



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Química

Área de Biofísicoquímica

Posgrado en Ciencias Químicas
Doctorado Directo

**“Determinación del mecanismo molecular de la inhibición
de TcTIM: estudios de la interacción proteína-ligando
y su aplicación en el diseño de fármacos”**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Química)
presenta

I. B. Q. I. Liliana Marisol Moreno Vargas

Dr. Arturo Rojo Domínguez
Asesor

México, D. F. 23 de enero de 2008.

ÍNDICE

Resumen del proyecto de investigación	
Introducción.....	1
<i>i.</i> Generalidades en enzimología.....	1
<i>ii.</i> Triosafosfato isomerasa (TIM o TPI).....	5
<i>iii.</i> Interacción proteína-ligando. Redefinición del estado nativo y sus implicaciones en el reconocimiento selectivo de drogas.....	7
1. Antecedentes.....	10
1.1. Enfermedad de Chagas.....	10
1.2. Estudios iniciales de la inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa.....	10
1.3. Inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM).....	11
1.4. Objetivos del proyecto de investigación.....	14
1.4.1. Objetivo general.....	14
1.4.2. Objetivos particulares.....	14
1.5 Estrategia seguida durante la realización del trabajo de investigación.....	15
2. Materiales y métodos.....	17
2.1. Abordaje experimental.....	17
2.1.1. Triosafosfato isomerasa.....	17
2.1.1.1. Diálisis de triosafosfato isomerasa.....	17
2.1.2. Ensayos de actividad enzimática.....	17
2.1.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos de TcTIM.....	17
2.1.2.2. Medición de la actividad catalítica de TcTIM después de su incubación con la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8, C8).....	18
2.1.2.3. Determinación del tipo de inhibición ejercida por C8.....	18
2.1.3. Dicroísmo circular.....	18
2.1.3.1. Obtención de los espectros de dicroísmo circular de TcTIM.....	18

2.1.3.2. Obtención de las cinéticas de desplegamiento seguidas por dicroísmo circular.....	19
2.1.4. Fluorescencia.....	19
2.1.4.1. Obtención de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de TcTIM.....	19
2.1.4.2. Obtención de las cinéticas de emisión de fluorescencia intrínseca de TcTIM.....	19
2.1.4.3. Obtención de las cinéticas de emisión de fluorescencia extrínseca de TcTIM.....	20
2.1.5. Caracterización de C8.....	20
2.1.5.1. Absorción en el ultravioleta y visible de C8.....	20
2.1.5.2. Fluorescencia intrínseca.....	20
2.1.5.2.1. Determinación del máximo de emisión.....	21
2.1.5.2.2. Determinación de la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de C8.....	21
2.1.5.2.3. Determinación del efecto de filtro interno.....	21
2.1.5.2.4. Estabilidad de C8 a permanecer en dilución.....	21
2.1.5.2.5. Estabilidad de C8 ante radiaciones sucesivas.....	21
2.1.5.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	21
2.2. Abordaje computacional.....	22
2.2.1. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular proteína-ligando (docking).....	23
2.2.1.1. Docking.....	23
2.2.1.2. Preparación de la molécula blanco.....	23
2.2.1.3. Preparación del ligando.....	23
2.2.1.4. Complejos proteína-ligando.....	24
2.2.1.4.1. Validación del método de docking.....	24
2.2.1.5. Calculo de la energía de docking del C8 del cristal.....	24

2.2.1.6. Búsqueda de compuestos similares a C8.....	25
2.2.1.7. Identificación de las interacciones establecidas en los complejos constituidos por moléculas similares a C8 (molécula líder) y TcTIM	25
2.2.1.8. Creación del farmacóforo.....	26
2.2.1.9. Generación de quimiotecas a partir del farmacóforo diseñado.....	26
2.2.2. Cribado virtual de las quimiotecas eMolecules I, eMolecules II y Maybridge.	27
2.2.2.1. Validación del método de cribado virtual.....	27
2.2.2.2. Preparación del receptor.....	28
2.2.2.3. Preparación de las quimiotecas.....	29
2.2.2.4. Cribado virtual de las quimiotecas generadas e identificación de nuevas moléculas con potencial farmacológico.....	29
2.2.2.5. Análisis de los resultados obtenidos y determinación de las características de los compuestos que se unen a los receptores.....	30
2.2.3. Determinación de los modos normales de vibración de TcTIM, empleando modelos GNM.....	30
2.2.4. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y EDTA, TEA y Tris-HCl.....	31
2.2.4.1. Identificación de los sitios potenciales de unión en la superficie de TcTIM.....	31
2.2.4.2. Generación de las bibliotecas de confórmers.....	31
2.2.4.3. Docking de las moléculas de EDTA, TEA y Tris-HCl en la superficie de TcTIM.....	31
3. Caracterización de la interacción del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico con triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Estudios experimentales y computacionales.....	33
3.1. Actividad enzimática.....	34
3.1.1. Determinación del tipo de inhibición ejercida por C8.....	36
3.2. Fluorescencia intrínseca y extrínseca.....	37
3.3. Dicroísmo circular.....	40
3.4. Identificación y evaluación de la accesibilidad a sitios de unión con características que favorecen la desestabilización de TcTIM.....	41

3.4.1. Identificación de los modos normales de vibración que presenta TcTIM y su implicación en la exposición de sitios de unión.....	44
3.4.2. Determinación de los residuos estabilizadores de la región interfacial.....	51
3.5. Propuesta de un mecanismo molecular de inhibición de TcTIM por C8.....	54
4. Estudios de simulación del reconocimiento molecular proteína-ligando (docking) y de cribado virtual, en el contexto del diseño de fármacos asistido por computadora. Identificación de moléculas con capacidad para unirse a TcTIM.....	59
4.1. Docking.....	61
4.1.1. Estudios de simulación del reconocimiento molecular C8 sobre la estructura de TcTIM.....	62
4.1.1.1. Validación del método.....	62
4.1.1.1.1. Complejo de estreptavidina-biotina.....	62
4.1.1.1.2. Complejo de triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma brucei</i> con 3-fosfoglicerato.....	63
4.1.1.1.3. Complejo de triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> con 3-fosfoglicerato.....	63
4.1.1.2. Localización de los sitios de unión presentes en la estructura de TcTIM.....	64
4.1.1.3. Identificación de las interacciones establecidas entre el ligando y la proteína en distintos sitios de unión.....	68
4.1.1.4. Mecanismo del reconocimiento molecular entre TcTIM y C8. Descripción del proceso de inhibición.....	69
4.1.2. Obtención, mediante estudios <i>in silico</i> , de derivados de C8 con potencial inhibitorio.....	71
4.1.2.1. Búsqueda de compuestos similares a C8 (molécula líder) y localización de sitios de unión en la estructura de TcTIM.....	73
4.1.2.1.1. Cavidad que da acceso a la zona de hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación (HH).....	75
4.1.2.1.2. Cavidad que da acceso a la región interfacial (HRI).....	77
4.1.2.2. Obtención de un farmacóforo a partir de complejos proteína/ligando.....	78

4.1.2.3. Generación de las quimiotecas empleadas en los ejercicios de cribado virtual.....	81
5. Métodos computacionales empleados en el descubrimiento de fármacos potenciales. Cribado virtual de quimiotecas (Virtual Screening, VS).....	82
5.1. Cribado virtual de quimiotecas empleando el conjunto de programas de FRED.....	83
5.1.1. Validación del método y definición de parámetros. Cribado virtual de nueve complejos proteicos.	84
5.1.2. Cribado virtual sobre triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTIM) de las tres quimiotecas de interés: Maybridge, eMolecules I y eMolecules II.....	87
5.1.2.1. Cribado virtual de las quimiotecas Maybridge, eMolecules I y eMoleculesII, en el sitio localizado en la zona de hélices.....	88
5.1.2.2. Cribado virtual de las quimiotecas Maybridge, eMolecules I y eMoleculesII, en la región interfacial.....	91
5.1.2.3. Modificaciones químicas propuestas a la molécula líder para incrementar su afinidad de unión en los sitios seleccionados.....	94
5.1.2.4. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en los sitios localizados en la región interfacial y la zona de hélices.....	95
5.1.2.4.1. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en la región interfacial.....	96
5.1.2.4.2. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en la zona de hélices constituidas por residuos con alta tendencia de agregación.....	99
Conclusiones y perspectivas.....	103
Bibliografía.....	106

ANEXOS

Búsqueda de las condiciones experimentales

AI. Estabilidad de triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> en distintas soluciones amortiguadoras.....	I
AI.1. Fluorescencia intrínseca.....	Ii
AI.2. Fluorescencia extrínseca.....	iv
AI.3. Dicroísmo circular.....	iv
AI.4. Actividad enzimática.....	vi
AI.5. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM, TEA, Tris-HCl y EDTA.....	x

AI.5.1. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y EDTA.....	xi
AI.5.2. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y TEA.....	xii
AI.5.3. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y Tris-HCl.....	xiii
AII. Estabilidad térmica de triosafosfato isomerasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	xvi
AII.1. Fluorescencia intrínseca.....	xvi
AII.2. Fluorescencia extrínseca.....	xvii
AII.3. Dicroísmo circular.....	xviii
AII.4. Actividad enzimática.....	xix
AIII. Caracterización del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (C8).....	xxi
AIII.1. Absorción de C8 en el ultravioleta y visible.....	xxi
AIII.2. Fluorescencia intrínseca.....	xxi
AIII.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	xxiv
AIII.4. Definición de condiciones experimentales.....	xxv
AIV. Mejores soluciones identificadas mediante el cribado virtual de las tres quimiotecas virtuales (DISCO ANEXO)	

Glosario

Resumen del proyecto de investigación.

