



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**EL MODELADO MOLECULAR COMO HERRAMIENTA
PARA EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS
QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS**

Autor: Laura Castellana Iglesias

Tutor: Giorgio Giorgi

Convocatoria: Junio 2017

ÍNDICE

1.-RESUMEN	1
2.-INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
3.- OBJETIVOS	6
4.- METODOLOGÍA	7
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
MODELADO MOLECULAR O DOCKING.....	7
COMPLEJO TROMBINA-ANTITROMBINA III	9
6.- CONCLUSIONES	13
7.- BIBLIOGRAFÍA	13

1.-RESUMEN

El sistema de coagulación es la primera línea de defensa frente a alteraciones en el sistema vascular. En caso de la rotura de algún vaso, el sistema se activa para evitar la pérdida de sangre formando un coágulo. Pero debe haber un equilibrio entre la coagulación, la anticoagulación y la fibrinólisis en condiciones fisiológicas. A este proceso dinámico de equilibrio en la regulación de la fluidez de la sangre se le denomina hemostasia.

Cuando este proceso sufre alguna alteración y el equilibrio hemostásico desaparece, es cuando aparecen las patologías. Pueden ser de dos tipos en función del proceso que predomine, o bien un proceso coagulante o uno anticoagulante, aparecerán enfermedades trombóticas o enfermedades hemorrágicas respectivamente.

En esta revisión bibliográfica tratamos de proponer una estructura posible a fármacos que puedan emplearse en enfermedades hemorrágicas.¹

Se emplea un programa de modelado o docking para dilucidar dicha estructura, observando cómo es el sitio activo de la enzima sobre la que queremos actuar e inhibir, en este caso analizamos la unión de la antitrombina con la trombina. Este programa consiste en que la forma de una molécula determina cómo interaccionará en el sitio activo de la enzima sobre la que actuar. En función de esta interacción, se establecerá la actividad biológica, por lo que al diseñar los fármacos mediante docking se busca que éstos interaccionen lo mejor posible con el receptor del sitio activo.

2.-INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La hemostasia es un proceso dinámico de regulación de la fluidez de la sangre, reparación de lesiones vasculares y limitación de la pérdida de sangre, a la vez que también evita la formación de trombos que dificulten la circulación sanguínea y por tanto, la perfusión inadecuada de los órganos vitales. Está encaminado a mantener la integridad del árbol vascular, evitando y corrigiendo las disrupciones u obstrucciones en alguno de sus segmentos.

En la hemostasia profiláctica, la resistencia parietal de los vasos desempeña el papel principal, pero también intervienen, contribuyendo al adecuado mantenimiento del endotelio vascular, los trombocitos y los factores plasmáticos de la coagulación. El papel que desempeñan las plaquetas es de acción protectora sobre el endotelio pero el mecanismo no está aclarado aún. Los factores plasmáticos de la coagulación intervienen

logrando el equilibrio adecuado y la renovación de fibrina de la capa endotelial de los capilares.

La hemostasia protectora, a la cual se hace referencia corrientemente cuando se habla simplemente de hemostasia, puede subdividirse en las siguientes fases, en cada una de las cuales existe interacción entre la sangre y la pared de los vasos.

1. Vasoconstricción localizada a nivel del área afectada. Después de la incisión vascular se produce una vasoconstricción inicial, que resulta de la estimulación, por un mecanismo reflejo, de terminaciones simpáticas en la musculatura lisa de la pared de los vasos. Este proceso tiene como finalidad favorecer la estasis en la circulación y favorecer así la formación del trombo o coágulo plaquetario.
2. Formación de un agregado o trombo de plaquetas sobre la superficie vascular lesionada. Las plaquetas desempeñan un papel decisivo en la detención de las hemorragias, porque constituyen el trombo plaquetario, el cual proporciona la hemostasia primaria o provisional. En la formación del trombo plaquetario hay que distinguir dos fenómenos: la adhesión de los trombocitos al subendotelio y el proceso de agregación.
3. Formación de fibrina que refuerza el trombo plaquetario. Esta fase consiste en la transformación del fibrinógeno, que es soluble, en una proteína insoluble. La coagulación del plasma intensifica y asegura la hemostasia temporal iniciada con la vasoconstricción y desarrollada por las plaquetas.
4. Eliminación de los depósitos de fibrina o fibrinolisis. La función de este sistema es la de disolver el coágulo formado.

