muestra los residuos del poro cuyos grupos radicales forman PH con las moléculas de agua presentes en el canal. Se estableció como punto de corte a los residuos que participan en un 90% o más de las veces a lo largo de la simulación, generando PH. UCPE3_WT y M_E173Q presentan 21 residuos con este criterio, mientras que M_D28N 19 y M_D215N, 20. El promedio más alto del porcentaje de formación de PH de estos residuos lo tiene el mutante E173Q (97,36%) seguido por el fenotipo silvestre (97,19%), D215N (96,71%) y como último a D28N (96,28%), sin embargo las cifras son muy parecidas. Es importante resaltar que la mayoría de residuos que forman estos PH (ácido aspártico y ácido glutámico) poseen carga negativa al pH neutro, seguidos de los cargados positivamente (arginina) y sólo hay un residuo hidrofóbico, la fenilalanina.

También, se muestra en el Cuadro 3 que los residuos que generaron los mutantes (en negrita) forman puentes de hidrógeno en casi 100% de las veces en la simulación, lo que sugiere que su participación es importante, es más, sus mutaciones al aminoácido neutro forman PH con mucha menos frecuencia (alrededor del 50% o menos, información no mostrada). En el caso del mutante D28N, no sólo se afectan los PH generados por el residuo D28 sino también aquellos generados por otro de los residuos mutados: E173.

Por otro lado, los residuos que no forman PH en todas las estructuras pero siempre en el fenotipo silvestre fueron resaltados en verde, mostrando que M_E173Q comparte más similitudes con UCP3_WT, con excepción de la R87. Por último, los residuos coloreados en azul representan los aminoácidos comunes a todas las estructuras.

Cuadro 3: Residuos que forman puentes de hidrógeno.

Residuo	UCP3_WT	M_D28N	M_E173Q	M_D215N
D28	99,47		90,93	95,2
D215	99,47	98,4	98,13	
E173	96			96
R87	91,47	91,2		90,67
D201	96,27	95,2	99,73	
E196	98,67		94,4	98,93
E205	98,13		98,67	99,2
E295	95,47		96,53	
E309	95,2		97,33	98,67
R188		90,13		
D239		93,07		
E46		99,2	94,93	90,13
E267		95,47	95,47	94,93
D8	98,67	97,87	98,93	99,73
D35	90,4	95,2	98,67	97,87
D100	96,8	96	96,27	95,2
D112	98,93	98,67	99,73	99,47
D138	99,47	98,67	98,13	98,93
D156	97,33	91,47	99,73	98,13
D164	97,33	96,8	95,2	97,33
D209	98,13	98,93	98,13	97,6
D258	99,73	98,4	97,87	92,27
E72	98,13	96,8	98,93	99,47
E172	98,13	98,93	98,13	96
F312	97,87	98,93	98,67	98,4

Residuos que forman PH en 90% o más en los pasos de simulación. Los números representan el porcentaje de formación de los puentes de hidrógeno. Las columnas en negrita, verde, rojo y azul pertenecen a los respectivos residuos mutados, presentes siempre en el fenotipo silvestre, no presente en este fenotipo y presentes en todas las estructuras. UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, los residuos D28, E173 y D215 están involucrados en el paso de iones y los residuos D28 y D215, al parecer, median este flujo debido a la formación de PH, ya que M_E173Q conserva la capacidad de transportar protones (Cuadro 2). Esto puede ser explicado en virtud de la teoría de cables de agua o “*water wires*”. Ésta postula que los residuos del canal generan PH con las moléculas de agua y estas transportan los protones de molécula a molécula, más aún cuando hay un gradiente favorecedor (Nagle y Morowitz, 1978; Cukierman, 2003). También, comenta que los residuos responsables de formar PH serían la serina, treonina y tirosina (debido a sus

grupos hidroxilos) y los ácidos aspártico y glutámico (gracias a sus grupos carboxilos). Estos últimos residuos coincidentemente son los que predominan en el Cuadro 3.

En adición, debido al cambio de conformación en el poro producido por las mutaciones (Figura 7), la frecuencia de formación de PH de los residuos cambia (Cuadro 3, residuos en verde y rojo), es decir, que la presencia de aminoácidos que con un porcentaje de formación de PH mayor a 90% es distinta entre las estructuras. Esto muestra una relación entre la forma del poro y los PH y como consecuencia, en la actividad desacoplante.

Adicionalmente, se pone en evidencia que algunos residuos (los coloreados en verdes, Figura 13A) también tienen un rol en la función de la UCP-3 porque son comunes a las estructuras más eficientes en el flujo de protones y la mayoría se encuentran orientados hacia el área más activa del canal, es decir, el espacio intermembranal (Figura 9A y C).

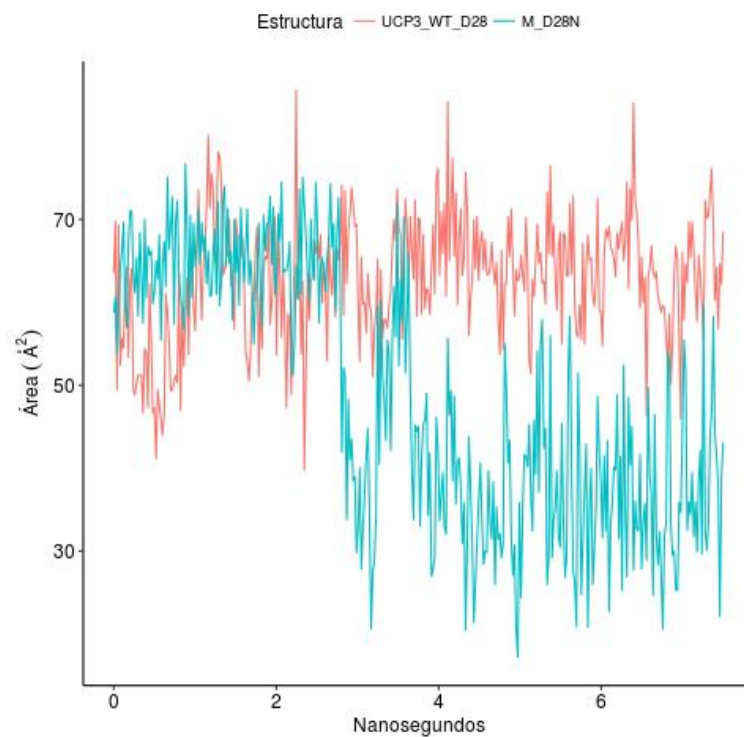
El residuo R87, puede estar involucrado más en el paso de cloruro que con el flujo de protones, por bajar su frecuencia de formar PH en el mutante E173Q, pero no en los demás, lo cual lo hace un candidato importante a mutar si se quiere profundizar en el tema. Esto podría deberse a que su carga positiva favorece esa interacción. Esta afirmación es respaldada por Modriansky *et al.* (1997) quienes mostraron que el residuo R83 en hámster, homólogo a R87, interacciona con las cargas negativas de los fosfatos de GDP.

Por último, la mayoría de los residuos en verde presentan posiciones en el fenotipo silvestre (Figura 13A) cercanas al espacio intermembranal pero R87 se encuentra en el lado matricial, sugiriendo que los sitios en la proteína más importantes para la interacción de las cargas positivas (protones) están en el espacio intermembranal y para las negativas, (AGLs y otros ácidos orgánicos ionizados - Robinson *et al.*, 2008-), en la matriz mitocondrial.

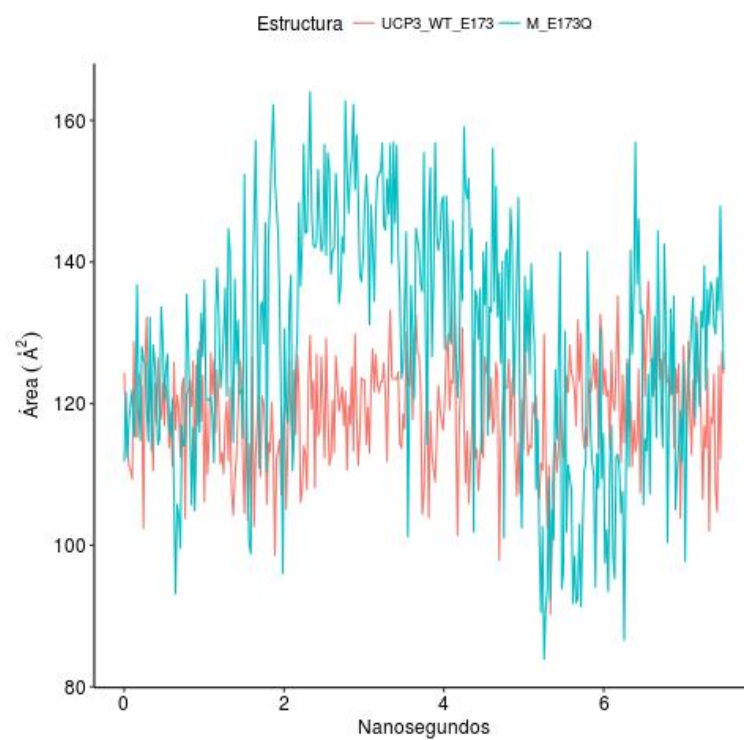
Con respecto a los residuos en rojo, estos podrían equilibrar el paso de protones y la capacidad desacoplante (figura 13B), lo que explicaría que el flujo disminuye pero no dramáticamente. Finalmente los residuos comunes a todas las estructuras (azul, Figura 13C) son posibles candidatos como aminoácidos relevantes en la función de UCP-3, incluyendo la fenilalanina 312, situada en el extremo terminal de la proteína, que se ubica en el espacio intermembranal. Si se toma en cuenta que están en las áreas fuera de la membrana con más

moléculas de agua cercanas y las más dinámicas (Figura 9 y 11), estas asas serían muy importantes para la interacción entre la proteína y el “entorno” acuoso.

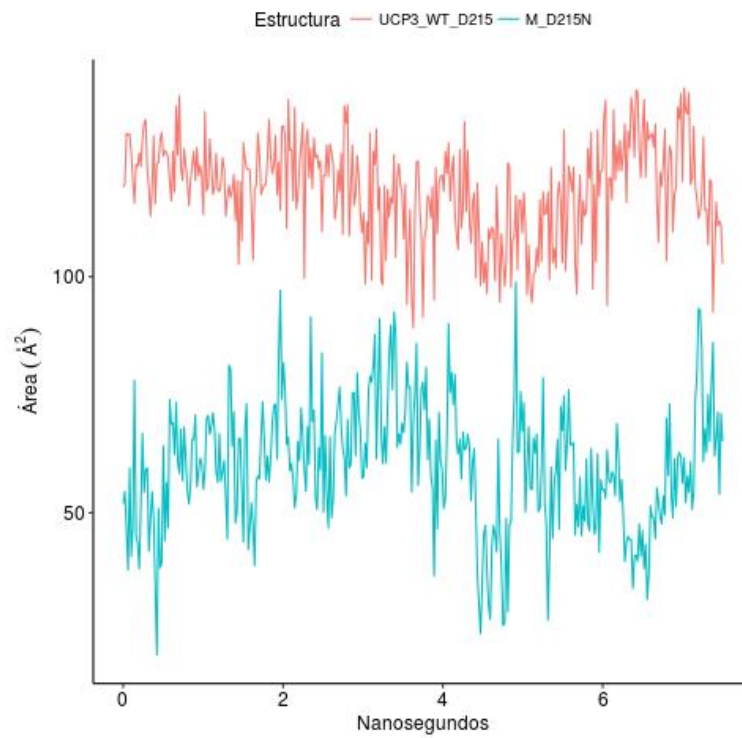
A



B



Continúa en la siguiente página

C**D**

Estructura	Promedio	DE
UCP3_WT_D28	62.77	7.37
UCP3_WT_E173	118.69	7.35
UCP3_WT_D215	118.55	10.40
M_D28N	48.52	15.49
M_E173Q	128.33	17.11
M_D215N	59.80	13.43

Figura 7: Análisis de área de superficie accesible al solvente por residuo mutado.