La infección humana causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es de alta prevalencia en América Latina, desemboca en una enfermedad crónica e inclusive en la muerte. La infección puede ser congénita o adquirida y afecta en grado variable diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo. Esta enfermedad es conocida con el nombre de tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. El agente etiológico es un protozoo flagelado que tiene un ciclo de vida complejo, involucrando como insecto vector a la vinchuca o chinche besucona (*Rodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma picturata*, en México, y *Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* en Centro y Sudamérica). El parásito presenta una alta variabilidad antigénica, por lo cual elude el sistema inmunitario del huésped. A pesar de grandes esfuerzos de investigación y considerables progresos, todavía no se ha logrado una cura efectiva para esta enfermedad y es poco lo que se conoce acerca del mecanismo de acción de la mayoría de los medicamentos comúnmente utilizados. Tampoco ha sido posible desarrollar vacunas apropiadas para controlar dicho padecimiento.

Muchos han sido los estudios sobre el metabolismo y la composición química del parásito, principalmente de proteínas específicas que facilitan su adhesión a la matriz extracelular para introducirse en las células del huésped, en donde se reproducen y se multiplican. Se sabe que *T. cruzi* metaboliza la glucosa y otros azúcares, realizando una fermentación aeróbica con excreción de ácidos orgánicos, según han mostrado contribuciones de Cannata y colaboradores (Cannata, J. B. y col., 1977). La lucha contra la enfermedad implica comprender el metabolismo del parásito para inhibir diferencialmente su desarrollo. Un camino posible es el diseño de moléculas que interfieran con la actividad de enzimas claves para éste sin dañar al huésped.

En el presente trabajo se ha estudiado la pérdida de actividad de la triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) utilizando un inhibidor selectivo y no competitivo reportado recientemente. Se ha caracterizado el efecto del inhibidor sobre la conformación y la actividad de dicha enzima mediante el empleo de métodos espectroscópicos; de este modo se pretende determinar los cambios estructurales y lograr la descripción del mecanismo de unión del ligando a la proteína y su desnaturalización. Por otro lado, mediante métodos computacionales, se ha realizado la identificación de los posibles sitios de unión a ligandos pequeños presentes en TcTIM, además de identificar los modos normales de vibración que presenta la enzima y que pueden dar lugar a la exposición de sitios de unión que no son detectados por métodos que consideran a la proteína como una estructura rígida. Estos estudios están encaminados a definir cuántas etapas son necesarias para concretar la inhibición, así como el tipo de proceso que se lleva a cabo en cada una de ellas.

La finalidad de estudiar los mecanismos de inhibición de ligandos no covalentes, previamente probados y que han mostrado selectividad por TcTIM, es contribuir al conocimiento que permita establecer los parámetros de diseño o modificación de moléculas -para aumentar la afinidad y selectividad de compuestos líderes- en la búsqueda de medicamentos para combatir la enfermedad de Chagas.

Introducción

i. Generalidades en enzimología.

Las enzimas son catalizadores de naturaleza proteica que regulan la velocidad a la cual se realizan los procesos fisiológicos. En consecuencia, las deficiencias en la función enzimática causarán alteraciones metabólicas que pueden interferir con el desarrollo de tales procesos. Estructuralmente, las enzimas son polímeros lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, donde sólo algunos ángulos de rotación en torno a dichos enlaces son energéticamente favorables. Al plegarse, aparecen regiones con ordenamiento periódico (hélices α y hojas β) unidas por giros de la cadena polipeptídica o por bucles de longitud variable, cuyos grupos químicos interactúan dando lugar a conformaciones globulares compactas (Lesk, A. M., 2001). En muchas enzimas, la estructura final se forma con una sola cadena de aminoácidos, a este tipo de enzimas se les denomina monoméricas; sin embargo, la mayoría de las enzimas existen como oligómeros.

Una enzima con estructura cuaternaria posee varias subunidades o cadenas polipeptídicas independientes, cada una con estructura terciaria que incluye a uno o más dominios. Dentro de los dominios podemos reconocer diversos motivos o patrones de estructura súper secundaria, los que a su vez están formados por dos o más segmentos de estructura secundaria ordenados de una manera específica. Además, podemos también identificar elementos de estructura secundaria aislados que completan la organización de cada dominio (Vogel, C. y col., 2004). En las proteínas multiméricas, cada subunidad se identifica por la presencia de cadenas de aminoácidos unidos secuencialmente mediante enlaces peptídicos, pero que son independientes de las subunidades restantes, ya que no hay entre ellas continuidad en la secuencia de aminoácidos, es decir, la interacción entre subunidades se mantiene a través de otro tipo de interacciones químicas entre las que predominan las fuerzas no covalentes.

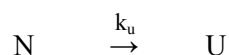
La estructura nativa -conformación de una proteína en su forma activa, considerada la estructura correspondiente al mínimo de energía global en la superficie de energía o la estructura correspondiente al mínimo de energía libre de las estructuras cinéticamente accesibles (Jaenicke, R. y col., 2000)- está determinada en gran medida por la interacción de las cadenas laterales de los aminoácidos que la constituyen, aunque una contribución muy importante es el balance de una enorme cantidad de interacciones de los residuos de aminoácidos con la solución acuosa que rodea a la proteína (Anfinsen, C. B., 1973). Este balance dicta la tendencia de los residuos individuales a orientarse hacia el interior o exterior de la superficie de la proteína globular. Las cadenas hidrofóbicas tienden a empacarse una con otra, y muchos de sus aceptores y donadores de puentes de hidrógeno se disponen en el espacio favoreciendo la formación de este tipo de enlaces. De manera general, podemos decir que la estructura compacta de proteínas globulares se deriva de la optimización de todos los tipos de interacciones de los átomos de la molécula, incluyendo el efecto de las interacciones con el solvente (Némethy, G. y col., 1981). La energía de cada interacción es relativamente pequeña, pero dado su gran número, el total puede sumar cientos de kilocalorías por mol de proteína. La influencia del solvente sobre la conformación y el efecto neto de las interacciones sobre la molécula entera de proteína, puede ser estudiada por medio de análisis estructural y por medio de investigaciones de cambios conformacionales en respuesta a cambios en el medio; los métodos generalmente empleados para tales estudios son mediciones termodinámicas, análisis teóricos y simulaciones computacionales.

Se sabe que la actividad de una enzima depende en parte de la disposición o arreglo espacial adecuado de los grupos funcionales (aminoácidos de la apoenzima y grupos prostéticos, cuando existen) y de las moléculas mismas de los sustratos que se les unirán y permitirán que se lleve a cabo la reacción química. Los aminoácidos que componen a las enzimas pueden llegar a tener una cierta actividad biológica, aunque de ninguna manera comparable en su magnitud cuando se les considera en forma aislada a las que muestran las biomoléculas estructuralmente activas. La propiedad catalítica de las enzimas parece depender tanto de la facilidad con la que ayudan a que se pongan en contacto las sustancias reaccionantes para dar el producto o los productos de la reacción, como de la estabilización del estado de transición de la reacción que catalizan. Las enzimas pueden sufrir un cambio en su estructura desde el momento en que entran en contacto con los reaccionantes, y es posible que la interacción con ellos modifique su arreglo tridimensional: la enzima los recibe en un orden determinado y cada uno de ellos al unirse a la enzima puede modificar su estructura. El proceso catalítico es una secuencia de reacciones en la que cada una se acompaña de movimientos y desplazamientos de distintas partes de la proteína, pudiendo considerarse como una sucesión de microestados que difieren en distintos grados de fluctuaciones locales (Zavodszky, P. y col., 1998). Se cree que el cambio en la disposición tridimensional puede hacerse a distancia y que en muchas ocasiones la unión del sustrato a una parte de la enzima modifica otras zonas de ella y aún su estructura completa, debido a movimientos que acercan o alejan diversos grupos colocados a lo largo del polipéptido que forma la enzima (Freire, E., 2000).