El sistema de coagulación se activa para evitar la pérdida de sangre. Esta sangre se va a coagular por la formación de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble por la acción de la trombina. Este sistema de coagulación se denomina *Cascada de la coagulación* y comprende una serie de reacciones encadenadas en la que en cada paso, un factor de la coagulación se convierte en una proteasa activa, ésta activará a otro factor de la coagulación, y así sucesivamente. El proceso termina con la formación de trombina (factor IIa).

El evento iniciador de la coagulación sanguínea es la exposición del factor tisular (FT), lo cual da lugar a la formación del complejo factor VIIa/FT que activa a los factores IX

y X en la superficie de células que expresan el FT y se forman las primeras cantidades de trombina².

La función de la trombina consiste en fragmentar pequeños péptidos de fibrinógeno y permite que éste se polimerice y forme el coágulo de fibrina. Esta trombina ejerce múltiples funciones en el organismo hemostático, pero es insuficiente para lograr una hemostasia eficaz, lo cual solo se logra con el ensamblaje del complejo protrombinasa en la superficie plaquetaria.³

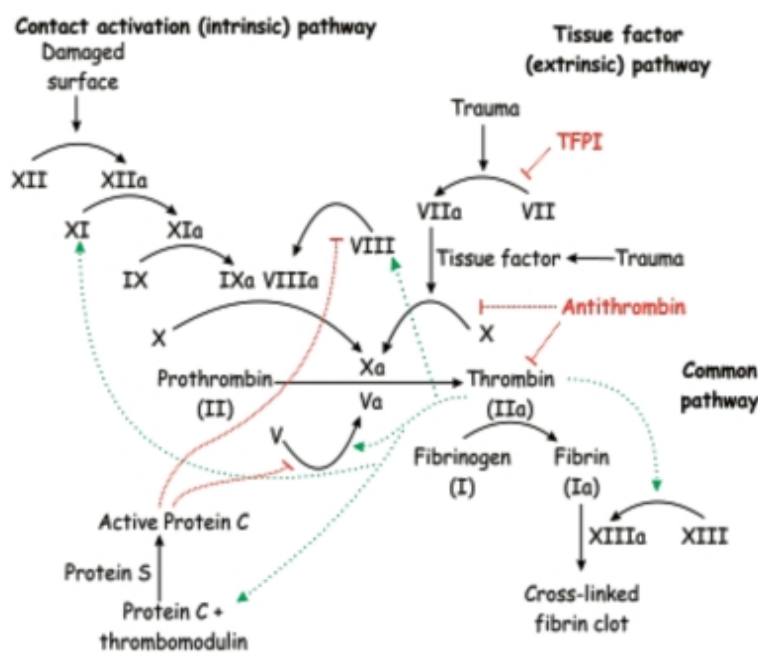


Figura 1. Esquema general del proceso de la coagulación⁴.

El elemento clave que nos interesa en el presente estudio es la antitrombina III (AT III), una α -glicoproteína plasmática formada por una sola cadena de péptidos que inhibe la trombina (es uno de los inhibidores más potentes de la trombina con la que forma un complejo irreversible) y los factores libres Xa, IXa, VIIIa plasmáticos. Al inhibir la acción de la trombina, se impide la formación del coágulo, por lo que una deficiencia de dicha glicoproteína, estará asociada con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades tromboembólicas.⁵

Se trata de un potente anticoagulante con propiedades antiinflamatorias. Se sabe que tiene un efecto inhibitorio en los procesos proinflamatorios y procoagulantes.⁶ Es una serpina de la superfamilia de proteínas que contienen α_1 -antitripsina, α_1 -

antiquimotripsina, ovoalbúmina y angiotensinógeno, todos considerados aminoácidos homólogos. Junto con la trombina, son proteínas séricas normalmente fabricadas en el hígado y conocidas por su actividad en la coagulación sanguínea.

Tiene un amplio espectro de actividad, además de inhibir la trombina, inhibe otros factores activados de la coagulación formando un complejo bimolecular estable con la enzima.

El mecanismo de acción de la ATIII consiste en la inhibición principalmente de los factores IIa y Xa. Con menos intensidad también inhibe las formas activadas de los factores IX, XI, XIII.