Valores de ASAS promedio con respecto a los nanosegundos de simulación. Las cuatro estructuras se comparan visualmente en A, B y C, mientras que D presenta el promedio y la desviación estándar (DE), en Å². El fenotipo silvestre está representado por UCP3_WT_ seguido de la letra y el número del residuo analizado. M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

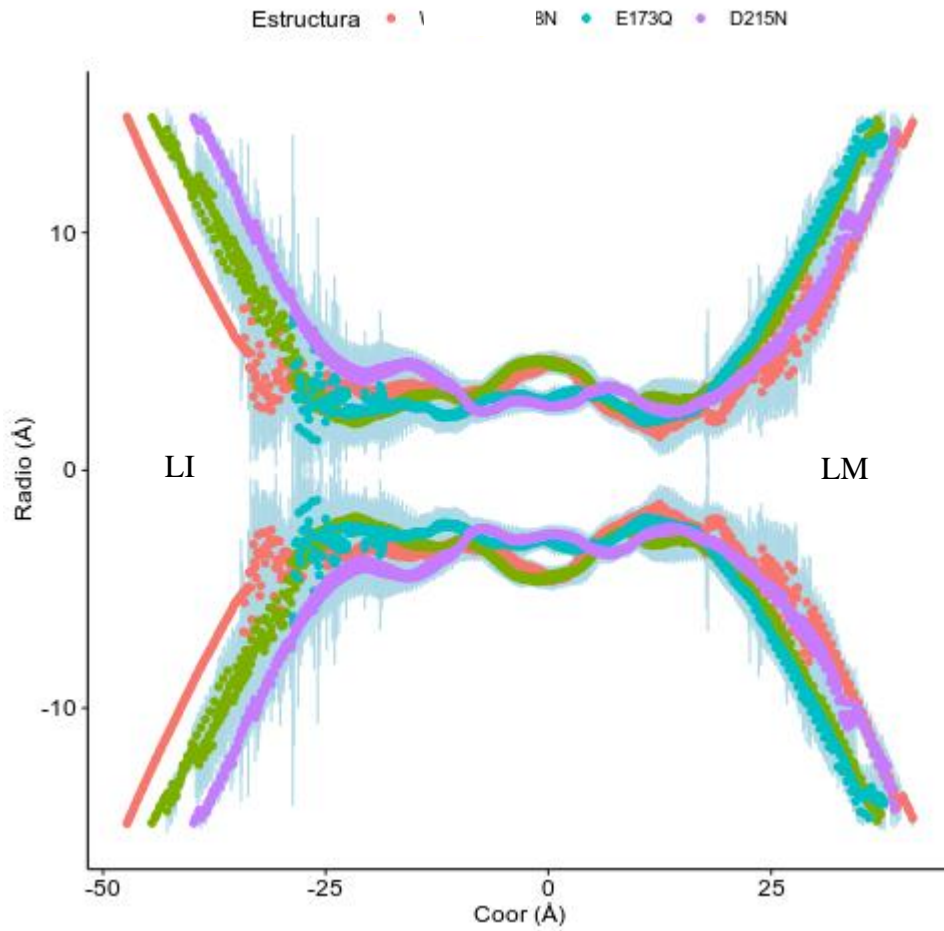


Figura 8: Comparación morfológica del poro entre estructuras.

Diferencias en la morfología del poro del fenotipo silvestre y las mutantes. Con la finalidad de dibujar la forma del poro, se muestra el promedio del radio del poro y su imagen especular (eje central del poro es cero y el radio se proyecta hacia los valores negativos y positivos en el eje Y). LI_ lado intermembranal, LM: lado matricial, UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

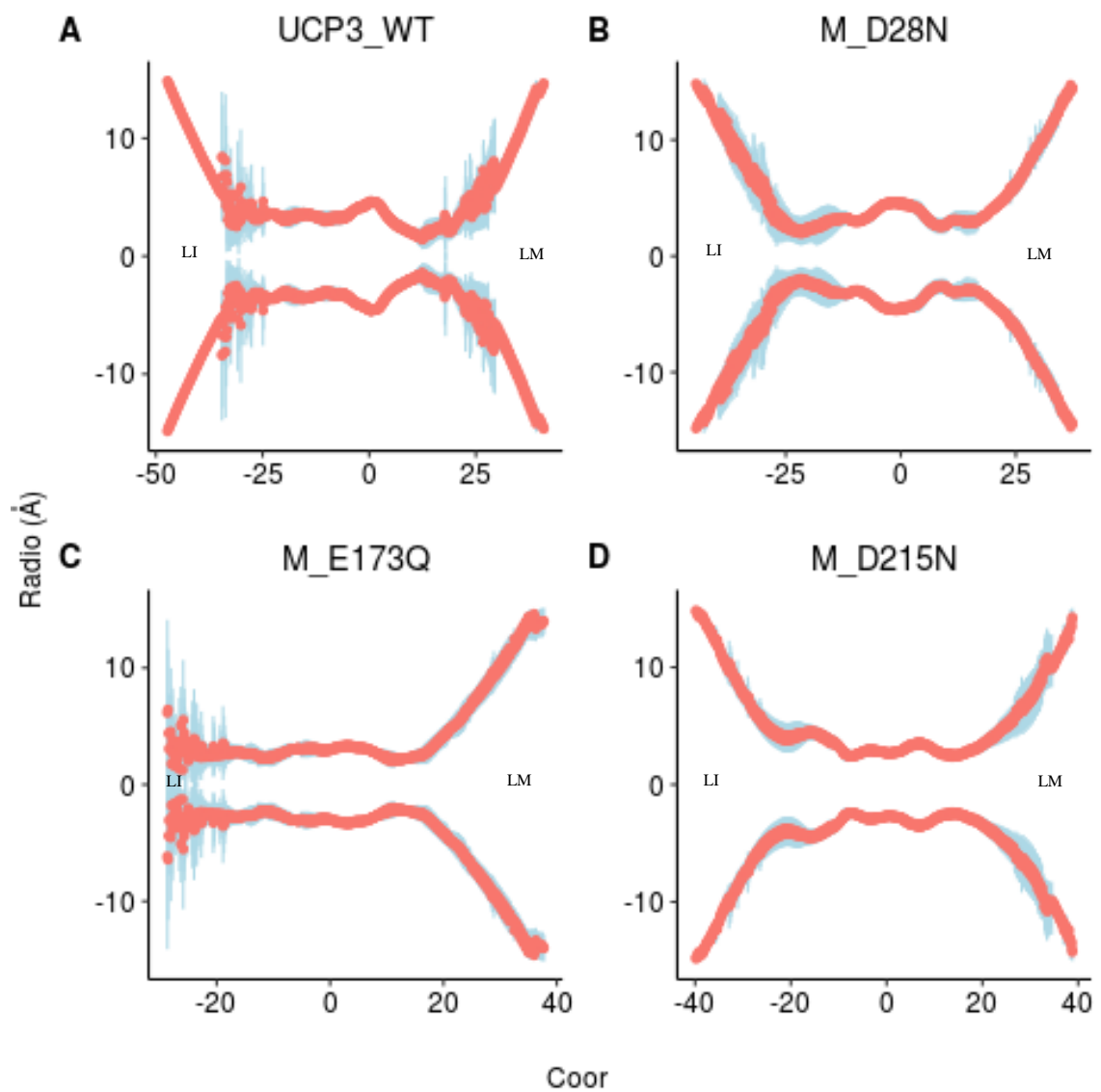


Figura 9: Perfil morfológico del poro de las estructuras.

Para simular la forma del poro, se muestra el promedio del radio del poro (eje Y) y su imagen especular (eje Y negativo), versus el vector coor. Las líneas celestes corresponden a la suma y resta de la desviación estándar al promedio. LI: lado intermembranal, LM: lado matricial, UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

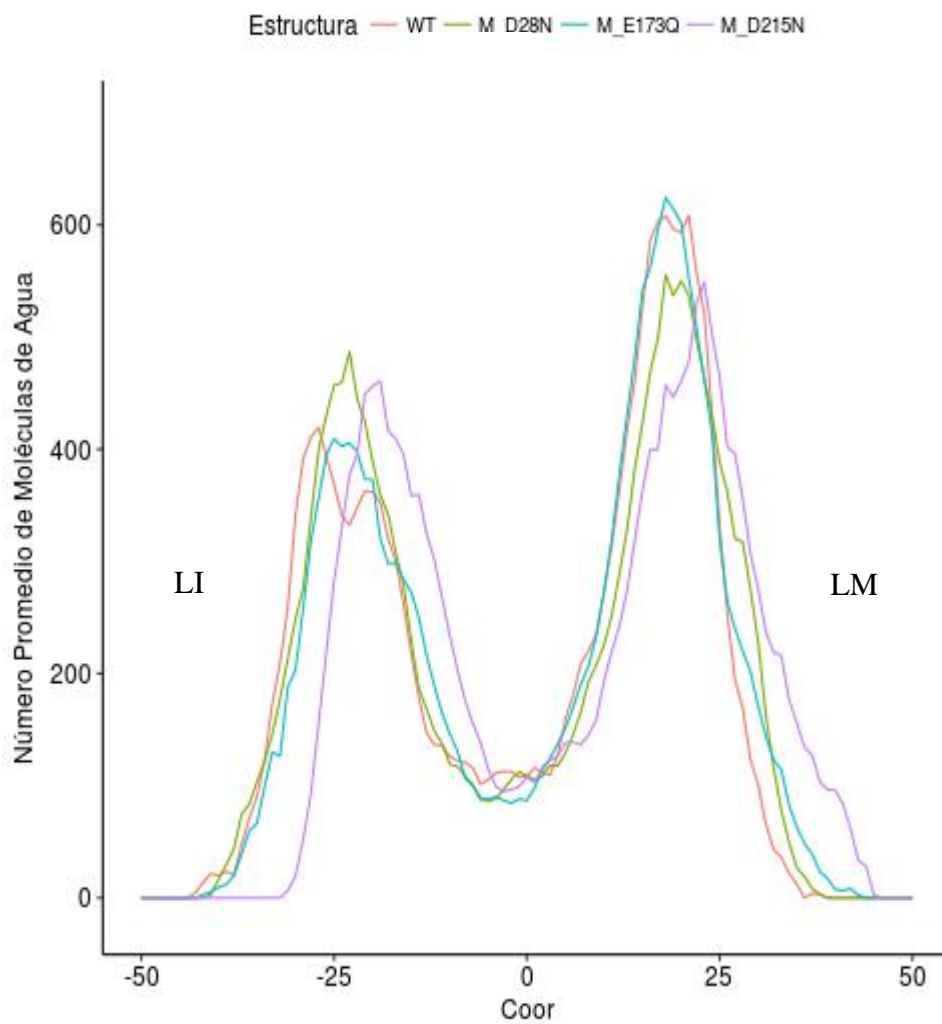


Figura 10: Símil de la presencia de agua en el poro.