La estructura nativa es marginalmente estable, siendo el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) para el desplegamiento de las proteínas del orden de varias decenas de kJ mol^{-1} . El desplegamiento de las proteínas puede ser inducido por una gran cantidad de agentes químicos y físicos, y generalmente los cambios conformacionales causados por los desnaturalizantes pueden observarse mediante alteraciones en algunas propiedades de la proteína. En el mecanismo de acción de los desnaturalizantes se cree que se favorece la solvatación, tanto de las cadenas laterales como del esqueleto polipeptídico (Dill, K. A., 1991), aunque el mecanismo no se conoce con detalle.

La desnaturalización es el proceso mediante el cual las proteínas pierden su conformación nativa. En este proceso se pierde la función biológica, ya sea por alteraciones locales (sin que necesariamente se pierdan características estructurales globales) o bien por la extensión de la cadena polipeptídica (desplegamiento), en la que se pierde una parte importante de contactos terciarios y de estructura secundaria (Benítez-Cardoza, C. y col., 2001).

Muchas proteínas, especialmente las pequeñas, se desnaturalizan reversiblemente. Cuando únicamente se observan dos estados macroscópicos, el desplegado (U) y el nativo (N), y no se aprecian intermediarios estables se dice que el plegamiento puede describirse a través de un modelo reversible de dos estados. El modelo para describir la desnaturalización de proteínas diméricas, es el modelo reversible de dos estados con disociación; en cuyo caso la separación de los monómeros ocurre simultáneamente al desplegamiento de las cadenas polipeptídicas (Mainfroid, V. y col., 1996). Por otro lado, muchas proteínas se desnaturalizan irreversiblemente; formando agregados y precipitando en muchas ocasiones. Este tipo de desplegamiento puede describirse mediante un modelo irreversible de dos estados:



Donde k_u es la constante de velocidad del proceso. La aparición de estructuras intermediarias estables puede modificar este esquema de desplegamiento. Uno de los casos más simple es el propuesto por Lumry-Eyring en el que se produce un intermediario (I) capaz de replegarse.



Los métodos más comunes de desnaturalización son el calentamiento, la adición de algún agente químico o solventes orgánicos, el cambio en el pH o de fuerza iónica o la aplicación de presiones elevadas (Fersht, A., 1988). La desnaturalización invariablemente involucra la pérdida de estructura y por lo tanto la pérdida de actividad.

Además de los agentes desnaturalizantes, la actividad de una enzima puede ser modificada e incluso eliminada por diversas sustancias que se unen a ella, los inhibidores. Cualquier sustancia que reduzca la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente puede ser considerada como un inhibidor. Éstos bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (inhibidor competitivo) o bien alterar la conformación espacial de la enzima, impidiendo su unión al sustrato (inhibidor no competitivo). Cuando al removerse el inhibidor se recupera la actividad de la enzima se habla de una inhibición reversible, cuando esto no sucede la inhibición es irreversible. Por otro lado, se sabe que la inhibición de la actividad enzimática es uno de los mecanismos de regulación más importantes de las células vivas y que muchos inhibidores enzimáticos son utilizados como fármacos, drogas, venenos y toxinas. Diversas investigaciones sobre los fármacos empleados en las últimas décadas han revelado que la acción terapéutica de éstos incide principalmente en las proteínas, ya sea como receptores moleculares o como enzimas. Bajo este contexto, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos activos en contra de varios organismos patógenos ha estado dirigida al desarrollo de inhibidores que inactiven enzimas clave para el parásito. Estas investigaciones se han enfocado tanto en las enzimas presentes únicamente en el parásito (Fairlamb, A. H. y col., 1992), como en enzimas del parásito cuando existe un homólogo en el hospedero (Verlinde, C. L. y col., 1994).

Las enzimas de la vía de la glucólisis son blancos atractivos, puesto que juegan un papel esencial en la producción de energía de muchos organismos (Garza-Ramos, G. y col., 1996; Wilson, M. y col., 1994). La secuencia de reacciones que constituye la glucólisis puede dividirse en tres partes: en la primera parte la glucosa es convertida en dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (G3P), en la segunda el grupo aldehído de cada molécula de G3P se oxida formando ácido carboxílico y la energía liberada en cada una de estas reacciones se acopla a la de la fosforilación del adenosindifosfato (ADP) para formar adenosintrifosfato (ATP); en la última parte los dos grupos fosfato que habían sido usados para formar las dos moléculas de G3P son transferidos al ADP para formar ATP. Como resultado de la glucólisis se obtiene una ganancia neta de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Voet, D., 1992) (fig. 1).

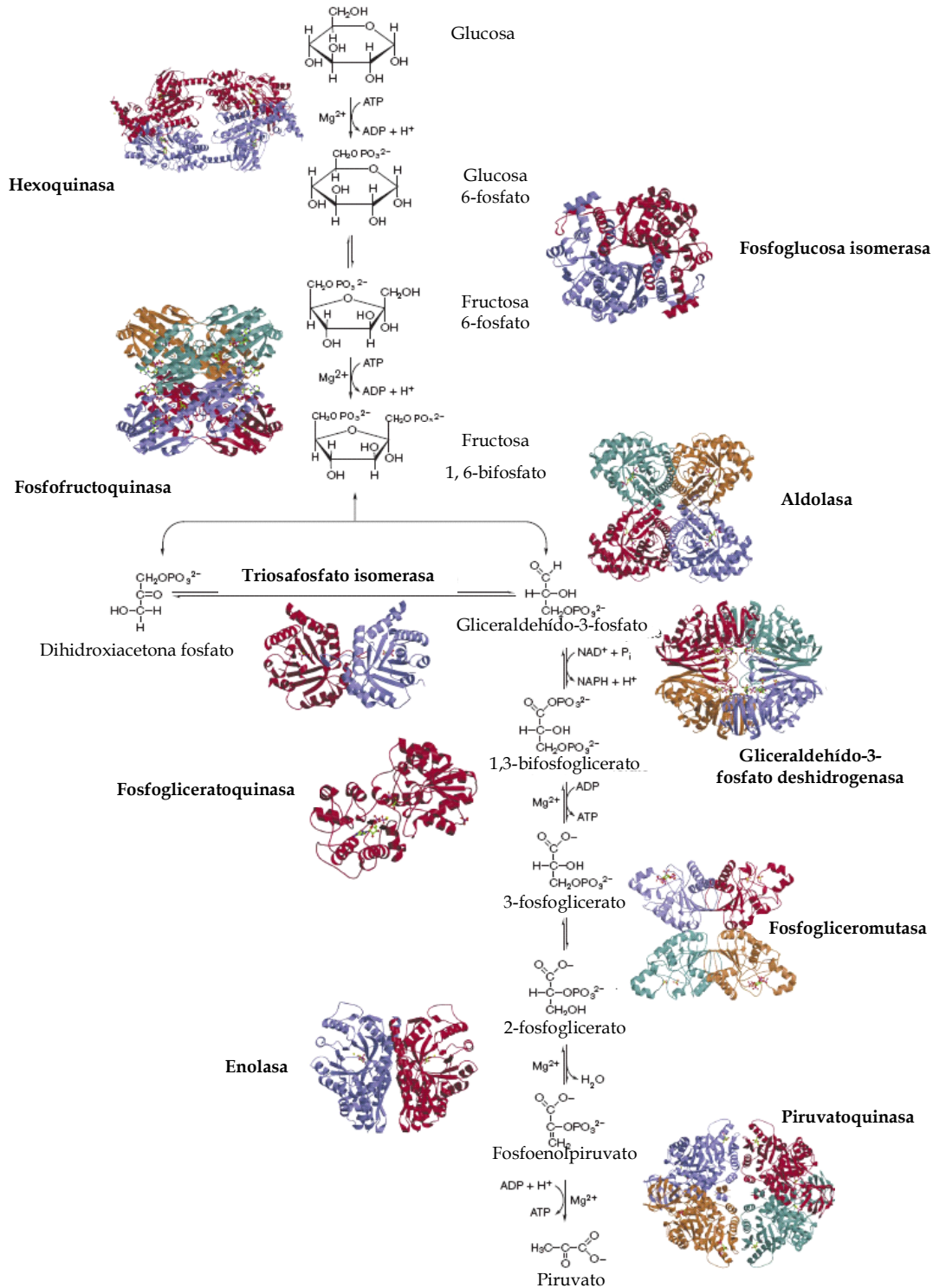


Figura 1. Ruta glucolítica, se incluyen las estructuras tridimensionales de las enzimas involucradas con sus respectivos cofactores y sustratos (ID PDB hexoquinasa: 1BG3; fosfoglucoasa isomerasa: 2PGI; fosfofructoquinasa: 4PFK; aldolasa: 4ALD; triosafosfato isomerasa: 3YPI; gliceráldehido-3-fosfato deshidrogenasa: 3GPD; fosfogliceratoquinasa: 13PK; fosfogliceratomutasa: 1BQ3; enolasa: 7ENL; piruvatoquinasa: 1A3W). Las subunidades de las enzimas se muestran en distintos colores. Modificado de Erlandsen y colaboradores, 2000.