La ATIII y la trombina reaccionan entre sí de forma estequiométrica, formando un complejo inactivo.

La antitrombina III es un inhibidor de serina proteasa considerado por ser el principal regulador de la coagulación intravascular. La deficiencia de esta proteína resulta en enfermedad trombótica. La antitrombina III inhibe la actividad de la trombina formando un complejo con esta proteasa. La formación del complejo está asociado con la escisión de un enlace peptídico entre una arginina y un resto de serina del inhibidor. La trombina- Antitrombina III es muy estable en presencia de desnaturizantes tales como SDS o HCl de guanidina, pero puede ser disociado por alto pH o incubación prolongada a 37 °C produciendo trombina activa y AT inhibida.⁷

Los fármacos inhibidores de dicha unión entre trombina y antitrombina III serían compuestos procoagulantes que favorecerían la formación de trombos en el organismo. Esto sería útil en casos de niveles patológicamente altos de antitrombina III que suponen un mayor riesgo de padecer hemorragias e infecciones.

Estos posibles fármacos aún están por desarrollarse por lo que no hay información acerca de ellos. En este estudio se busca obtener una idea estructural de cómo podrían ser estos fármacos, cuál podría ser su estructura para que pudieran interactuar con el sitio activo de la trombina como lo haría la antitrombina, impidiendo así el acceso de la glicoproteína y evitar que ésta ejerza su acción anticoagulante.

Para encontrar este tipo de fármacos inhibidores de antitrombina se va a emplear un método denominado Modelo Molecular o Docking. Que consiste en que la forma de una

molécula nos determina cómo va a interaccionar con sus receptores y por tanto, si dicha molécula tendrá actividad biológica. Esto quiere decir, que al diseñar un fármaco se busca que interaccione lo mejor posible con la diana terapéutica objeto del estudio, para realizar una determinada actividad.

En la literatura reciente, ha habido un interés creciente en el diseño de fármacos que establezcan un enlace covalente con la proteína diana. Cerca de un 30% de los fármacos comercializados dirigidos a las células diana actúan por este mecanismo de inhibición covalente.

Los fármacos típicos covalentes tienen una afinidad de unión mayor con la diana por el enlace covalente que se forma entre el ligando (un electrófilo) y la diana (un nucleófilo), por lo tanto con una potencia mayor mientras que a la vez se mantiene el tamaño pequeño farmacéuticamente favorable de la molécula. Además esta interacción covalente también incrementa la duración del efecto biológico.

Pero estas interacciones covalentes del fármaco con la enzima diana también tienen sus desventajas como son la mayor posibilidad de toxicidad por la dificultad de la posterior disociación del enlace, por lo tanto se requiere una mayor afinidad de este fármaco para causar la menor toxicidad posible.

El mayor ejemplo de este tipo de interacciones entre fármaco y diana es la aspirina, que fue la primera comercializada. La aspirina modifica covalentemente la ciclooxigenasa induciendo la acetilación de un residuo de serina que se sitúa en el sitio activo del receptor. Otro posible ejemplo son los antibióticos beta lactámicos que acetilan la serina del sitio activo de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) y matan la bacteria inhibiendo el último paso de la síntesis de la pared celular.

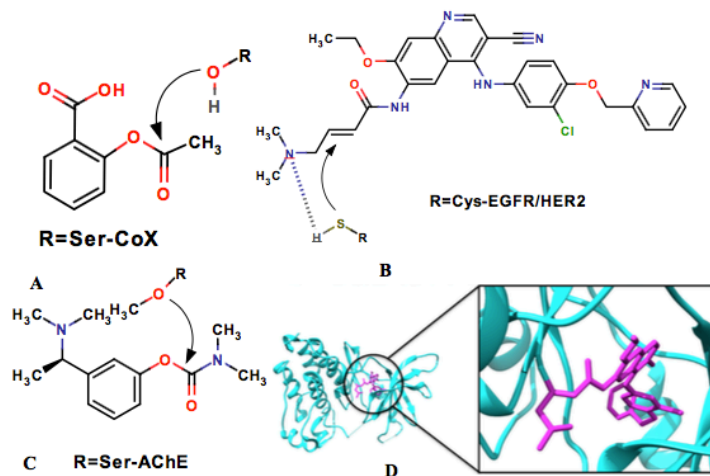


Figura 2. Ejemplos de inhibiciones covalentes incluyendo su proteína diana con el sitio activo nucleófilo: (A) aspirina; (B) neratinib; (C) rivastigmina; (D) estructura de cristal de dominio quinasa de EGFR en complejo con neratinib, muestra los enlaces covalentes entre el receptor y ligando.⁸