Número promedio de moléculas de agua con respecto al vector coor para las estructuras en un radio de 5Å. LI: lado intermembranal, LM: lado matricial, UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

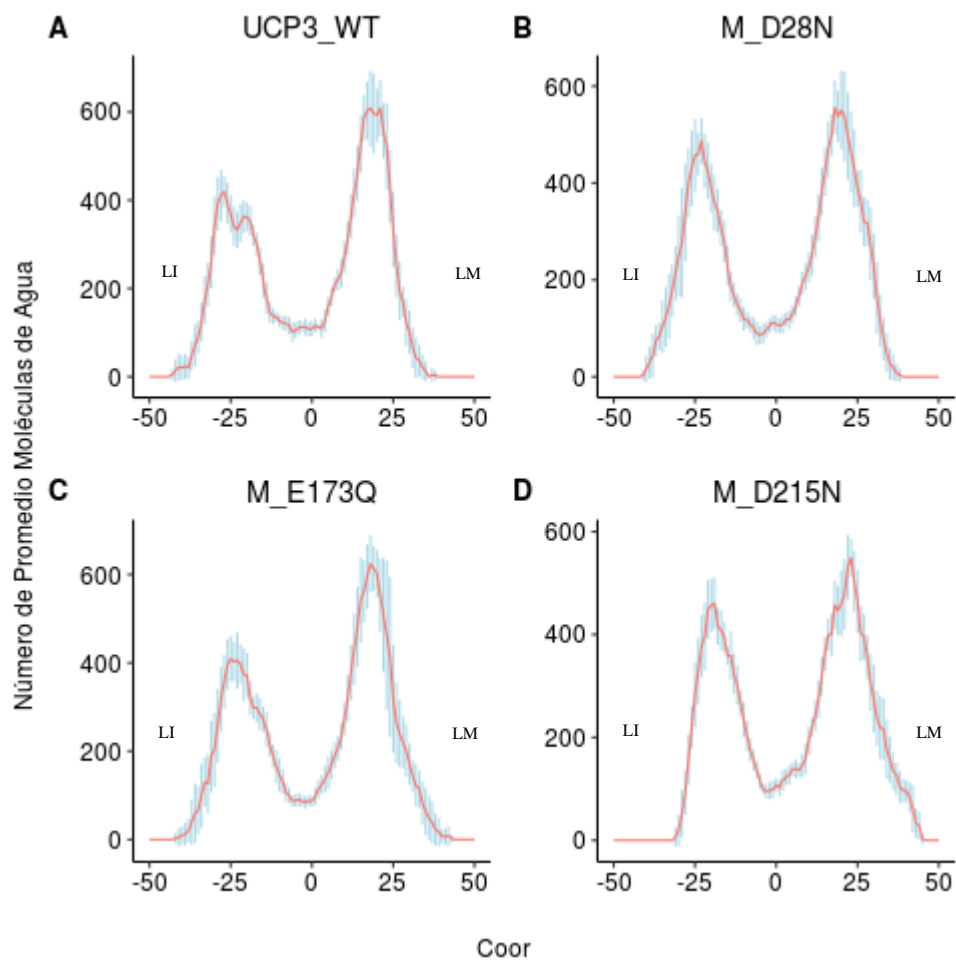
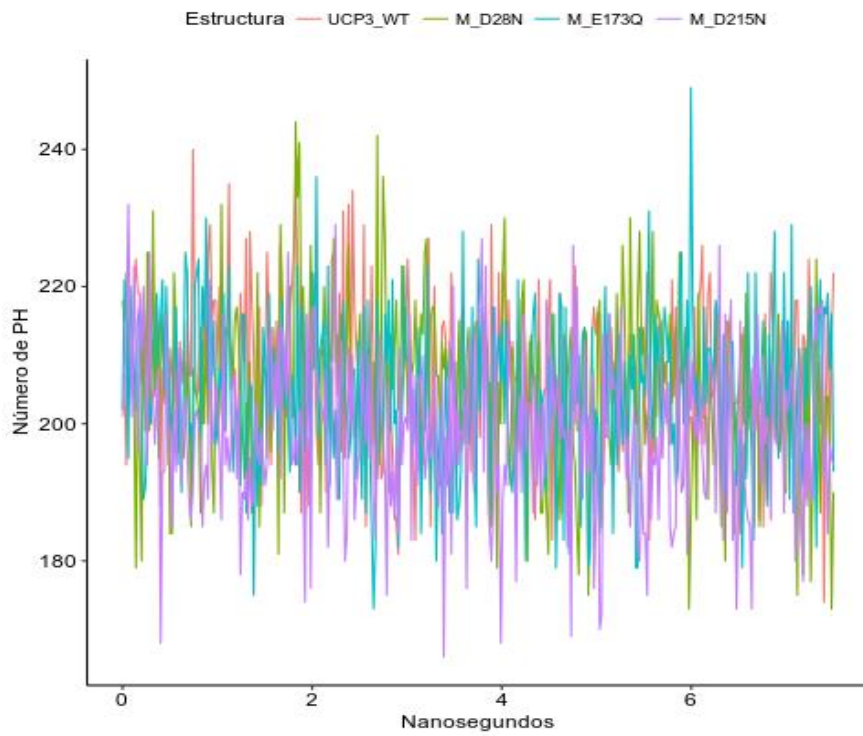


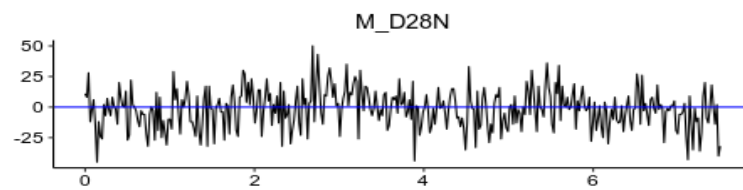
Figura 11: Perfiles de presencia de agua en el poro.

Número de moléculas promedio de agua con respecto al vector coor en un radio de 5Å para cada estructura individualmente. Las líneas celestes corresponden a la suma y resta de la desviación estándar al promedio. LI: lado intermembranal, LM: lado matricial, UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

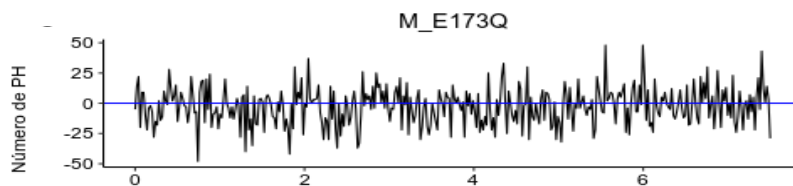
A



B



C



D

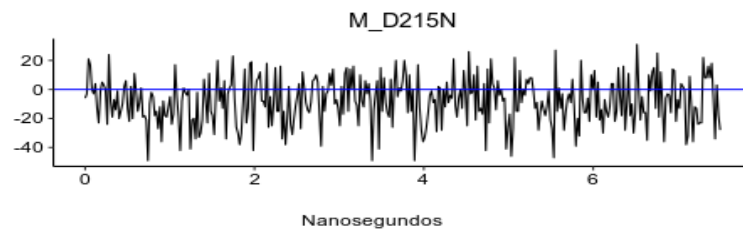
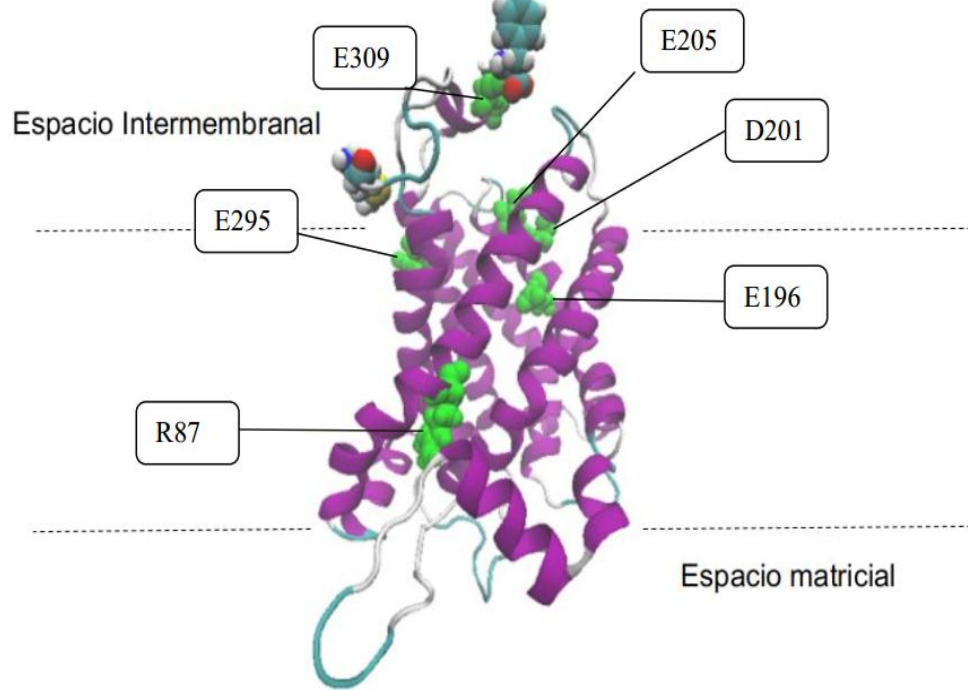


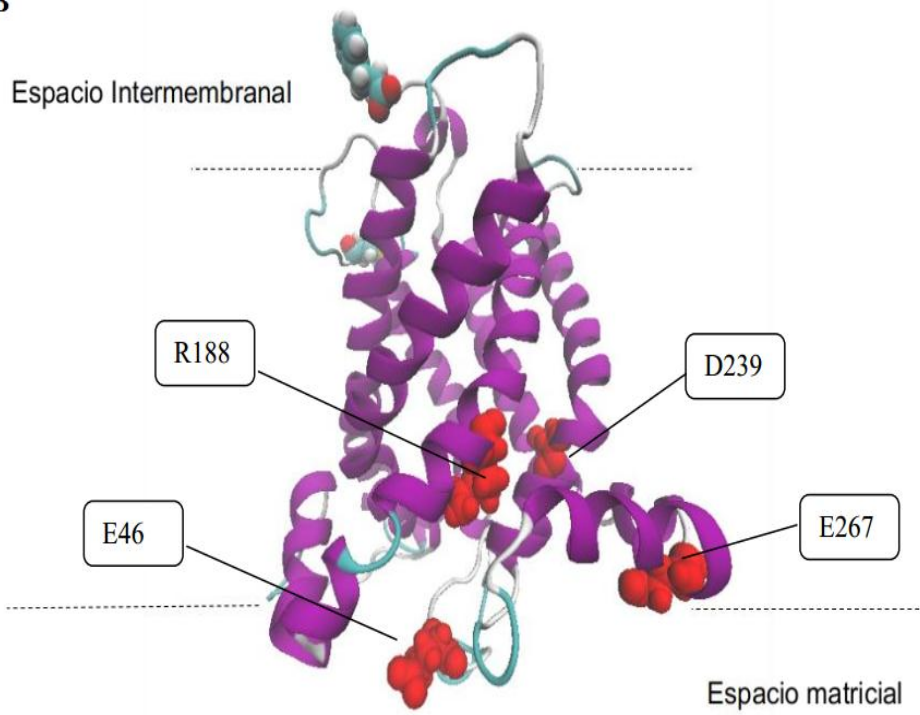
Figura 12: Puentes de hidrógeno formados entre las estructuras y el agua.