Particularmente, los conocimientos estructurales y funcionales acerca de la triosafosfato isomerasa (TIM) han sido utilizados en el diseño de fármacos contra protozoarios patógenos, que se sabe dependen de la glucólisis para obtener la energía necesaria para crecer y proliferar (Ostoa-Saloma, P. y col., 1997; Wierenga, R. K. y col., 1992).

ii. *Triosafosfato isomerasa (TIM o TPI).*

La TIM (EC: 5.3.1.1) es una enzima que cataliza la interconversión reversible entre el G3P y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en la ruta glucolítica (Meyerhof, O. y col., 1944) (fig. 2) y no requiere de ningún cofactor para llevar a cabo la catálisis. Esta reacción es la quinta de la glucólisis y la última en la primera etapa de este proceso (fig. 1). La velocidad de la isomerización es controlada únicamente por la difusión de los sustratos (Knowles, J. R., 1991), puesto que, por una parte, las variaciones en la viscosidad del solvente influyen sobre el valor que adquiere la velocidad de transformación del sustrato en producto, de manera inversamente proporcional (Blacklow, S. C. y col., 1988), y por otra, la relación k_{cat}/K_m para el G3P como sustrato es del orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, siendo un valor comparable al calculado para reacciones bimoleculares en solución controladas por difusión ($10^8\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Knowles, J. R. y col., 1977). Dado que únicamente el G3P puede continuar la ruta de la oxidación de la glucosa hasta el piruvato, la TIM asegura la producción neta de ATP en la glucólisis.

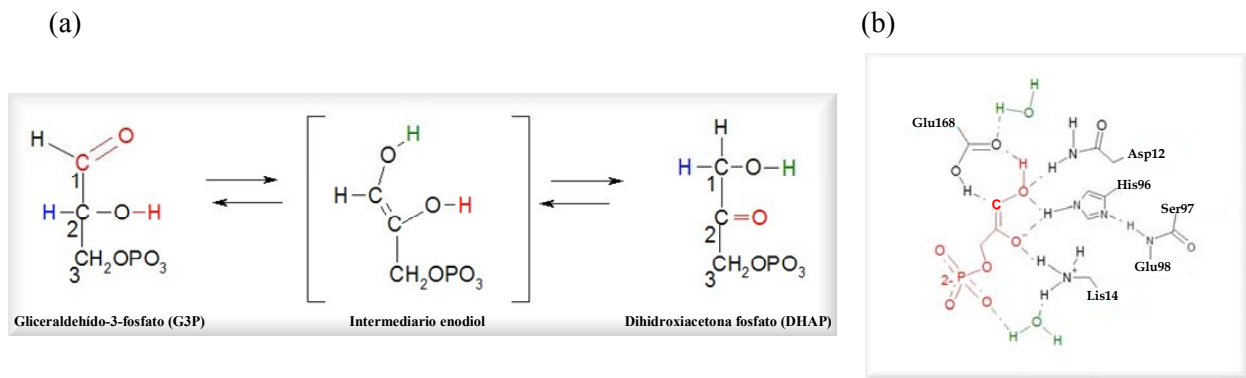


Figura 2. (a) Reacción catalizada por la TIM (interconversión entre DHAP y G3P). (b) El Glu168 ayuda a extraer el protón del C₂ del G3P. Al mismo tiempo, la His96 actúa como grupo ácido donador de protones (HA) para trasladar los protones entre el grupo carboxilo del sustrato y el -OH del C₁. El intermediario enediol formado por la transferencia de C₂ al Glu168 transfiere el protón a la His 96. Se cree que la función biológica de TIM consiste en disminuir las barreras energéticas que limitan la velocidad de protonación y desprotonación del G3P y la DHAP y/o estabilizar el intermediario cis-enediol. El perfil de energía libre de la isomerización muestra que el estado de transición de energía más elevada, es la unión del G3P al sitio catalítico de la enzima (Knowles, J. R. y col., 1977).

La TIM ha sido identificada en todas las especies analizadas hasta la fecha, conociéndose la secuencia de aminoácidos de más de 100 especies y la estructura tridimensional de 17 de ellas (www.pdb.org); esta enzima además de participar en la glucólisis, interviene en la gluconeogénesis y en la síntesis de triglicéridos. TIM es un homodímero de 54.2 kDa (Putman, S. J. y col., 1972), cada monómero está constituido por 251 residuos de aminoácido que adoptan un plegamiento de barril (α/β)₈, las ocho hebras forman una hoja β paralela cilíndrica –constituyendo la parte interna del barril- rodeada a su vez de ocho hélices α (Lolis, E. y col., 1990).

El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad formada por las asas contiguas al extremo N-terminal de las hebras β (Banner, D. W. y col., 1975).

Utilizando la numeración de la secuencia de TcTIM, los residuos que participan en la catálisis son la lisina 14 (Lys14), la histidina 96 (His96) y el ácido glutámico 168 (Glu168), siendo este último el nucleófilo catalítico que atrae al protón para iniciar la isomerización, además de ser parte del asa 6, la cual se cierra sobre el sitio activo con el objeto de mantener un núcleo hidrofóbico para el sustrato durante la isomerización; se evita así la formación del subproducto tóxico metilgloxal, que se genera cuando la reacción se lleva a cabo en solución. Se ha propuesto que la catálisis de TIM involucra un mecanismo ácido-base, en el que el carboxilato del Glu168 y el imidazol de la His96 realizan las protonaciones y desprotonaciones necesarias para la formación del endiol (Knowles, J. R., 1991). La Lys14 interactúa con un macrodipolo formado por dos hélices α , una de ellas modifica el pH de la His96, mientras que el macrodipolo de la otra permite la unión del fosfato del sustrato. La Lys14 es adyacente a la cisteína 15 (Cys15), residuo que es rodeado por el asa 3 de la otra subunidad y que se piensa es crucial en la constitución de la región interfacial; el asa 3 es conocida como asa interdigitante por ensamblarse entre las asas 1 y 4 de la otra subunidad, y se considera que juega un papel relevante en la estabilización de la estructura (Wierenga, R. K. y col., 1991) (fig. 3).