Por tanto, los objetivos de esta línea de investigación son 3: 1) encontrar nuevos compuestos para su posterior optimización; 2) identificar los compuestos selectivos; y 3) optimizar la actividad biológica de estos compuestos activos. Para alcanzar dichos objetivos, y dependiendo de la información experimental disponible se emplea con frecuencia el acoplamiento molecular automatizado (en inglés *molecular docking*), cribado o filtrado computacional de colecciones de compuestos (*virtual screening*) y modelado del farmacóforo (*pharmacophore modeling*).

3.- OBJETIVOS

El objetivo de nuestro trabajo bibliográfico es estudiar los posibles fármacos que actúen impidiendo la unión de la antitrombina y la trombina y que por tanto podrían emplearse como fármacos procoagulantes ya que al inhibir este complejo, la trombina podría actuar y el trombo se formaría. Estos fármacos podrían emplearse para enfermedades hemorrágicas en cuyo caso lo principal es evitar la pérdida de sangre y para ello se necesita que la sangre no fluya como normalmente y se coagule. Ejemplos de dichas enfermedades son: Hemofilias, Enfermedad de Von Willebrand o Coagulación Intravascular Diseminada (CID).

Para encontrar este tipo de fármacos inhibidores de antitrombina se va a emplear el método denominado Modelo Molecular o Docking.

4.- METODOLOGÍA

Para el estudio se han realizado búsquedas bibliográficas en base de datos como SciFinder y PubMed combinando las palabras clave “trombina”, “antitrombina”, “coagulación”, “inhibidor”, entre otras. Se han seleccionado los artículos científicos que contenían estudios actuales publicados sobre la coagulación en general y más concretamente sobre las moléculas trombina y antitrombina III.

Se excluyen por tanto todos aquellos artículos en los que se exponen estudios sobre moléculas empleadas como fármacos para determinadas enfermedades y que actúan como inhibidores directos de la trombina y todos aquellos que tratan sobre fármacos anticoagulantes ya que se busca lo contrario.

Pero sobre la interacción entre las moléculas estudiadas prácticamente no se encuentra información bibliográfica así que sólo es posible establecer una hipótesis sobre su unión y por tanto, para la finalización del trabajo resulta imposible continuar con la parte práctica de este.

Para dicha parte se debería emplear el programa informático de *Docking* para llevar a cabo la modulación de una nueva molécula que interaccione en la unión de la trombina y la antitrombina III evitando esta unión y de este modo poder establecer posibles moléculas que actuaran como procoagulantes en la circulación sanguínea.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelado molecular o docking

La modelación molecular o *docking* consiste en diseñar los modelos estructurales de las moléculas en un ordenador y proporcionarles distintas conformaciones. De esta manera, podemos conseguir diseños de fármacos de una manera racional. Mediante un programa de ordenador se escanean miles de combinaciones de moléculas para encontrar aquellas con la conformación y estructura más adecuada a la interacción con el receptor. Se van realizando las combinaciones y modificando la molécula para encontrar la interacción más favorable con el receptor.⁹

Se utiliza un programa informático que nos facilita estas herramientas y que se basa en una serie de bases de datos de compuestos, incluyendo información de actividad biológica.

Estas bases de datos pueden contener información de hasta millones de estructuras con datos de actividad biológica y son parte de lo que se denomina *big data*.

Diferentes enfoques computacionales se han desarrollado para simular las interacciones covalentes aunque aún queda mucho que estudiar. Estos enfoques se han implementado en el diseño de fármacos por ordenador para describir las interacciones covalentes entre inhibidores y dianas biológicas.

El modelado es un procedimiento computacional basado en la estructura básica racional del fármaco diseñado para identificar las conformaciones correctas de la molécula pequeña del ligando y estimar la potencia de la interacción proteína-ligando, que normalmente consiste en un receptor y un ligando. Los programas más habituales para este proceso son *Autodock*, *Autodock Vina*, *GOLD* y *FlexX*.