Número de puentes de hidrógeno (PH) con respecto a los nanosegundos de simulación. Se grafica en A el número de PH de todas las estructuras a lo largo de la dinámica, sugiriendo uniformidad. En B, C y D los valores de PH para cada mutante se restaron con los del fenotipo silvestre.

A



B



Continúa en la siguiente página

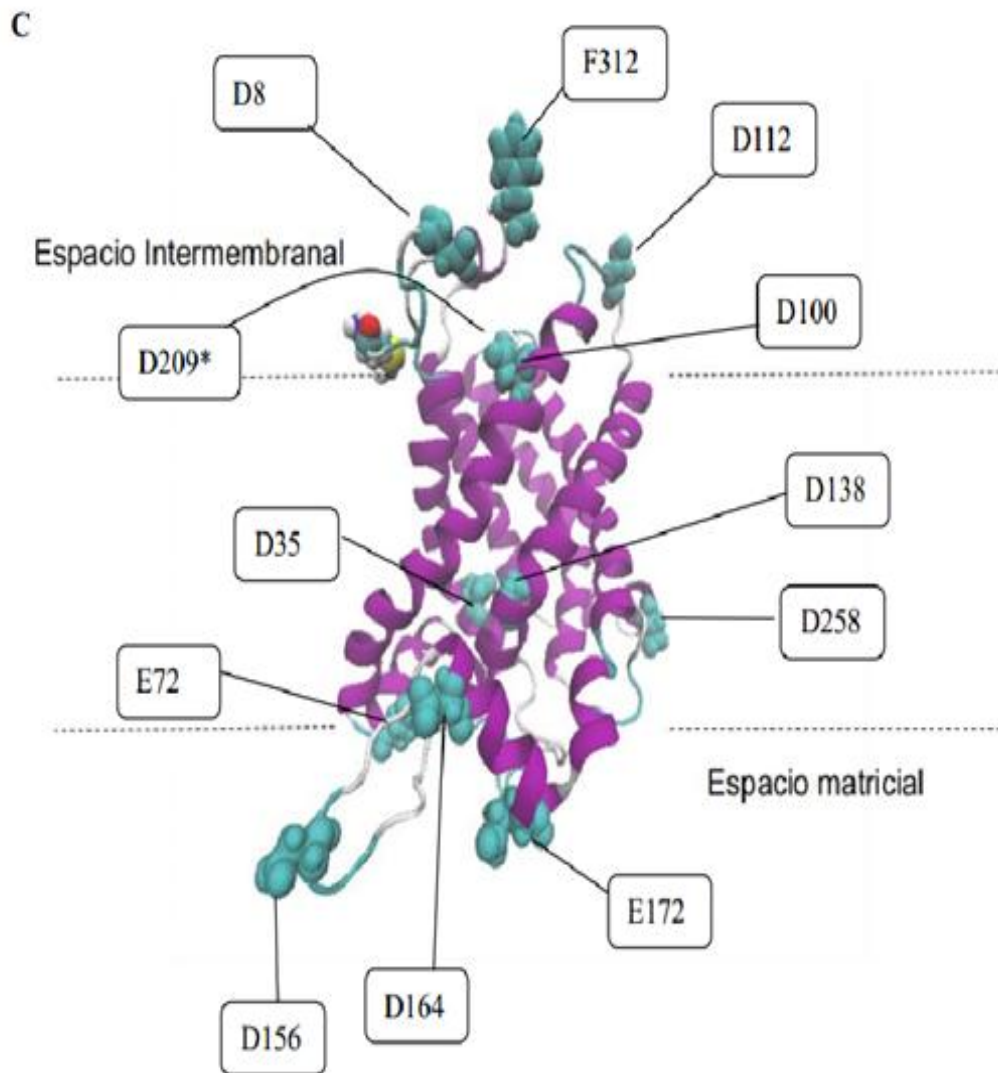


Figura 13. Posición de residuos formadores de puentes de hidrógeno.

Residuos que forman 90% o más PH, de la estructura UCP3_WT. Los colores son correspondientes al Cuadro 3 y los residuos coloreados por átomos son los extremos terminales. Las figuras de las estructuras fueron rotadas a conveniencia para mostrar con mayor claridad los residuos relevantes. *El residuo D209 se encuentra exactamente detrás de D100.

4.5 Interacción proteína ligando (*docking*) de UCP-3 y mutantes con el ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico (omega 3 DHA)

Se realizó el ensayo de acoplamiento molecular para analizar como es que un AGPI (ácido docosa-4,7,10,13,16,19- hexaenoico - DHA-) interacciona con UCP-3 y mutantes. La Figura 14 muestra (columna derecha) la forma en que el DHA interactúa con las estructuras. UCP3_WT (a) presenta un acoplamiento en la cara lateral con DHA, en el surco que forman las alfa hélices H5 y H6 y el mutante E173Q favorece la interacción lateral pero hacia la cavidad, mientras que en las otras estructuras, el DHA se une en el lado de la matriz mitocondrial (área ventral de la proteína). En adición, la columna de la derecha de esta misma figura se acerca la imagen de tal manera que se note cómo la cabeza aniónica está ubicada. Adicionalmente, los residuos involucrados en el acoplamiento de cada estructura, así como las energías de acoplamiento son presentadas en el Cuadro 4.

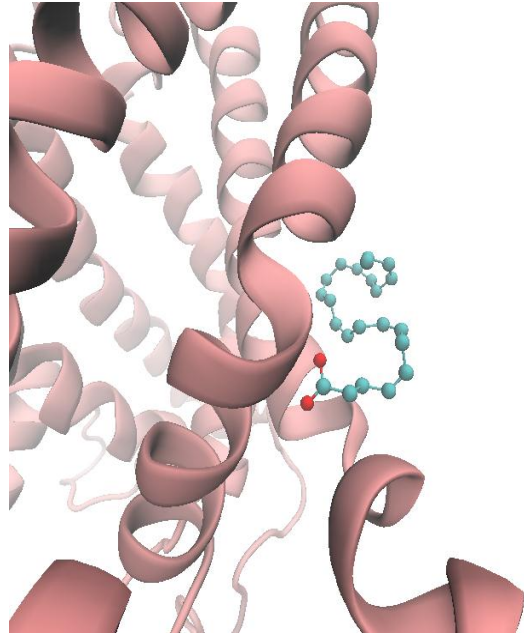
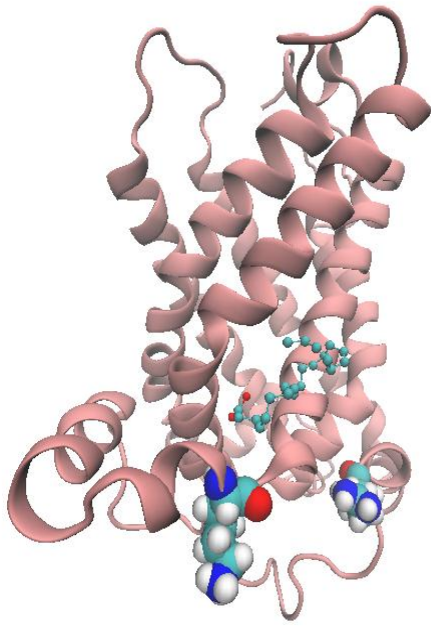
Gracias a los trabajos estructurales de Berardi y Chou (2014) y Zhao *et al.* (2017), se sabe que es imprescindible para el paso de los protones que los AGLs se unan lateralmente, de tal manera que la cabeza aniónica se sitúe intrahelicalmente, promoviendo la actividad desacoplante. Este fenómeno se cumple con el fenotipo silvestre y el mutante E173Q, de manera que puede explicar que estos aún conservan su capacidad “intacta” de interacción con los AGLs y por ende, su actividad (Cuadro 2), teniendo en común el residuo serina S279 (Cuadro 4), sugiriendo su protagonismo en la interacción UCP-3 y AGPIs. En adición, es importante resaltar que el DHA interacciona estructural y espacialmente de la misma manera que los AGLs “activadores”, como lo demuestra el estudio Zackova *et al.*, (2003), explicando su propiedad potenciadora y que una interacción ventral no tiene una activación óptima. Fedorenko *et al.* (2012) sostienen, que esta capacidad de potenciamiento se debe a que los AGLs de cadena larga se unen con más fuerza a la proteína que los AGLs de cadena corta. Entonces, que WT_UCP3 y M_E173Q tengan energías calculadas del acoplamiento molecular más favorables, ratifican su capacidad desacoplante en comparación con los otros mutantes. Finalmente, que la interacción del AGPI con la UCP-3 no sea en las hélices H1 y H6 puede deberse a una diferencia en la secuencia y explicaría por qué la UCP-3 tiene una repercusión fisiológica distinta de las otras UCPs.

Cuadro 4: Residuos que interactúan con DHA.