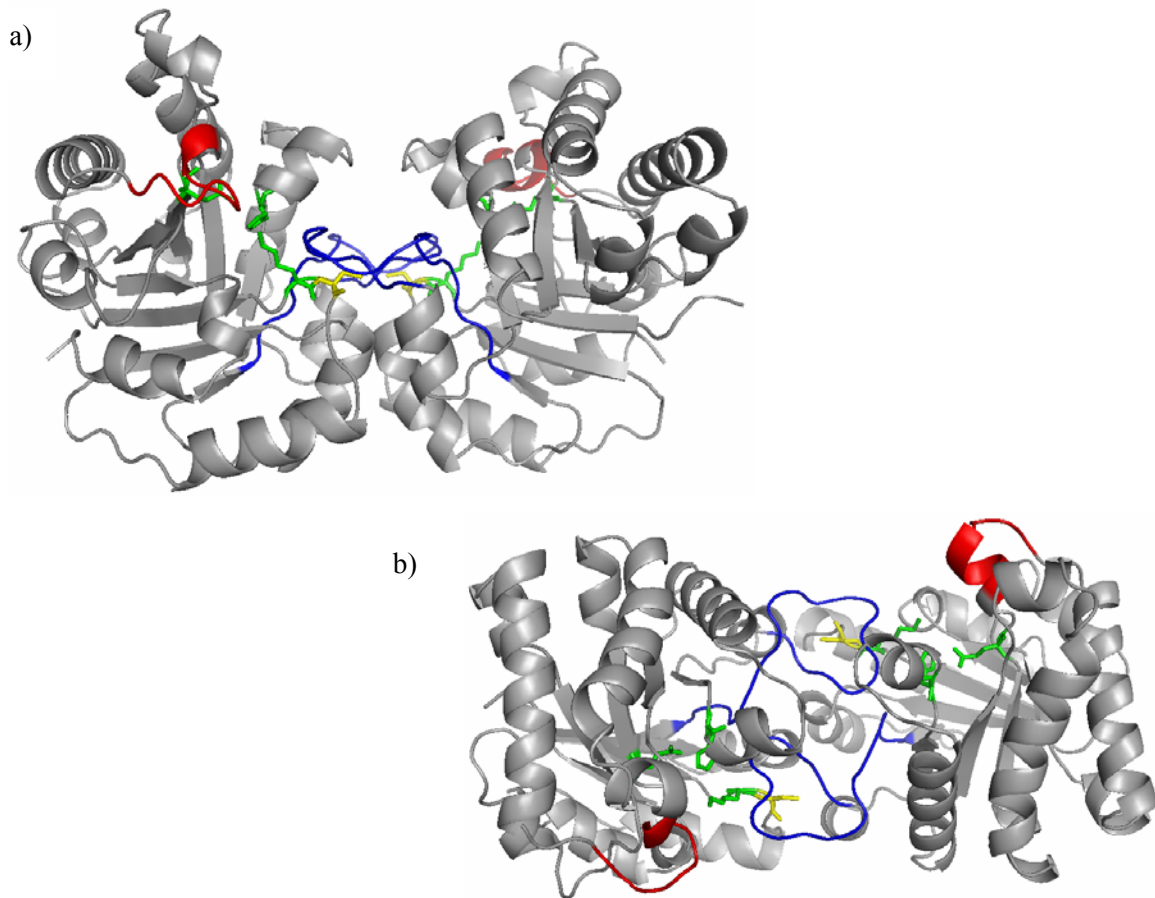


Figura 3. Estructuras cristalográficas del dímero de TcTIM. (a) Se muestran en verde los residuos catalíticos (Lys14, His96 y Glu168), en azul los residuos que constituyen el loop 3 o asa interdigitante (Ile63, Ala64, Ala65, Gln66, Asp67, Ala68, Ile69, Thr70, Arg71, Ser72, Gly73, Ala74, Phe75, Thr76, Gly77, Glu78, Val79, Ser80), en rojo los residuos que se encuentran formando el loop 6 o asa catalítica (Trp171, Ala172, Ile173, Gly174, Thr175, Gly176, Lys177, Val178) y en amarillo la cisteína 15 (Cys15), residuo que es rodeado por el loop 3 y que se sabe contribuye a la estabilidad de la forma dimérica de TcTIM. (b) Vista superior de TcTIM, se observa como la Cys15 es rodeada por el loop 3 de la otra subunidad, éste encaja en una cavidad que se encuentra cerca del sitio activo (información obtenida de Maldonado, E. y col., 1998).

Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes y, aunque ambos monómeros tienen un sitio activo completo cerca de la región interfacial, no hay evidencia de alosterismo. Debido a que una gran parte de la enzima se encuentra formando la región interfacial, se piensa que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad. Se tiene conocimiento de que la región interfacial de TIM se encuentra formada en general por las asas 1, 2, 3 y 4 y que ambas subunidades ocultan un área de alrededor de 1500 \AA^2 , por lo que se cree que estos residuos contribuyen significativamente en la estabilidad de la proteína.

A partir de estudios en los que un dímero formado por un monómero intacto y otro monómero en el cual el sitio catalítico ha sido bloqueado por un inhibidor que se une covalentemente, se ha observado que TIM muestra una disminución en su actividad catalítica con respecto a la del dímero intacto, lo que evidencia la independencia de los monómeros en la catálisis (Schnackerz, K. D. y col., 1991). Por otro lado, el dímero de TIM formado por monómeros que han sido modificados por ingeniería genética poseen constantes de asociación bajas, exhibiendo actividades catalíticas que son mucho menores que las mostradas por dímeros nativos (Schliebs, W. y col., 1997). Estas observaciones sugieren por una parte que la asociación de los monómeros induce la formación de monómeros con una alta actividad catalítica y, por otra, que los contactos intersubunidad pueden estar participando en la catálisis. El conocer si durante la catálisis algunos de los contactos intersubunidad exhiben cambios conformacionales, o si uno o más de los residuos de la región interfacial muestran propiedades diferentes de las del estado “latente” (aquel que no se encuentra catalizando la conversión del sustrato en producto), proporcionaría información acerca del papel que tienen dichos residuos en este proceso (Pérez-Montfort, R. y col., 1999). Algunos autores han realizado estudios con mutantes para evaluar la contribución de las porciones interfaciales y no interfaciales del dímero en la cinética de reactivación a partir de enzimas desnaturalizadas, además de explorar si un monómero afecta las características del otro. Observaron que la cinética de reactivación, a diferentes concentraciones de proteína, involucra tres reacciones: el plegamiento de los monómeros, la asociación de los monómeros plegados y la transición del dímero inactivo al dímero activo (Zomosa-Signoret, V. y col., 2003). Por otro lado, diversos estudios con respecto a la desnaturalización de TcTIM, relacionados con la transición del homodímero nativo a los monómeros desnaturalizados, han mostrado que ésta sigue un proceso de dos estados y procesos más complejos, incluyendo dos intermediarios y agregación inespecífica. En el caso de estudios en los que se ha realizado la incubación de TcTIM en hidrocloreuro de guanidina (Gdn-HCl) se ha determinado que el proceso de desnaturalización es descrito por un modelo de cuatro estados (Chávez Cárdenas, M. E. y col., 2005).

En general, puede observarse que existe una gran cantidad de información concerniente a TcTIM, obtenida mediante la utilización de variadas técnicas experimentales, y que ésta puede ser empleada en el planteamiento de soluciones a problemas que involucren directamente a la trifosfato isomerasa.

iii. Interacción proteína-ligando. Redefinición del estado nativo y sus implicaciones en el reconocimiento selectivo de drogas.

Una gran variedad de procesos fisiológicos son el reflejo de la interacción entre ligandos y macromoléculas, especialmente proteínas. Los tipos más comunes de interacción son entre las enzimas y su sustrato, o con algunas otras moléculas que tienen influencia sobre su actividad. Otros ejemplos son la interacción entre hormonas y receptores de hormonas, entre moléculas pequeñas y proteínas implicadas en el transporte activo, entre iones y proteínas o ácidos nucleicos.

A esta lista de fenómenos de unión de significancia biológica, deben añadirse los procesos de protección inmunológica mediadas por la interacción antígeno/anticuerpo, el control de la expresión y represión de genes, la generación de las respuestas neuronales y finalmente, lo que atañe a este trabajo de investigación, la interacción entre drogas y receptores específicos localizados en diversas macromoléculas y que generan un efecto farmacológico benéfico para el organismo (Winzor, D. J. y col., 1995). Es claro que, virtualmente todos los fenómenos biológicos dependen de una o más interacciones con ligandos, por lo que no es de sorprender que exista una gran cantidad de investigaciones dirigidas a explorar las bases bioquímicas y biofísicas de la interacción proteína-ligando (Cantor, C. R. y col., 1980).

La interacción de un ligando con una proteína ocurre en un sitio local (el sitio de unión), y generalmente involucra pocos residuos; sin embargo, los efectos de esta interacción pueden ser propagados a sitios remotos del sitio de anclaje. La cadena de eventos iniciados por la unión del ligando provee las bases de los fenómenos biológicos fundamentales, tales como el alosterismo, la transducción de señales y la modificación de la estabilidad mediada por la estructura (Freire, E., 1999). La principal característica de tales mecanismos radica en la presencia de múltiples sitios de unión a ligandos y más aun, a la comunicación entre dichos sitios, los cuales pueden estar apartados por muchos ángstroms (Pan, H. y col., 2000). Lo anterior permite pensar en caminos estructurales -donde se involucran interacciones cooperativas- que originan la perturbación de zonas constituidas por residuos de baja estabilidad estructural, algunos autores han señalado que una condición importante para que se observe la propagación de los efectos a zonas distantes, es precisamente la presencia de una fracción significativa de este tipo de residuos (Horn, J. R. y col., 2003).

Mediciones de resonancia magnética nuclear de intercambio de hidrógeno, realizadas bajo condiciones nativas, han revelado heterogeneidad en la magnitud de los factores de protección observados de diferentes residuos en una misma proteína; es decir, todas las proteínas que han sido estudiadas con esta técnica, no exhiben una conducta de dos estados en el equilibrio conformacional (Cremades, N. y col., 2006). Estos resultados son inconsistentes con la idea de que bajo condiciones nativas se tiene un equilibrio, predominantemente, entre el estado nativo (N) y el estado desnaturalizado (U). Si un evento sencillo (por ejemplo, un desplegamiento global) fuera el responsable de la exposición de todos los grupos amida ocultos al solvente, sería de esperarse que todos tuvieran el mismo factor de protección. Sin embargo, esta situación no se observa experimentalmente (Jeng, M. F. y col., 1991, Kim, K. S. y col., 1993, Loh, S. N. y col., 1993, Bai, Y. y col., 1995, Schulman, B. A. y col., 1995, Swint-Kruse, L. y col., 1996, Sadqui, M. y col., 1999). El análisis de la heterogeneidad observada indica que una fracción grande de residuos de aminoácidos en una proteína se expone al solvente como resultado de reacciones locales de desplegamiento, y no de reacciones globales. En realidad, bajo condiciones nativas, el equilibrio predominante no es entre el estado nativo y el desplegado, sino entre un número elevado de estados generados por la existencia de reacciones locales de desplegamiento (formas parcialmente desplegadas (PUFs), (Cremades, N. y col., 2006)) y el estado nativo. Estas reacciones de desplegamiento local involucran únicamente algunos residuos, ocurriendo una independientemente de la otra, definiendo en gran medida el conjunto del estado nativo.

Las observaciones anteriores pueden llamar la atención puesto que desde el punto de vista tradicional, las proteínas se comportan como entidades cooperativas de “todo o nada”. ¿Cómo puede ser posible que pequeñas regiones de la macromolécula sean capaces de sufrir procesos de plegamiento/desplegamiento de manera independiente? Al mismo tiempo, estas investigaciones han arrojado luz sobre nuevas cuestiones fundamentales.