El acoplamiento de ligandos que están unidos a un receptor a través de interacciones no covalentes es relativamente común en la actualidad. La mayoría de los métodos de modelado que se han desarrollado han estado centrados en la predicción de la efectividad de la unión en los modelos inhibidores no covalentes. Mientras que el modelado de ligandos que se unen de manera covalente ha sido más complicado debido a la reacción entre ligando y receptor que tiene lugar.

Para comprender la unión covalente entre ligando y receptor y poder realizar un modelado molecular de este tipo de uniones, se han desarrollado diferentes rutinas. Pero estos programas de modelado sólo son capaces de predecir la energía de unión entre un nucleófilo receptor y un ligando electrófilo.

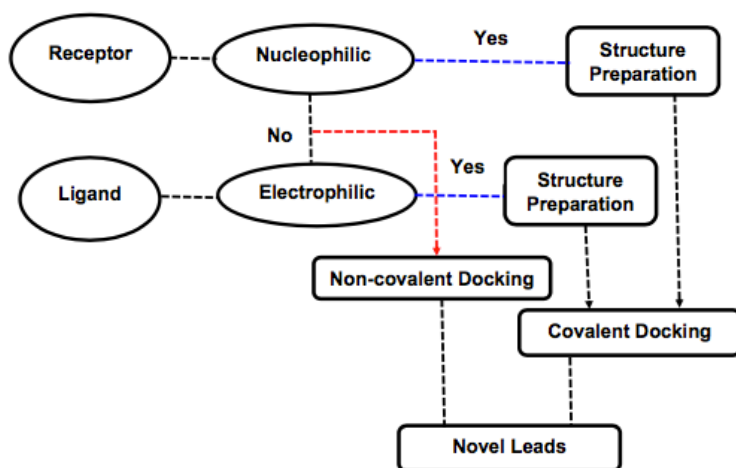


Figura 3. Esquema general del modelado covalente en el descubrimiento de fármacos.⁴

Complejo trombina-antitrombina III

Como se buscan estructuras que eviten la unión de la trombina y la antitrombina III, se busca primero la interacción entre ambas moléculas para poder diseñar una estructura que contenga los aminoácidos integrantes de esta unión. Para ello se analiza la trombina y sus sitios de unión con distintos componentes de la coagulación que se detalla en la siguiente figura:

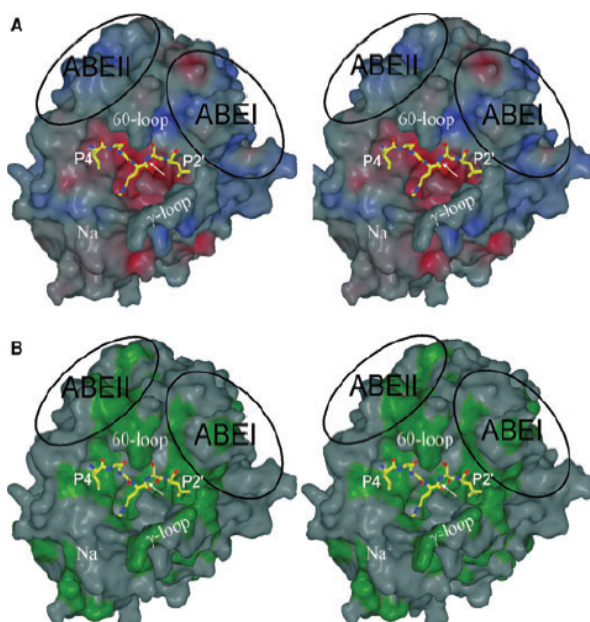


Figura 4. Geografía de la trombina. Los pares estéreo de representaciones superficiales de trombina se muestran en la orientación estándar, coloreados de acuerdo con el potencial electrostático, **A.** (rojo para negativo y azul para positivo), o hidrofobicidad