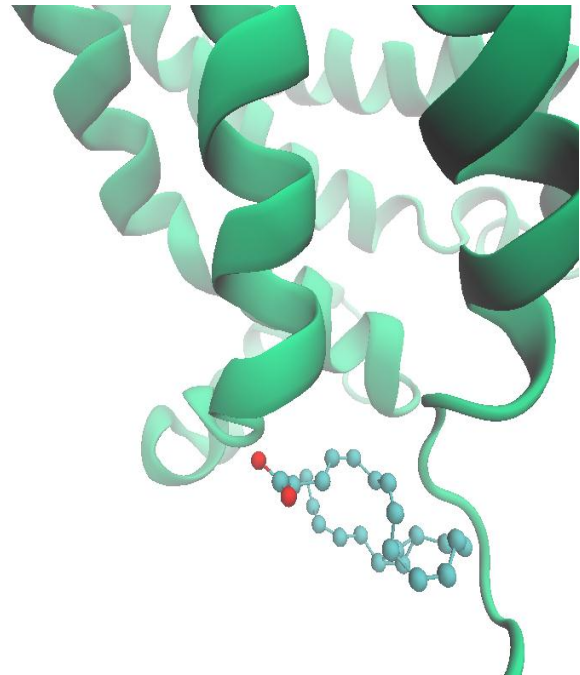
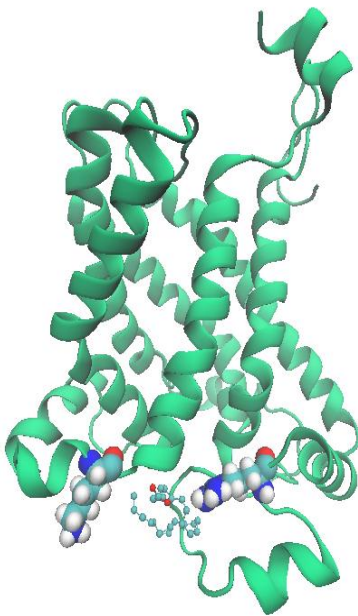
Residuos	WT	M_D28N	M_E173Q	M_D215N
E46		x		
F229	x			
F272			x	
F276	x	x		
F280	x			
I43		x	x	
K38			x	
K274				x
L283	x			
N247		x		
P248				x
P249				x
P278				x
Q42			x	
Q44		x		
R59		x		
R244			x	x
R282			x	
S279	x		x	
T243			x	
T277		x		
V233	x			
Y273	x			
Energía de acoplamiento (Kcal/mol)	-5,9	-4,6	-5,5	-4,8

UCP3_WT: fenotipo silvestre, M_D28N, M_E173Q, M_D215N corresponden a los mutantes D28N, E173Q y D215N, respectivamente.

A



B



Continúa en la siguiente página

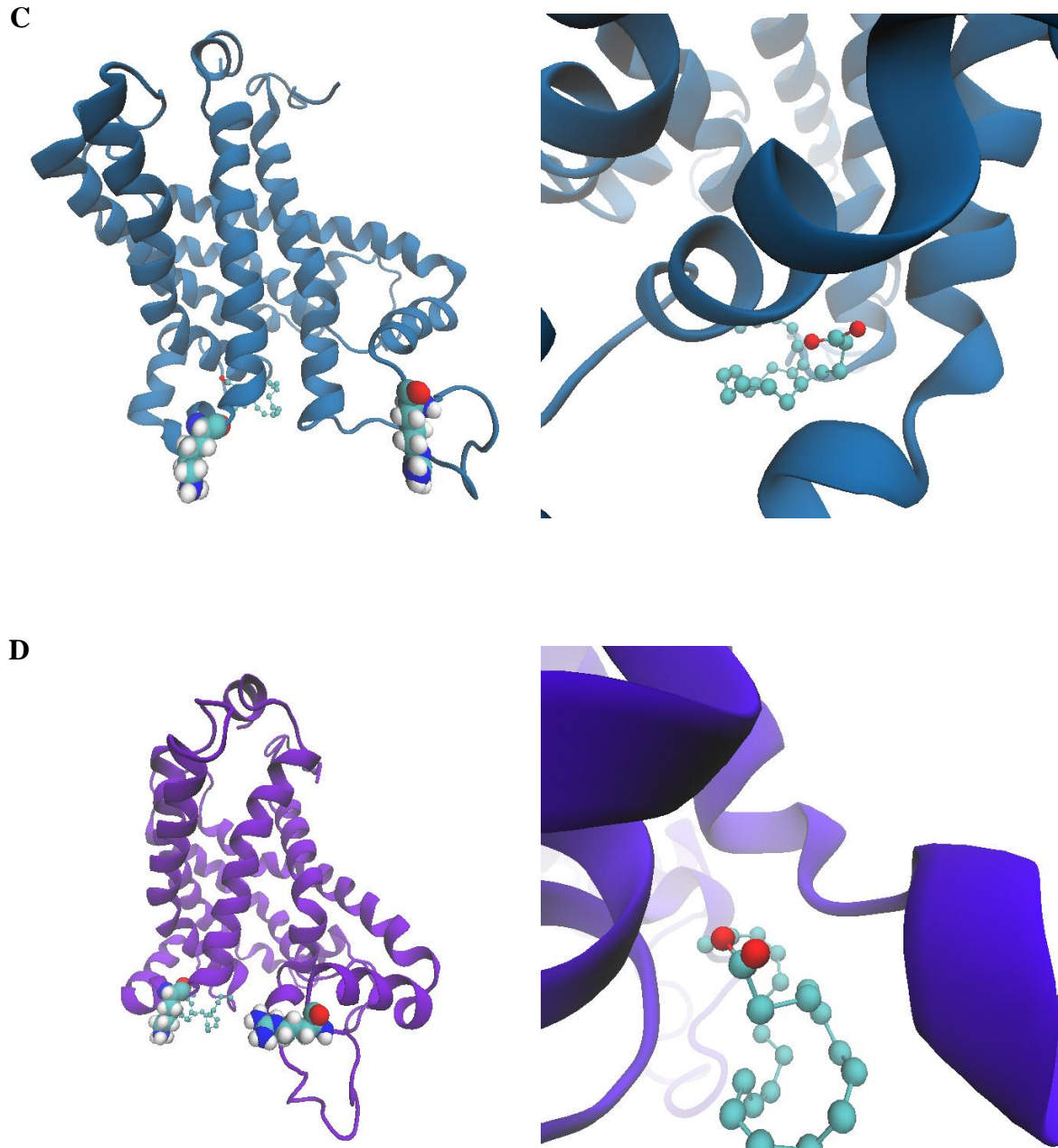


Figura 14. Acoplamiento molecular (*molecular docking*) con DHA.

Molécula de DHA (ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico) acoplada a las estructuras UCP3_WT (A), M_D28N (B), M_E173Q (C), M_D215N (D). A la izquierda, se muestra la posición de acoplamiento y la conformación estructural más estable del DHA, además, los residuos R59 y K274 (lado de la matriz mitocondrial) se encuentran resaltados.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y la interpretación dada, se concluye que:

1. Existe relación entre las propiedades estructurales del poro y el flujo de protones. El valor de ASAS de los residuos D28 y D215, así como su carácter ácido, están relacionados con la actividad desacoplante en UCP-3.
2. El cambio en la forma del poro, debido a las mutaciones estudiadas, interviene en la interacción entre la UCP-3 y el agua, por medio de puentes de hidrógeno, poniendo en evidencia que el flujo de protones puede darse mediante los cables de agua.
3. El efecto de DHA en el incremento de la actividad de UCP-3 se puede explicar debido a que la cabeza aniónica de estos interactúa con la proteína, de forma lateral, mismo fenómeno que explica el aumento en la actividad de las UCPs mediado por AGLs de cadena larga.

VI. RECOMENDACIONES

Se presentan las siguientes recomendaciones de temas para trabajos futuros:

1. Realizar análisis de conductancia y de cambio de conformación que va asociado al flujo de protones en UCP-3.
2. Modelar cómo la interacción de los ácidos grasos puede estabilizar la estructura y en qué medida pueden pasar por el canal cuando la UCP-3 es sometida a un potencial de membrana.
3. Simular la formación de dímeros de la proteína y analizar su estabilidad, ya que hay la posibilidad de que también sea activa cuando forma esa estructura.
4. Validar experimentalmente los cambios aminoacídicos realizados en UCP-3 y estudiar la variación del flujo de protones.
5. Estudiar la interacción de diferentes AGPIs con UCP-3.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUER, C; FIEHN, O; SEIFERT, EL; BÉZAIRE, V; MEISSEN, JK; DANIELS, A; SCOTT, K; RENAUD, JM; PADILLA, M; BICKEL, DR; DYSART, M; ADAMS, SH; HARPER, MEM. 2013. Muscle uncoupling protein 3 overexpression mimics endurance training and reduces circulating biomarkers of incomplete β -oxidation. *FASEB J* 27, 4213-4225.

ALLEN, MP; TILDESLEY, DJ. 1987. *Computer Simulations of Liquids*. Oxford: Clarendon Press.

ALVAREZ-CRESPO, M; CSIKASZ, RI; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, N; DIÉGUEZ, C; CANNON, B; NEDERGAARD, J; LÓPEZ, M. 2016. Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab.* 5(4):271-82.

AZZU, V; JASTROCH, M; DIVAKARUNI, AS; BRAND, DM. 2010a. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1797:785-791.

AZZU, V; MOOKERJEE, SA; MARTIN DM. 2010b. Rapid turnover of mitochondrial uncoupling protein 3. *Biochem J.* 426(1): 13-17.

BARTELT, A; BRUNS, OT; REIMER, R; HOHENBERG, H; ITTRICH, H; PELDSCHUS, K; KAUL, MG; TROMSDORF, UI; WELLER, H; WAURISCH, C; EYCHMULLER, A; GORDTS, PL; RINNINGER, F; BRUEGELMANN, K; FREUND, B; NIELSEN, P; MERKEL, M; HEEREN, J. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, *Nat Med.* 17:200-205.

BECK, V; JABŮREK, M; DEMINA, T; RUPPRECHT, A; PORTER, RK; JEZEK, P; POHL, EE. 2007. Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 21(4):1137-44.

- BERARDI, MJ; Y CHOU, JJ.** 2014. Fatty acid flippase activity of UCP2 is essential for its proton transport in mitochondria. *cell metab.* 20(3):541-52.
- BERARDI, MJ; SHIH, WM; HARRISON, SC; Y CHOU, JJ.** 2011. Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature* 476(7358): 109–113.
- BÉZAIRE, V; SEIFERT, E; HARPER, M.** 2007. UCP3: A mitochondrial mystery. *The FASEB Journal* 21:312-324.
- BAMBER, L; HARDING, M; MONNE, M; SLOTBOOM, DJ; KUNJI, ERS.** 2007. The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10830–10834.
- BONET, ML; MERCADER, J; PALOU, A.** 2017. A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie.* doi: 10.1016/j.biochi.2016.12.014.
- BOSS, O; SAMEC, S; DULLOO, A; SEYDOUX, J; MUZZIN, P; AND GIACOBINO, JP.** 1997. Uncoupling protein-3, a new member of the mitochondrial carrier family with tissue specific expression. *FEBS Lett* 408, 39–42.
- BRAND, DM; JL; OCLOO, A; KOKOSZKA, J; WALLACE, DC; BROOKES, PS; CORNWALL, EJ.** 2005. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J.* 392(Pt 2): 353–362.
- BRAUN, N; KLUMPP, D; HENNENLOTTER, J; BEDKE, J; DURANTON, C; BLEIF, M; HUBER, SM.** 2015. UCP-3 uncoupling protein confers hypoxia resistance to renal epithelial cells and is upregulated in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 5:13450.
- BUSIELLO, RA; SAVARESE, S; LOMBARDI, A.** 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology* 6:36.
- CADENAS, S; BUCKINGHAM, JA; SAMEC, S; SEYDOUX, J; DIN, N; DULLOO, AG.** 1999. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 462, 257–260.
- CANNON, B. Y NEDERGAARD, J.** 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277–359.