Si el estado nativo es una estructura en la que múltiples regiones son capaces de sufrir eventos pequeños e independientes de desplegamiento locales, entonces la cooperatividad es local y no global. Si las interacciones cooperativas son regionales, ¿cómo pueden los efectos de perturbaciones locales propagarse de una región a otra?, ¿cómo puede la unión de un ligando inducir cambios en regiones distantes del sitio de unión? Si las interacciones cooperativas no se extienden uniformemente a través de la molécula entera, entonces algunos residuos quizás juegan un papel más importante que otros en el desarrollo de la respuesta cooperativa (Freire, E., 1999). Desde este punto de vista, la comunicación molecular debe de ocurrir a través de rutas cooperativas que involucran únicamente una fracción de los residuos que constituyen a la macromolécula. La identificación y caracterización de estas rutas pueden tener consecuencias importantes en el conocimiento de la función en proteínas.

Particularmente, el estudio de la unión de una molécula, considerada un fármaco potencial, a su diana terapéutica, puede proporcionar información importante sobre las modificaciones que son necesarias de llevar a cabo en dicho ligando, con la finalidad de incrementar su potencia farmacológica. El conocimiento de la manera en que éste se une, los efectos causados en el sitio de unión y la desestabilización de la estructura global -inducida por la propagación de dichos efectos-, además de ayudar en la comprensión de los fenómenos de interacción proteína-ligando, proporcionaría información importante sobre la manera en que son modulados los procesos fisiológicos afectados, y sobre todo, aportaría información que podría ser utilizada en el diseño, basado en estructura, de nuevas drogas.

Se ha propuesto que el efecto desestabilizador de una molécula, puede potenciarse si ésta se ha unido a un sitio adyacente a una región constituida por residuos que sufren reacciones locales de desplegamiento (Schön, A. y col., 2006).

En este trabajo se realizó un abordaje experimental y computacional dirigido, básicamente, al análisis de la interacción proteína-ligando. El objetivo principal fue determinar el mecanismo molecular de la inhibición selectiva y, mediante los resultados obtenidos, proponer variaciones químicas de la estructura de la molécula líder con el fin de incrementar su afinidad y selectividad por la enzima de estudio. Los conocimientos relacionados con los eventos que se producen durante el reconocimiento de un ligando y una macromolécula resultaron esenciales al momento de realizar el análisis y discusión de los resultados. Puesto que el mecanismo de inhibición necesariamente implica un sitio de unión y el reconocimiento de las moléculas involucradas en el proceso, nos auxiliamos de herramientas computacionales que incorporan en su análisis términos de energética del reconocimiento (por ejemplo de docking, descritas en el cuerpo del trabajo) para llevar a cabo una discusión a nivel molecular de los eventos desencadenados por la unión de la molécula.

A continuación se exponen los resultados obtenidos por diversos grupos de investigación relacionados con la inhibición selectiva de trifosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Esta información sirvió de base en el desarrollo de nuestra investigación y constantemente se le hará mención a lo largo del texto.

1. Antecedentes

1.1. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es uno de los principales problemas de salud pública en las regiones más pobres de nuestro país y en general de América Latina, debido principalmente al número de enfermos y la amplitud del área que abarca, a la gravedad de las alteraciones que ocasiona y a su carácter endémico. A pesar del extraordinario avance de las ciencias médicas, todavía no se ha encontrado el remedio ideal para curar la enfermedad. En realidad, el problema es grave ya que, una vez instaladas las lesiones en el organismo -lesiones que son destructivas- ya nunca más se puede alcanzar la restitución integral de la zona afectada. Lo único a lo que puede aspirarse es a aminorar los síntomas determinados por dicha lesión, la cual persistirá durante toda la vida de la persona enferma. Dado lo limitado de los tratamientos contra la enfermedad de Chagas, es evidente que además de las medidas de control sanitario, existe una necesidad urgente de nuevos fármacos.

Numerosos grupos de investigación, han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de compuestos que interfieran con la actividad de alguna enzima clave para el desarrollo y proliferación de los parásitos. En nuestro caso, debido a que se tiene conocimiento de que el parásito causante de la enfermedad de Chagas obtiene toda la energía que requiere para crecer y proliferar de la ruta de la glucólisis, se ha planteado el inhibir diferencialmente una enzima constitutiva de esta ruta metabólica para frenar el desarrollo de la enfermedad, la triosafosfato isomerasa.

1.2. Estudios iniciales de la inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa.

Los primeros estudios de inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa (TIM) se realizaron al emplear Cloramina-T, identificando los efectos de oxidación que producían sobre los residuos de Cys y Met de dos especies distintas, conejo y levadura. Se observó que existía una dependencia de la pérdida de actividad y estructura, con la presencia o ausencia de dichos residuos de aminoácidos, revelándose que era posible inactivar de manera selectiva enzimas provenientes de distintas especies (Zubillaga, R. A. y col., 1994). En esta dirección, estudios para diseñar drogas específicas por TIM's de distintas especies, basándose en las diferencias estructurales de enzimas homólogas, fueron realizados empleando mutantes de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM). Se logró determinar que es viable generar la pérdida de estructura y función si se atacan residuos no conservados, en particular la Cys14, empleando metil-metano-tiosulfato (MMTS) (Gómez-Puyou, A. y col., 1995). Por otro lado, Garza-Ramos y colaboradores (Garza-Ramos, G. y col., 1996), recurriendo a la posibilidad de atacar residuos no conservados, realizaron un estudio empleando el compuesto S-fenil-p-toluentiosulfonato (MePhSO₂-SPh) y metil-metanotiosulfonato (MeSO₂-SMe), para inhibir diferencialmente enzimas provenientes de conejo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, pollo y *Schizosaccharomyces pombe*, encontrando que la derivatización de Cys217 difiere marcadamente de la descrita para la Cys14, concluyendo que las diferencias pueden deberse a su posición en la estructura tridimensional de la enzima. Experimentos encaminados a estudiar la inhibición de TIM's de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y humano, con suramina, permitieron determinar que la inhibición de la reactivación de TIM es mas efectiva en el caso de *Trypanosoma brucei*, no así cuando se trabajaba con la enzima de otras fuentes (Gao, X. G. y col., 1998). Por otro lado, a partir de experimentos en los que se empleó subtilisina, se observó que existe una alta susceptibilidad a la proteólisis por parte de TcTIM y no por TbTIM, atribuible a la alta flexibilidad estructural de la primera (Reyes-Vivas, H. y col., 2002).

Finalmente, estudios de cristalografía de rayos-X, han revelado la existencia de un sitio potencial de unión para ligandos pequeños en la región interfacial de TcTIM. Durante la cristalización y posterior remojado de la enzima con hexano, se encontraron tres moléculas en la superficie. Dos de éstas se encontraron en la región interfacial, y aunque una de ellas se alojó a 4 Å de distancia de los residuos que forman dicha región, ésta no fue alterada por la presencia de la molécula de hexano. En el caso de las cadenas laterales de los residuos catalíticos, sólo el Glu168 del monómero A sufrió un desplazamiento significativo con respecto a la estructura nativa, lo que tendría implicaciones importantes en la actividad catalítica de la enzima (Gao, X. G. y col., 1999). El diseño de moléculas que inhibieran la actividad de TcTIM, basándose en la estructura del sitio de unión, podría proporcionar un acercamiento más certero a la hora de tratar de inhibir diferencialmente a la enzima del parásito y no del hospedero.

1.3. Inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

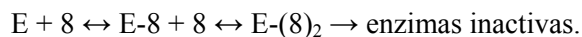
Los conocimientos estructurales y funcionales acerca de la TIM han sido empleados en el desarrollo de moléculas que inhiben la actividad de la enzima. Puesto que TIM está presente tanto en los seres humanos como en el parásito que causa la enfermedad de Chagas, es de suma importancia identificar las regiones o residuos de aminoácidos que presentan las diferencias entre especies. Por ejemplo, en la región interfacial de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) se ha observado que la posición 15 es ocupada por un residuo de cisteína (Cys), mientras que en el humano el residuo correspondiente a esta posición es una metionina (Met). El que distintos parásitos posean en este sitio un aminoácido diferente al de los humanos ha sido considerado para diseñar moléculas que puedan actuar de manera selectiva contra la TIM de organismos que causan enfermedades como las tripanosomiasis y la malaria (Gómez-Puyou, A. y col., 1995). Experimentalmente se ha observado que TIM es activa únicamente en su forma de dímero, por lo que se cree que la desestabilización de la estructura dimérica repercutiría dramáticamente en la funcionalidad de la enzima. En el caso de proteínas multiméricas, se han contemplado dos aproximaciones para inactivarlas. Por un lado, se ha trabajado en el diseño de inhibidores que compiten por el sitio activo; y por otro, en el diseño de moléculas que tienen como objetivo la región interfacial de las subunidades y que interfieren en el ensamble de éstas.