(verde) **B**. El sitio activo está ocupado en esta figura por el Centro reactivo de AT de P4 a P2 ϕ (varillas amarillas). El reconocimiento de sustrato dentro del sitio activo depende de las interacciones favorables entre el residuo P1 y la cavidad S1 profunda y ácida, y entre los restos hidrofóbicos N-terminales a P1 (a menudo prolina P2 y un residuo aromático en P4) en el surco hidrofóbico conocido como aril- Bolsillo de unión. La hendidura del sitio activo de trombina es extraordinariamente profunda debido a la presencia de los bucles de inserción de 60 y C por encima y por debajo del sitio activo. Dos sitios exteriores básicos en la superficie de la trombina han sido identificados como críticos para el reconocimiento de sustrato y cofactor: los llamados exositos I y II de unión a aniones (ABEI y ABEII). Aunque la figura representa un sitio activo de trombina ampliamente abierto, la trombina puede existir en una conformación cerrada menos activa en ausencia de cofactor, sustrato o Na^+ , que se coordina cerca del sitio indicado.¹⁰

El cofactor de heparina II y AT son los únicos inhibidores específicos de la trombina en la circulación. Son similares en muchos aspectos: ambos circulan en el plasma a concentraciones micromolar, son miembros de la familia de inhibidores de serpin-proteasa y comparten el mecanismo de inhibición irreversible de serpinas. Además inhiben la trombina en aumento de los niveles de activación de GAG (glicosaminoglucanos) y ambos pueden utilizar los exositos de trombina para reconocerla. La inhibición de la trombina por serpinas requiere la progresión eficiente a través de los pasos catalíticos de acil-enzima complejo y por lo tanto requiere de la formación de un complejo.

La inhibición de la trombina por AT se acelera 1000 veces a través de la unión GAG, sin embargo la tasa no catalizada es apreciable y es probable que se deba a un proceso de relevancia fisiológica.

El mecanismo endotelial por el cual el glicosaminoglucano de superficie celular acelera la inhibición de la trombina por AT se puede entender en términos de difusión mejorada, conocida como el efecto modelo. La AT vinculante con alta afinidad para secuencias específicas de pentasacáridos como la trombina se traduce en una cadena GAG unidimensional con una débil unión al exosito II. El complejo AT-trombina se estabiliza luego por su co-ocupación en la misma cadena de heparina. Así el exosito II de la trombina está implicado críticamente en la inhibición por AT y se plantea la

hipótesis improbable de que las propiedades de la superficie de la AT y la trombina provoquen interacciones con el exosito.

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	Cofactor
Fibrinogen (A)	Gly	Gly	Val	Arg	Gly	Pro	Arg	None
Fibrinogen (B)	Phe	Ser	Ala	Arg	Gly	His	Arg	None
FV (709)	Leu	Gly	Ile	Arg	Ser	Phe	Arg	None
FV (1018)	Leu	Ser	Pro	Arg	Thr	Phe	His	None
FV (1545)	Trp	Tyr	Leu	Arg	Ser	Asn	Asn	None
FVIII (372)	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	None
FVIII (740)	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	None
FVIII (1689)	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	None
FXIII	Gly	Val	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Fibrin
PAR1	Leu	Asp	Pro	Arg	Ser	Phe	Leu	Gplb α
PAR4	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Tyr	Pro	Gplb α
FXI	Ile	Lys	Pro	Arg	Ile	Val	Gly	Gplb α
PC	Val	Asp	Pro	Arg	Leu	Ile	Asp	TM
TAFI	Val	Ser	Pro	Arg	Ala	Ser	Ala	TM
AT	Ile	Ala	Gly	Arg	Ser	Leu	Asn	Heparin
HCI	Phe	Met	Pro	Leu	Ser	Thr	Gln	Heparin