- CHANCE, B; WILLIAMS, GR.** 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation III The steady state. *J Biol Chem.* 217(1):409-27.
- CHIVIAN, D; ROBERTSON, T; BONNEAU, T Y BAKER, D.** 2005. In Bourne; PE y Weissig, H (eds.). *Structural Bioinformatics.* John Wiley & Sons, Inc.
- CHEN, Y; LIU, J; ZHENG, Y; WANG, J; WANG, Z; GU, S; TAN, J; JING, Q; YANG, H.** 2014. Uncoupling protein 3 mediates H₂O₂ preconditioning-afforded cardioprotection through the inhibition of MPTP opening. *Cardiovasc Res.*105(2):192-202.
- CIOFFI, F; SENESE, R; DE LANGE, P; GOGLIA, F; LANNI, A; LOMBARDI, A.** 2009. Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors.* 35(5):417-28.
- COSTFORD, SR; CHAUDHRY, SN; SALKHORDEH, M; HARPER, MEM.** 2006. Effects of the presence, absence, and overexpression of uncoupling protein-3 on adiposity and fuel metabolism in congenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 290, E1304–E1312.
- CRANE, FL.** 2001. Biochemical functions of coenzyme Q 10 *J Am Coll Nutr* 20(6): 591–598.
- CUKIERMAN, S.** 2003. The transfer of protons in water wires inside proteins. *Frontiers in Bioscience* 8, s1118-1139.
- DAHOUT-GONZALEZ, C1; BRANDOLIN, G; PEBAY-PEYROULA, E.** 2003. Crystallization of the bovine ADP/ATP carrier is critically dependent upon the detergent-to-protein ratio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 59:(Pt 12):2353-5.
- DIAO, J; ALLISTER, EM; KOSHKIN, V; LEE, SC; BHATTACHARJEE, A; TANG, C; GIACCA, A; CHAN, CB; WHEELER, MB.** 2008. UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cells and influences secretion and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12057-12062.
- DIVAKARUNI, AS; BRAND, DM.** 2011. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology.* 26: 192–205.

DONADELLI, M; DANDO, I; FIORINI, C; PALMIERI, M. 2014. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. *Cell Mol Life Sci.* 71(7):1171-90.

DURHAM, E; DORR, B; WOETZEL, N; STARITZBICHLER, R; MEILER, J. 2009. Solvent accessible surface area approximations for rapid and accurate protein structure prediction. *J Mol Model.* 15:1093-1108.

ECHTAY, KS; WINKLER, E; BIENENGRAEBER, M; KLINGENBERG, M. 2000. Site-Directed Mutagenesis Identifies Residues in Uncoupling Protein (UCP1) Involved in Three Different Functions. *Biochemistry.* 39: 3311-3317.

EMRE, Y; HURTAUD, C; KARACA, M; NUBEL, T; ZAVALA, F; RICQUIER, D. 2007. Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19085–19090.

ENDO, T; YAMAMOTO, H; ESAKI, M. 2003. Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *JCellSci.*116:3259–3267.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. 2003. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand.* 178: 405-412.

FEDORENKO, A; LISHKO, PV; KIRICHOK, Y. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell.* 12;151(2):400-13.

FERREIRA, LG; DOS SANTOS, RN; OLIVA, G; ANDRICOPULO, AD. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules.* 20: 13384-13421.

FINK, BD; HERLEIN, JA; ALMIND, K; CINTI, S; KAHN, CR; SIVITZ, WI. 2007. Mitochondrial proton-leak in obesity resistant and obesity-prone mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 293, R1773-R1780.

FLEURY, CH; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, JL. 2001. Mitochondrial reactive oxygen species and apoptosis. Ebadi, M.; Marwah, J.; Chopra, R (Eds) *Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q 10)*. Prominent Press.

GALTIER, N; GOUY, M Y GAUTIER, C. 1996. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.* 12, 543-548.

GARLID, KD; JABŮREK, M; JEZEK, P. 2001. Mechanism of uncoupling protein action. *Biochemical Society Transactions* 26: 803-806.

GARLID, KD; OROSZ, DE; MODRIANSKÝ, M; VASSANELLI, S; JEZEK, P. 1996. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol.Chem* 271(5):2615–2620.

GARVEY, W. 2003. The role of uncoupling protein 3 in human physiology. *J. Clin. Invest* 111:438-441.

GIRALT, M; VILLARROYA, F. 2016. Mitochondrial Uncoupling and the Regulation of Glucose Homeostasis, *Curr Diabetes Rev.*

GODZIK, A. 2005. Fold Recognition Methods. In Bourne; PE y Weissig, H (eds.). *Structural Bioinformatics.* John Wiley & Sons, Inc.

GOGLIA, F; SKULACHEV, VP. 2003. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* (12):1585-91.

GONG, DW; MONEMDJOU, S; GAVRILOVA, O; LEON, LR; MARCUS-SAMUELS, B; CHOU, CJ; EVERETT C, KOZAK, LP; LI, C; DENG, C; HARPER, MEM; REITMAN, ML. 2000. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J. Biol. Chem* 275, 16251-16257.

GOODPASTER, BH; HE, J; WATKINS, S; KELLEY DE. 2001. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 5755-5761.

GOUY, M; GUINDON, S Y GASCUEL O. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 27(2):221-4.

GROMIHA, MM. 2010. Protein Bioinformatics: From Sequence to Function. Academic Press. New Delhi, India.

GROMIHA, MM Y AHMAD, S. 2005. Role of Solvent Accessibility in Structure Based Drug Design. Current Computer-Aided Drug Design. 1: 223-235.

GVOZDJÁKOVÁ, A. 2008. Mitochondrial Physiology. Gvozdjáčová, A (Ed.) Mitochondrial Medicine: Mitochondrial Metabolism, Diseases, Diagnosis and Therapy. Springer Netherlands.

HANWELL, DM; CURTIS, DE; LONIE, DC; VANDERMEERSCH, T; ZUREK, E; HUTCHISON, GR. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. J Cheminform. 4(1):17.

HOLLINGSWORTH, SA Y KARPLUS, PA. 2010. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. BioMol Concepts, 1: 271-283.

HOSPITAL, A; GOÑI, JR; OROZCO, M; GELPÍ, JL. 2015. Molecular dynamics simulations: advances and applications. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry. 8:37-47.

HUMPHREY, W; DALKE, A; SCHULTEN, K. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. J. Molec. Graphics. 14:33-38.

JABŮREK, M; JEŽEK, J; JEŽEK, P. 2018. Cytoprotective activity of mitochondrial uncoupling protein- 2 in lung and spleen. FEBS Open Bio. 8: 692-701.

JABŮREK, M; VARECHA, M; GIMENO, RE; DEMBSKI, M; JEZEK, P; ZHANG, M; BURN, P; TARTAGLIA, LA; GARLID KD. 1999. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. J Biol Chem. 274(37):26003-7.

JASTROCH, M; DIVAKARUNI, AS; MOOKERJEE, S; TREBERG, JR; BRAND, DM. 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. Essays Biochem 47: 53-67.

JORGENSEN, WL; CHANDRASEKHAR, J; MADURA, JD; IMPEY, RW; KLEIN, ML. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. Journal of Chemical Physics 79: 926-935.

KLINGENBERG, M; WINKLER, E. 1985. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator. *EMBO J* 4(12):3087–3092.

KLINGENBERG, M; ECHTAY, KS; M BIENENGRAEBER, M; WINKLER, E; HUANG, SG. 1999. Structure - Function Relationship in UCP1. *International Journal of Obesity*. 23, Suppl 6, S24-S29.

KLINGENBERG, M. 2001. Uncoupling Proteins- How Do They Work and How Are They Regulated. *UBMB Life* 52: 175-179.

KORSHUNOV, SS; SKULACHEV, VP; STARKOV, AA. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* c416(1):15-8.

KRAUSS, S; ZHANG, C; LOWELL, BB. 2005. The mitochondrial uncoupling protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3):248-61.

KRIEGER, E; NABUURS, SB Y VRIEND, G. 2003. Homology Modeling. In Bourne; PE y Weissig, H (eds.). *Structural Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.

KUFAREVA, I; ABAGYAN, R. 2012. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol.* 857: 231-257.

KUKOL, A. 2008. *Molecular Modeling of Proteins*. Humana Press.

KUNJI, ERS. 2004. The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Letters.* 564: 239-244.

LASKOWSKI, RA; MACARTHUR, MW; MOSS, DS; THORNTON, JM. 1993. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.*, 26, 283-291.

LEDESMA, A; GARCÍA DE LACOPA, M Y RIAL, E. 2002. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology.* 3(12):reviews3015.1-3015.9.

LEE, B; RICHARDS, F. 1997. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *J Mol Biol.* 55(3):379-400.

- LEE, Y; WILLERS, C; KUNJI, ERS; CRICHTON, PG.** 2015. Uncoupling protein 1 binds one nucleotide per monomer and is stabilized by tightly bound cardiolipin. 112 (22): 6973–6978.
- LINNANNE, AW, EASTWOOD, H.** 2004. Cellular redox poise modulation; the role of coenzyme Q 10, gene and metabolic regulation. *Mitochondrion* 4:779-789.
- LINS, L; THOMAS, A; BRASSEUR, R.** 2003. Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Science*. 12:1406-1417.
- LIU, Y; CHEN, XJ.** 2013. Adenine Nucleotide Translocase, Mitochondrial Stress, and Degenerative Cell Death. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 146860.
- LOMBARDI, A; BUSIELLO, RA; NAPOLITANO, L; CIOFFI, F; MORENO, M; DE LANGE, P; SILVESTRI, E; LANNI, A; GOGLIA, F.** 2010. UCP3 translocates lipid hydroperoxide and mediates lipid hydroperoxide-dependent mitochondrial uncoupling. *J Biol Chem*. 285(22):16599-605.
- LÓPEZ-VALLEJO, F; CAULFIELD, T; MARTÍNEZ-MAYORGA, K; GIULIANOTTI, MA; HOUGHTEN, RA; NEFZI, A; MEDINA-FRANCO, JL.** 2011. Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 14: 475-487.
- MACKERELL, AD; BASHFORD, D; BELLOTT, M; DUNBRACK, RL; EVANSECK, JD; FIELD, MJ; FISCHER, S; GAO, J; GUO, H; HA, S.** 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* 102: 3586–3616.
- MAILLOUX, RJ; SEIFERT, EL; BOUILLAUD, F; AGUER, C; COLLINS, S; HARPER, MEM.** 2011. Glutathionylation acts as a control switch for uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem*. 286(24):21865-75.
- MATTHIAS, A; OHLSON, KB; FREDRIKSSON, JM; JACOBSSON, A; NEDERGAARD, J. Y CANNON, B.** 2000. Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem* 275, 25073–25081.

MENG, XY; ZHANG, HX; MEZEI, M; CUI, M. 2011. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7:146-157.