En muchas enzimas, el alto grado de conservación del sitio activo representa una dificultad en la selectividad del inhibidor, no así la región interfacial, ya que ésta puede mostrar variaciones estructurales entre el parásito y el huésped, proporcionando una distinción entre las enzimas involucradas. Se consideran dos estrategias distintas para interrumpir el contacto entre subunidades proteicas: primero, el diseño de péptidos sintéticos que mimetizan segmentos de la región interfacial, los cuales interfieren en la asociación de subunidades (Babe, L. M. y col., 1992; Maithal, K. y col., 2002); y segundo, la modificación química de los residuos de la región de reconocimiento entre subunidades, lo que evita la formación del estado oligomérico de la proteína (Gómez-Puyou, A. y col., 1995).

En el caso de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), en investigaciones recientes se han utilizado inhibidores que actúan uniéndose en un sitio de la enzima, desestabilizando el contacto entre subunidades y provocando de esta forma la pérdida de actividad catalítica y finalmente su desnaturalización (Téllez-Valencia, A. y col., 2002, Olivares-Illana, V. y col., 2006, Olivares-Illana, V. y col., 2007); esto probablemente debido a la propagación de los efectos de la unión del inhibidor a regiones distantes en la proteína, involucradas en la estabilidad global de la macromolécula.

En el caso de los estudios realizados por Téllez-Valencia y colaboradores en 2002, se probaron cerca de 150 compuestos, entre ellos derivados de benzotiazoles, de los cuales tres provocaron más del 90% de inactivación en TcTIM de manera selectiva. Observaron que el efecto de estos compuestos era dependiente de su concentración y que la inactivación era mayor conforme aumentaba el tiempo de incubación. En particular, el ácido 3-(2-benzotiazoliltilio)-1-propanolsulfónico (compuesto 8, C8) logró un 95% de inactivación. Se obtuvo la I_{50} de este compuesto sobre la TcTIM (concentración a la cual la actividad disminuye al 50% con respecto a la registrada en ausencia del inhibidor) siendo trece veces menor que la determinada para la TIM de humano (hTIM), apreciándose que su efecto depende de las diferencias estructurales de cada enzima y que por lo tanto es posible afectar selectivamente las enzimas de distintos organismos.

Por otra parte, a partir del análisis de las curvas de actividad contra concentración de inhibidor (C8), se determinó que la inactivación de TcTIM es el resultado de la unión secuencial de dos moléculas del compuesto, en el que la unión de la primera molécula es de tipo endotérmico y la unión de la segunda de tipo exotérmico, proponiéndose el siguiente mecanismo:



Mediante experimentos de rayos-X se identificó el primer sitio de unión para C8, localizado en la región interfacial del dímero. C8 se encuentra interactuando con las cadenas laterales de Arg71 (Ne de Arg71, localizado a 3.3 Å de distancia del C5 del C8) y de Phe75 (C ζ , de Phe75, localizado a 4.7 Å de distancia de los anillos del C8) del monómero A; y con el grupo OH de Tyr102 (localizado a 3.4 Å de distancia del S2 del C8) del monómero B (Téllez-Valencia, A. y col., 2004) (fig. 4).

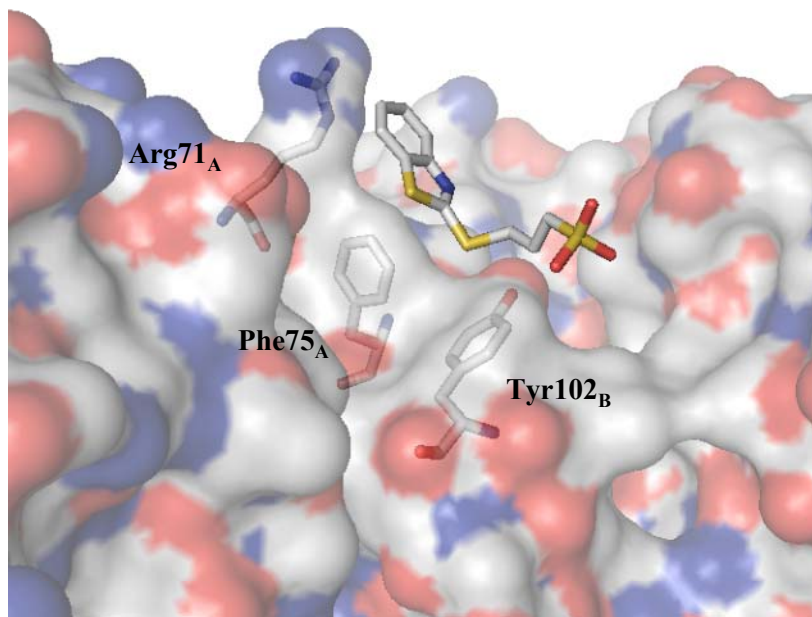


Fig. 4. Identificación del sitio de unión de la primera molécula de C8 que se une a TcTIM. Los residuos que se encuentran interactuando con la molécula de C8 en el sitio de unión localizado en la región interfacial son Arg71 y Phe75, del monómero A y Tyr102, del monómero B. Imagen generada empleando el visualizador Pymol v0.99. y coordenadas del archivo PDB 1SUX.

Datos adicionales revelaron que la unión de C8 induce cambios en la orientación del Glu168 del monómero A, el cual es un residuo catalítico. Si se considera que Glu168 se encuentra a 29 Å de distancia de C8, es posible apreciar que la unión de esta molécula induce cambios tanto en residuos cercanos, como en residuos que se encuentran distantes del sitio de unión. Debido a que en ese trabajo se demostró que algunos derivados de benzotiazoles inactivan selectivamente a TcTIM, se ha pensado que éstos pueden utilizarse como guía para el diseño de nuevas moléculas con mayor capacidad de inactivación, particularmente C8.

Recientemente, Olivares-Illana y colaboradores, identificaron una molécula (6,6'-bisbenzotiazol-2,2'-diamina) que en concentraciones micromolares causa la inactivación irreversible de TIM de tres tripanosomatidos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania mexicana*, sin afectar la actividad de la TIM proveniente de humano, *Saccharomyces cerevisiae*, pollo, *Plasmodium falciparum* y *Entamoeba histolytica* (Olivares-Illana, V. y col., 2006). Estos datos corroboran que es posible encontrar compuestos que inducen la inactivación selectiva de enzimas de distintas especies, aunque las concentraciones requeridas aún no se encuentran en el orden de magnitud especificado para considerarse una dosis farmacológica, es decir, concentraciones nanomolares. Este mismo grupo de investigación reportó en 2007 el hallazgo de una nueva molécula que inactiva selectivamente a TcTIM, la ditiodianilina (DTDA); ésta induce el 50 % de inhibición de la enzima a una concentración de 260 nM, sin afectar la actividad de la TIM de humano. Datos cristalográficos revelaron que en general, la estructura de TcTIM no es alterada por DTDA, sin embargo se observó la derivatización de la Cys118 del monómero B y la pérdida de dos puentes de hidrógeno establecidos entre la Cys15 del monómero B y la Gly73 de la subunidad adyacente, lo que hace pensar que la inhibición de la actividad de TcTIM por DTDA está relacionada con la alteración de la región interfacial del dímero (Olivares-Illana, V. y col., 2007).

En el presente trabajo, retomamos los estudios efectuados por Téllez-Valencia con TcTIM y C8 (Téllez-Valencia, A. y col., 2002, Téllez-Valencia, A. y col., 2004), con la finalidad de realizar la descripción del mecanismo molecular de inhibición desde un punto de vista estructural y contribuir en el conocimiento de los eventos que gobiernan el proceso del reconocimiento proteína-ligando.

Por otro lado, en este trabajo de tesis, se consideró llevar a cabo un estudio *in silico* de la inhibición de TcTIM por C8, con el objeto de comprender molecularmente este proceso y contribuir en el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas. Así, se planteó encontrar inhibidores altamente selectivos a partir de la búsqueda sistemática de compuestos derivados de la molécula de estudio (C8) y encontrar sustancias con mayor potencia medicinal y menor toxicidad, consecuencia de la inhibición selectiva de la enzima del parásito y no de la del hospedero.

Los objetivos por cubrir se describen a continuación.

1.4. Objetivos del proyecto de investigación

1.4.1. Objetivo general

Determinar el mecanismo molecular de la inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, con la finalidad de obtener los parámetros de diseño o modificación de moléculas existentes, además de contribuir al conocimiento de los mecanismos que gobiernan los eventos en la interacción proteína-ligando.

1.4.2. Objetivos particulares

Caracterizar el efecto del inhibidor sobre la conformación y actividad de TcTIM, mediante el empleo de métodos espectroscópicos.

Realizar la identificación de posibles sitios de unión presentes en TcTIM, mediante el empleo de métodos computacionales.

Identificar los modos normales de vibración que presenta TcTIM y que pueden dar lugar a la exposición de sitios de unión.

Realizar la descripción del mecanismo molecular de la inhibición, y el estudio de la interacción proteína-ligando, con base a resultados experimentales y computacionales.