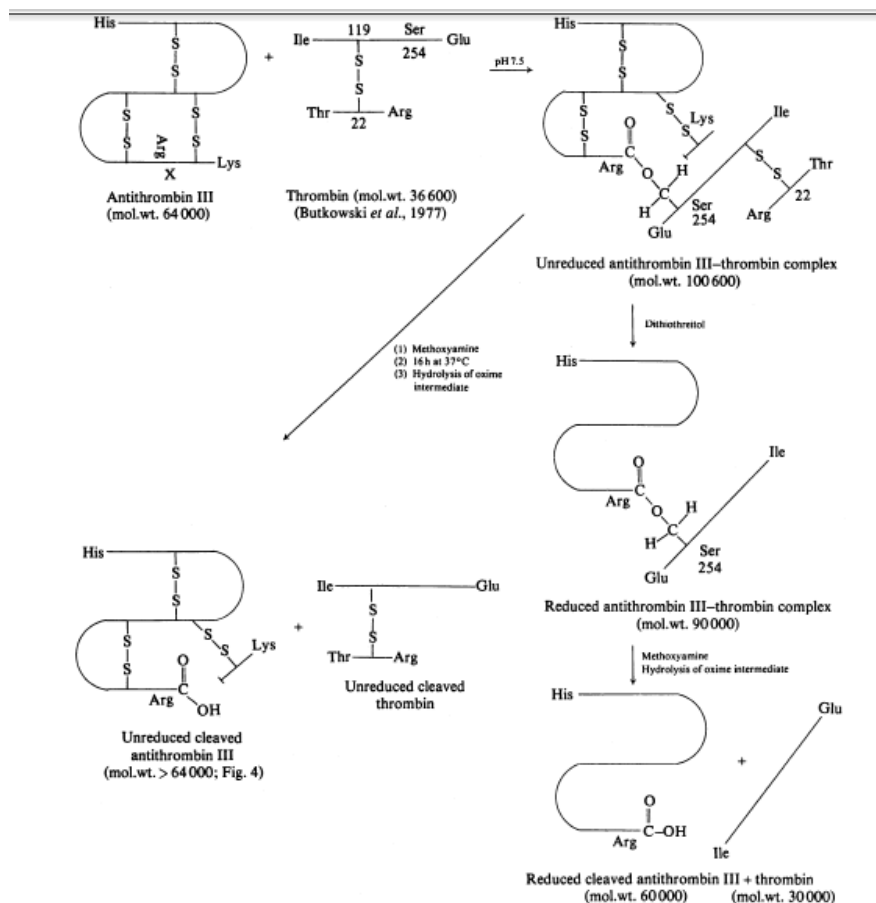
Tabla 1. Secuencias de los sustratos naturales de la trombina¹⁰

La reciente estructura del complejo ternario entre AT, trombina y un mimético de heparina revela una interfaz de contacto directo sorprendentemente íntima con el acoplamiento de dos exositos adicionales: lazo gamma y sitio de unión con Na⁺.¹⁰

El mecanismo por el cual la AT y la trombina interactúan no ha sido del todo elucidado y la naturaleza del enlace no se ha establecido claramente.

Se intenta identificar las fracciones específicas de trombina y antitrombina III que reaccionan durante la formación del complejo y se encontró que el residuo de serina en el sitio activo de la trombina y la arginina de AT eran esenciales para las asociaciones eficaces de trombina-AT. Debido a la estabilidad de la AT-trombina y sus requerimientos de pH para su disociación se requiere un éster carboxílico entre las dos proteínas¹¹.

En el siguiente esquema se exponen los distintos enlaces que intervienen en dicha unión:



Esquema 1. Formación hipotética y escisión del complejo antitrombina III-trombina.

Las posiciones del sitio reactivo, la arginina-X y los puentes disulfuro en la antitrombina III son provisionales, ya que no se conocen las ubicaciones exactas.¹¹

La información obtenida en la búsqueda bibliográfica sobre el complejo trombina-antitrombina III es hipotética y por tanto no es útil para el empleo del programa de docking que se quería emplear para obtener posibles moléculas con actividad procoagulante. En este caso, lo único que quedaría más claro es la unión de una serina de la trombina con una arginina de la antitrombina III. Pero carecemos de los demás aminoácidos que intervienen en la formación del complejo y del lugar que ocupan en ambas moléculas por lo que no se puede establecer un esquema fiable de los aminoácidos que actúan para introducirlos en los programas de docking.

Al carecer de más información después de una detallada búsqueda, se da por finalizada sin resultados suficientes para continuar con el modelado molecular. Se necesita más investigación sobre la unión del complejo trombina-antitrombina III para poder obtener

estructuras que eviten la formación de dicho complejo ya que lo que hay descubierto hasta el momento es todo hipotético.

6.- CONCLUSIONES

El sistema de coagulación se activa para evitar la pérdida de sangre, este sistema se denomina *Cascada de la coagulación* y comprende una serie de reacciones encadenadas que terminan con la formación de trombina.

La función de la trombina consiste en fragmentar pequeños péptidos de fibrinógeno y permite que éste se polimerice y forme el coágulo de fibrina.