MIROUX, B1; FROSSARD, V; RAIMBAULT, S; RICQUIER, D; BOUILLAUD, F. 1993. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J.* 12(10):3739-45.

MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 8;191:144-8.

MODRIANSKY, M; MURDZA-INGLIS, DL; PATEL, HV; FREEMAN, KB; GARLID, KD. 1997. Identification by site-directed mutagenesis of three arginines in uncoupling protein that are essential for nucleotide binding and inhibition. *J. Biol. Chem.* 272:24759-24762.

MORRIS, GM; HUEY, R; LINDSTROM, W; SANNER, MF; BELEW, RK; GOODSSELL, DS; OLSON, AJ. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry.* 16: 2785-91.

MOSSENBOCK, K; VEGIOPOULOS, A; ROSE, AJ; SIJMONSMA, TP; HERZIG, S; SCHAFMEIER, T. 2014. Browning of white adipose tissue uncouples glucose uptake from insulin signaling. *PLoS One* 9: e110428.

MUSA, CV; MANCINI, A; ALFIERI, A; LABRUNA, G; VALERIO, G; FRANZESE, A; PASANISI, F; LICENZIATI, MR; SACCHETTI, L; BUONO, P. 2012. Four novel UCP3 gene variants associated with childhood obesity: effect on fatty acid oxidation and on prevention of triglyceride storage. *Int J Obes (Lond).* 36(2):207-17.

NAGLE, JF; MOROWITZ, HJ. 1978. Molecular mechanisms for proton transport in membranes. *PNAS.* 75(1): 298-302.

NEDERGAARD, J; CANNON, B. 2014. The browning of white adipose tissue: some burning issues, *Cell Metab.* 20:396-407.

NOBES, CD; BROWN, GC; OLIVE, PN; BRAND, DM.1990. Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J Biol Chem* 265:12903–12909.

NOSKOV, SY; BERNÈCHE, S; ROUX, B. 2004. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* 431: 830-834.

O'BOYLE, NM; BANCK, M; JAMES, CA; MORLEY, C; VANDERMEERSCH, T; HUTCHISON, GR. 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* 3:33.

PAPA, S; MARTINO, PL, CAPITANIO, G; GABALLO, A; DE RASMO, D; SIGNORILE, A; PETRUZZELLA, V. 2012. The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. Scatena, R; *et al* (eds.), *Advances in Mitochondrial Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology* 942, Springer Netherlands.

PATTI, MEM; CORVERA, S. 2010. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31, 364-co395.

PEBAY-PEYROULA, E; DAHOUT-GONZALEZ, C; KAHN, R; TRÉZÉGUET, V; LAUQUIN, GJ; BRANDOLIN, G. 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature.* 6:426(6962):39-44.

PEDERSEN, PL.1993. An Introduction to the Mitochondrial Anion Carrier Family. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 25(5): 431-434.

PHILLIPS, JC; BRAUN, R; WANG, W; GUMBART, J; TAJKHORSHID, E; VILLA, E; CHIPOT, C; SKEEL, RD; KALE, L; SCHULTEN, K. 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1781-1802.

PUIGSERVER, P; HERRON, D; GIANOTTI, M; PALOU, A; CANNON, B; NEDERGAARD, J. 1992. Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes in vitro and in vivo evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem J* 284(Pt2):393-398.

ROBINSON, A.J., OVERY, C., AND KUNJI, E.R. 2008. The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *PNAS.* 105: 17766-17771.

ROUSSET, S; MOZO, J; DUJARDIN, G; EMRE, Y; MASSCHELEYN, S; RICQUIER, D; CASSARD-DOULCIER, AM. 2007. UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. *FEBS Lett.* 581:479-482.

ROY, A; KUCUKURAL, A; ZHANG, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5: 725-738.

SASISEKHARAN, V. 1962. Stereochemical criteria for polypeptide and protein structures. In Ramanathan, N. (ed.). *Collagen*, New York:Wiley.

SHABALINA, IG; JACOBSSON A; CANNON, B; NEDERGAARD, J. 2004. Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids. *J Biol Chem* 279(37):38236–38248.

SIEVERS, F; WILM, A; DINEEN, DG; GIBSON, TJ; KARPLUS, K; LI, W; LOPEZ, R; MCWILLIAM, H; REMMERT, M; SÖDING, J; THOMPSON, JD; HIGGINS, DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7:539 doi:10.1038/msb.2011.75.

SIGRIST, CJA; DE CASTRO, E; CERUTTI, L; CUCHE, BA; HULO, N; BRIDGE, A; BOUGUELERET, L; XENARIOS, I. 2012. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gks1067.

SMART, O; NEDUVELIL, J; WANG, X; WALLACE, B; SANSOM, M. 1996. HOLE: A Program for the Analysis of the Pore Dimensions of Ion Channel Structural Models. *J. Mol. Graphics.* 14 (6), 354–360.

SLUSE, FE. 1996. Mitochondrial metabolite carrier family, topology, structure and functional properties: an overview. *Acta Biochim Pol* 43(2):349–360.

SLUSE, FE. 2012. Uncoupling Proteins: Molecular, Functional, Regulatory, Physiological and Pathological Aspects Scatena, Ret al (eds.), *Advances in Mitochondrial Medicine, Advances in Experimental Medicine and Biology* 942, Springer Netherlands.

SON, C; HOSODA, K; ISHIHARA, K; BEVILACQUA, L; MASUZAKI, H; FUSHIKI, T; HARPER, MEM; NAKAO, K. 2004. Reduction of diet-induced obesity in

transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* 47, 47-54.

TROTT, O; OLSON, AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem.* 31(2): 455–461.

TZAGOLOFF, A. 1982. *Mitochondria.* New York, Estados Unidos, Plenum Press. 342 p.

VIDAL-PUIG, AJ; GRUJIC, D; ZHANG, CY; HAGEN, T; BOSS, O; IDO, Y; SZCZEPANIK, A; WADE, J; MOOTHA, V; CORTRIGHT, R; MUOIO, DM; LOWELL, BB.. 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258–16266.

YAFFE, MP. 1999. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283:1493–1497.

YANG, J; YAN, R; ROY, A; XU, D; POISSON, J; ZHANG, Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12: 7-8.

ZACKOVA, M; SKOBISOVÁ, E; URBÁNKOVÁ, E; JEZEK P. 2003. Activating omega-6 polyunsaturated fatty acids and inhibitory purine nucleotides are high affinity ligands for novel mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *J Biol Chem.*278(23):20761-9.

ZHANG, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 4.

ZHAO, L; WANG, S; ZHU, Q; WU, B; LIU, Z; OUYANG, B; CHOU JJ. 2017. Specific Interaction of the Human Mitochondrial Uncoupling Protein 1 with Free Long-Chain Fatty Acid. *Structure.* 25: 1-9.

ZIEGELHOFFER-MIHALOVIČOVÁ, B; KOLÁR, F; JACOB, W; TRIBULOVÁ, N; UHRÍK, B; ZIEGELHOFFER, A. 1998. Modulation of mitochondria contact sites formation in immature rat heart. *Gen Physiol Biophys.* 17:385-390.

ANEXO 2

Parámetros de la simulación aplicados a cada estructura.

```
#####  
## JOB DESCRIPTION ##  
#####  
#Secondary structure restriction and gradually release  
# embedded in POPC membrane, ions and water.  
# Protein released. PME, Constant Pressure.  
#####  
## ADJUSTABLE PARAMETERS ##  
#####  
structure      proteina.psf  
coordinates    proteina.pdb  
outputName     proteina_eq_prot_rel_msr  
set temperature 310  
# Continuing a job from the restart files  
if {1} {  
set inputname  proteina_mineq  
binCoordinates $inputname.restart.coor  
binVelocities  $inputname.restart.vel  
extendedSystem $inputname.restart.xsc  
}  
firsttimestep  521000  
#####  
## SIMULATION PARAMETERS ##  
#####  
# Input  
paraTypeCharmm      on  
parameters          par_all27_prot_lipidNBFIX.prm  
# NOTE: Do not set the initial velocity temperature if you  
# have also specified a .vel restart file!  
# temperature       $temperature  
# Periodic Boundary Conditions
```

```

# NOTE: Do not set the periodic cell basis if you have also
# specified an .xsc restart file!

if {0} {

cellBasisVector1  98.  0.  0.

cellBasisVector2  0.  98.  0.

cellBasisVector3  0.  0.  96.

cellOrigin        -0.0390621498227 -0.0503903478384 0.05063835904

}

wrapWater         on

wrapAll           on

# Force-Field Parameters

exclude           scaled1-4

1-4scaling        1.0

cutoff            12.0

switching         on

switchdist        10.0

pairlistdist      14.0

# Integrator Parameters

timestep          2.0 ;# 2fs/step

rigidBonds        all ;# needed for 2fs steps

nonbondedFreq     1

fullElectFrequency 2

stepspercycle     10

#PME (for full-system periodic electrostatics)

if {1} {

PME               yes

PMEGridSizeX      105

PMEGridSizeY      105

PMEGridSizeZ      155

}

# Constant Temperature Control

langevin          on ;# do langevin dynamics

langevinDamping   1 ;# damping coefficient (gamma) of 5/ps

langevinTemp      $temperature

```

```

# Constant Pressure Control (variable volume)

if {1} {

useGroupPressure      yes ;# needed for 2fs steps

useFlexibleCell       yes  ;# no for water box, yes for membrane

useConstantArea       no   ;# no for water box, yes for membrane

langevinPiston        on

langevinPistonTarget  1.01325 ;#   in bar -> 1 atm

langevinPistonPeriod  100

langevinPistonDecay   50

langevinPistonTemp    $temperature

}

restartfreq            10000      ;# 10000steps = every 2ps

dcdfreq                10000

xstFreq                10000

outputEnergies         10000

outputPressure         10000

# Fixed Atoms Constraint (set PDB beta-column to 1)

if {0} { #esta desactivado

fixedAtoms             on

fixedAtomsFile         nottails.fix.pdb

fixedAtomsCol          B

fixedAtomsForces       on

}

#####

## EXTRA PARAMETERS                                     ##

#####

# Put here any custom parameters that are specific to

# this job (e.g., SMD, TclForces, etc...)

#eFieldOn yes

#eField 0 0 -0.155

margin 3

if {1} {

extraBonds yes

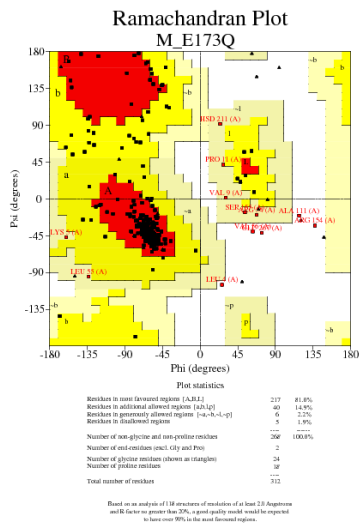
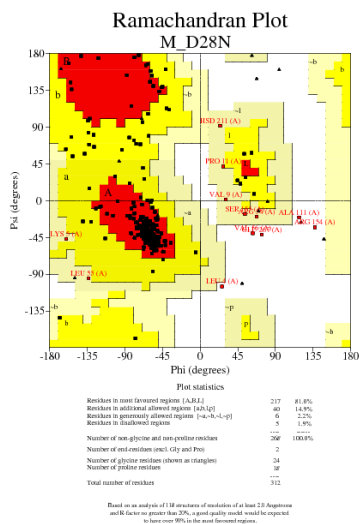
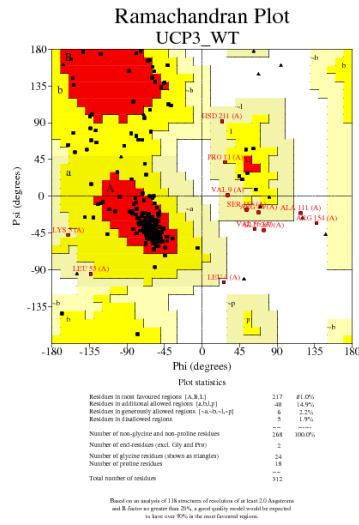
extraBondsFile proteina_extrabonds_ssrestraint.dat

```

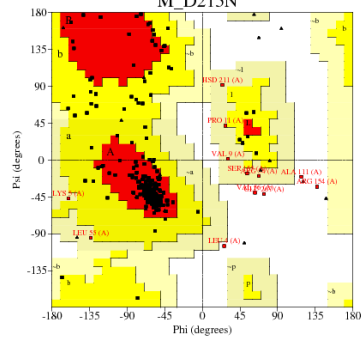
```
}  
  
#####  
## EXECUTION SCRIPT ##  
#####  
  
# Minimization  
  
if {0} {  
  minimize          20000  
  reinitvels        $temperature  
}  
  
run 5000000 ;# 10 ns
```

ANEXO 3

Gráficos de Ramachandran de las estructuras de UCP-3 y mutantes.



Ramachandran Plot M_D215N



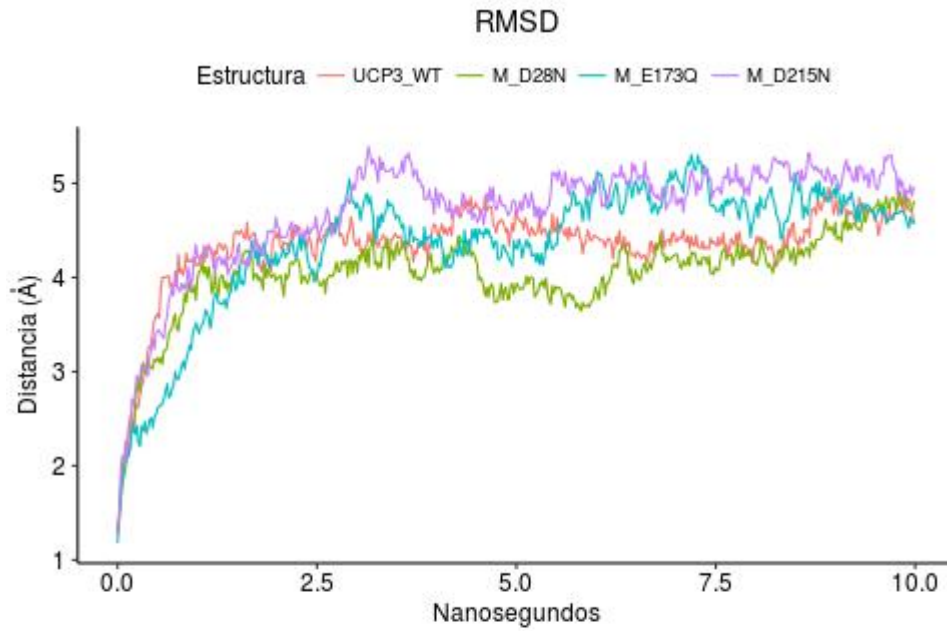
Plot statistics

Residues in most favored regions (A&B)	217	81.0%
Residues in additional allowed regions (a&b)	40	14.0%
Residues in generously allowed regions (-a,-b,-p)	6	2.2%
Residues in disallowed regions	5	1.9%
Number of non-glycine and non-proline residues	206	100.0%
Number of outliers (incl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues shown as triangles	24	
Number of proline residues	18	
Total number of residues	312	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%. Good quality models should be expected to have over 90% in the most favored regions.

ANEXO 4

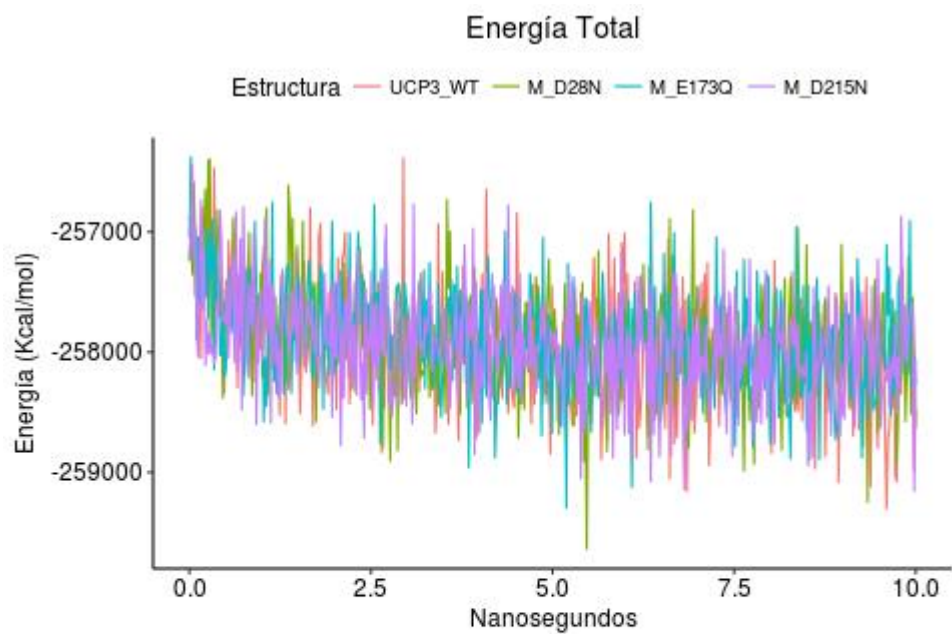
Parámetros de validación de las DM.



Estructura	Promedio	DE
UCP3_WT	4.34	0.47
M_D28N	4.05	0.46
M_E173Q	4.36	0.70
M_D215N	4.70	0.61

Figura 1A: Valores de RMSD de todas las estructuras.

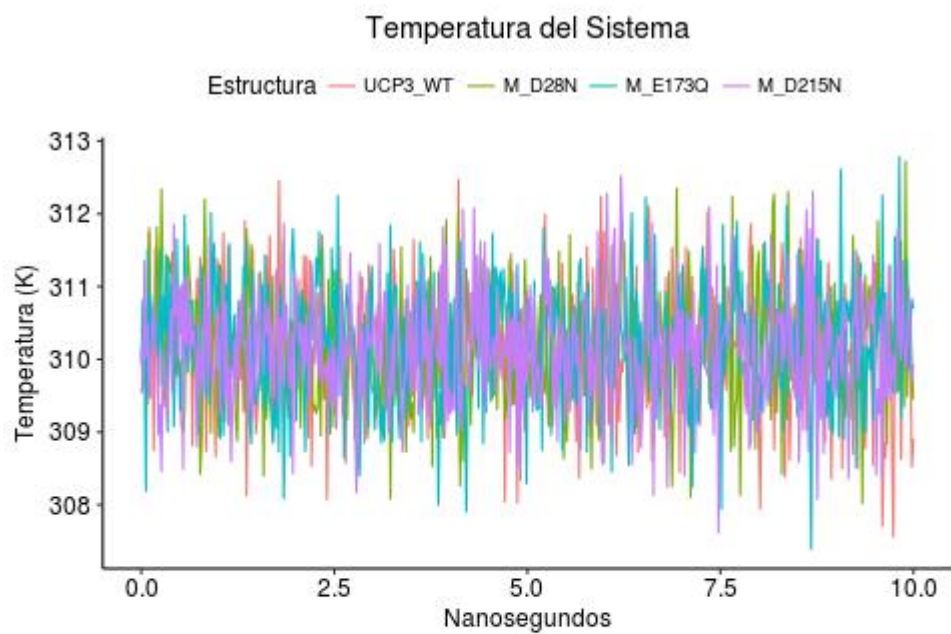
Se muestra que a medida que el tiempo de simulación transcurre, los movimientos del esqueleto de la estructura proteica se van equilibrando.



Estructura	Promedio	DE
UCP3_WT	-257947.1	471.52
M_D28N	-257901.2	443.73
M_E173Q	-257877.4	429.75
M_D215N	-257938.6	428.08

Figura 2A: Valores de energía total de todas las estructuras.

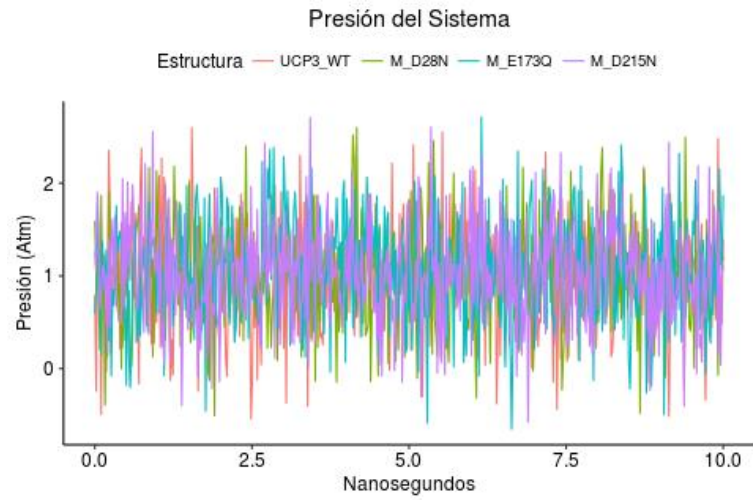
La energía total de las estructuras fluctúa entre el valor promedio de la misma. Se visualiza un estado de equilibrio dinámico para los sistemas.



Estructura	Promedio	DE
UCP3_WT	310.15	0.83
M_D28N	310.19	0.80
M_E173Q	310.24	0.85
M_D215N	310.14	0.80

Figura 3A: Valores de temperatura de todas las estructuras.

La temperatura del sistema es mostrada. En cada estructura, el promedio es cercano a 310K (37 °C) y los valores varían muy poco, como lo indica la baja desviación estándar.



Estructura	Promedio	DE
UCP3_WT	0.99	0.57
M_D28N	0.99	0.54
M_E173Q	1.06	0.57
M_D215N	1.03	0.55

Figura 4A: Valores de presión de todas las estructuras.

Se visualiza la presión con respecto al tiempo de simulación. Como se esperaba, esta es en promedio 1atm, manteniéndose prácticamente constante y con una variación muy pequeña.