La antitrombina III es una glicoproteína que se une a la trombina de manera que inhibe su acción. Al inhibir la acción de la trombina, se impide la formación del coágulo, por lo que una deficiencia de dicha glicoproteína, estará asociada con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades tromboembólicas.

El modelo Molecular o Docking consiste en que la forma de una molécula nos determina cómo va a interactuar con sus receptores y por tanto, si dicha molécula tendrá actividad biológica. Esto quiere decir, que al diseñar un fármaco se busca que interactúe lo mejor posible con la diana terapéutica objeto del estudio, para realizar una determinada actividad.

Para la investigación de nuevas moléculas con actividad terapéutica determinada, este proceso es muy útil y facilita el desarrollo y descubrimiento de los nuevos fármacos.

En este caso, en el que no había bibliografía detallada y específica acerca de la unión y formación del complejo trombina-antitrombina III, no se ha podido establecer con claridad los aminoácidos implicados en dicha unión y por tanto no se ha podido emplear el modelado molecular para obtener estas nuevas moléculas procoagulantes que podrían actuar como fármacos procoagulantes en patologías hemorrágicas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

¹ Henri M.H. Spronk, José W.P. Govers-Riemslog, and Hugo ten Cate. The blood coagulation system as a molecular machine. *BioEssays* [Internet]. 2003 [citado 13 febrero 2017]; 25 (12):1220–1228. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635257>

² J. Sans-Sabrafen and co. *Hematología clínica*. 3ª edición Mosby/Doyme Libros. Madrid, España 1994.

³ Concepción A.D Delfina A.V. Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2001 [citado 13 febrero 2017]; 17 (2): 77-89. Disponible en:

http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol17_2_01/hih01201.htm

⁴ Hezekiel Mathambo Kumalo, Soumendranath Bhakat and Mahmoud E. S. Soliman. Theory and Applications of Covalent Docking in Drug Discovery: Merits and Pitfalls. Molecules [Internet]. 2015 [citado 27 enero 2017]; 20: 1984-2000. Disponible en:

<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/2/1984>

⁵ Hiroaki Kawano and Koji Maemura. Edoxaban was effective for the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism in a cancer patient with antitrombin III deficiency. Intern Med [Internet]. 2016 [citado 27 enero 2017]; 55: 3285-3289. Disponible en:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/55/22/55_55.7314/_article

⁶ Arash Afshari, senior resident , Jørn Wetterslev, staff specialist, Jesper Brok, PhD student, Ann Møller, staff specialist. Antithrombin III in critically ill patients systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. BMJ [Internet]. 2007 [citado 18 febrero 2017]; 335:1248. Disponible en:

<http://www.bmj.com/content/335/7632/1248>

⁷ Charles R and Erkki Ruoslahti. Association of Thrombin-Antithrombin III Complex with Vitronectin in Serum. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY [Internet]. 1985 [citado 2 mayo 2017]. 260, [15610-1561]. Disponible en:

<http://www.jbc.org/content/260/29/15610.full.pdf>

⁸ Hezekiel Mathambo Kumalo, Soumendranath Bhakat and Mahmoud E. S. Soliman. Theory and Applications of Covalent Docking in Drug Discovery: Merits and Pitfalls. Molecules [Internet]. 2015 [citado 27 enero 2017]; 20: 1984-2000. Disponible en:

<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/2/1984>

⁹ Evanthia Lionta, George Spyrou, Demetrios K. Vassilatis and Zoe Cournia. Structure-based virtual Screening for Drug Discovery, principles, aplicaciones, and Recent advances. Current Topics in Medicinal Chemistry [Internet]. 2014 [citado marzo 2017]; 14, 1923-1938. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443793/>

¹⁰ J. A. Huntington. Molecular recognition mechanisms of thrombin. Journal of Thrombosis and Haemostasis [Internet]. 2005 [citado 2 mayo de 2017]. 3:1861–1872. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102053>

¹¹ Maria O. LONGAS* and Thomas H. FINLAY. The covalent nature of the human antithrombin III-thrombin bond. Biochem. J. [Internet]. 1980 [citado 2 mayo de 2017]. 189, 481-489. Disponible en:

<http://www.biochemj.org/content/189/3/481.full-text.pdf>