Llevar a cabo la búsqueda de compuestos similares a la molécula líder, generar quimiotecas y construir un farmacóforo, con la finalidad de identificar nuevas moléculas líderes.

1.5 Estrategia seguida durante la realización del trabajo de investigación.

Puesto que el objetivo del trabajo de investigación estaba dirigido a dilucidar el mecanismo molecular de la inhibición selectiva de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) por el ácido 3-(2-benzotiazoltio)-1-propanosulfónico (C8), se inició la investigación determinando las condiciones bajo las que se realizarían los experimentos; la finalidad fue poder atribuir correctamente los cambios en las señales de las distintas técnicas a la presencia de C8 y no a artificios generados por la inestabilidad de nuestro sistema.

La búsqueda de las condiciones experimentales se inició evaluando la estabilidad de nuestra enzima en distintas soluciones amortiguadoras, así como la dependencia de la estabilidad con la temperatura. Por otro lado, se realizó la caracterización de C8 con el objetivo de determinar que no estuviéramos trabajando en intervalos de concentración que intervinieran con el registro de las señales atribuidas a TcTIM (ANEXOS I-III).

Una vez que se contó con las condiciones de trabajo, se procedió a caracterizar el efecto del inhibidor sobre la enzima empleándose técnicas de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia intrínseca y extrínseca y mediciones de actividad enzimática. Por otro lado, auxiliándonos de herramientas computacionales, determinamos los sitios potenciales de unión de C8 presentes en la estructura de TcTIM. Evaluamos el posible papel de los movimientos propios de la enzima en la exposición de sitios de unión, así como la propagación de los efectos a zonas distantes de dichos sitios. Conjuntando los datos obtenidos por técnicas experimentales y computacionales se planteó un posible mecanismo de inhibición, el cual necesariamente implicaba la descripción de la interacción proteína-ligando (capítulo 3).

Basados en estos datos estructurales, se optó por realizar una búsqueda de compuestos similares al inhibidor (considerado una molécula líder en el diseño de fármacos contra la enfermedad de Chagas) y llevar a cabo una simulación del reconocimiento molecular entre los ligandos y los sitios de unión de TcTIM. Posteriormente se identificó un farmacóforo (capítulo 4), que sirvió para realizar la construcción de quimiotecas virtuales para su posterior cribado. A partir de la información obtenida, se propusieron una serie de modificaciones químicas que permitirían incrementar la afinidad de ciertos compuestos por TcTIM (capítulo 5) (fig. 5).

La descripción de la metodología seguida en cada uno de los bloques que constituyen el trabajo de investigación, se realiza en el capítulo de materiales y métodos.

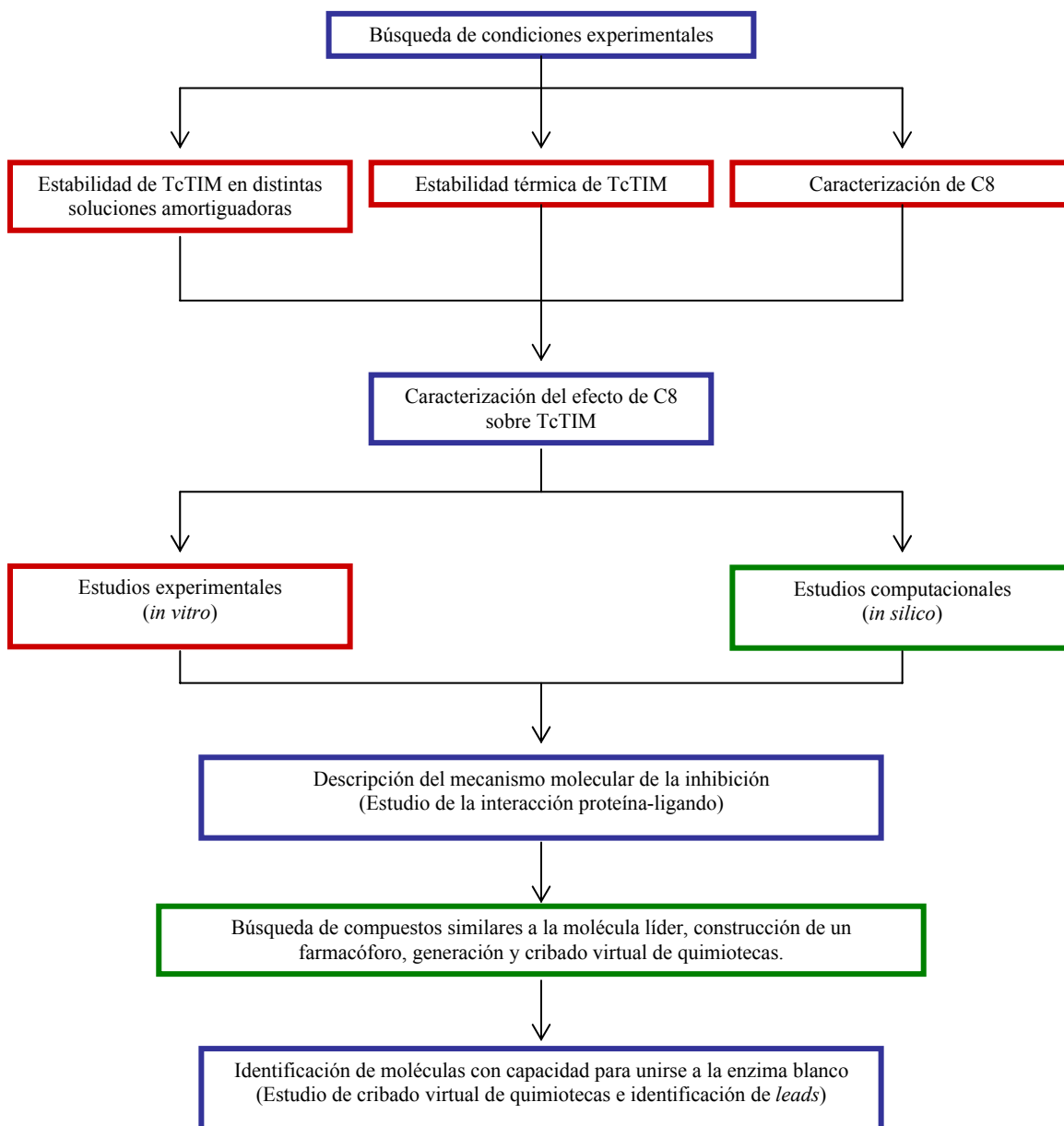


Figura 5. Diagrama que muestra los distintos bloques que componen el trabajo de investigación. Recuadros: rojo, parte experimental *in vitro*, verde, parte experimental *in silico* y azul, objetivos por alcanzar. Abreviaturas: TcTIM, triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*; C8, ácido 3-(2-benzotiazoltio)-1-propanosulfónico.

2. Materiales y métodos.

2.1 Abordaje experimental.

La pureza de los reactivos empleados fue grado analítico. Se utilizó agua destilada y desionizada en todos los ensayos. Cuando fue necesario, la temperatura fue calibrada con un termistor de referencia secundaria Hart Scientific 5611[®] (intervalo de 0 a 100 °C). Como una primera etapa, se buscaron condiciones experimentales en las cuales TcTIM presentara estabilidad, se exploraron distintas soluciones amortiguadoras, manteniendo fijo el valor de pH en 7.4 y la temperatura en 36 °C, esto con la finalidad de aproximarnos a condiciones fisiológicas y a las condiciones de estudios reportados previamente (Téllez-Valencia, A. y col., 2002). Una vez que se lograron determinar las condiciones experimentales (ver ANEXOS I-III), se realizaron experimentos de actividad enzimática, dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca y fluorescencia extrínseca (1-anilino-8-naftaleno sulfonato, ANS).

2.1.1. Triosafosfato isomerasa.

En este trabajo se utilizó un lote de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) obtenido en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La TIM utilizada en estos estudios fue recombinante, expresada en *E. coli*. Se purificó a homogeneidad utilizándose la metodología descrita por Ostoa-Saloma, P. y col., 1997.

2.1.1.1. Diálisis de triosafosfato isomerasa.

Se tomó una alícuota de TcTIM suspendida en sulfato de amonio, ésta se dializó contra una solución reguladora de trietanolamina (TEA) 100 mM: ácido etilendiamintetracético (EDTA) 10 mM manteniendo la temperatura en 4 °C y con agitación constante. Transcurridas cuatro horas se realizó un cambio de solución amortiguadora y se dejó toda la noche a temperatura y agitación constante. Esta fue la solución de proteína que se empleó para los estudios descritos en los párrafos siguientes, determinándose una concentración de 26.54 μM (1.45 mg/mL) a partir de su absorción a 280 nm ($\epsilon = 34,950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculado de acuerdo a Pace, C. N. y col., 1995).

2.1.2. Ensayos de actividad enzimática.

2.1.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos de TcTIM.

La actividad catalítica de TcTIM se determinó espectrofotométricamente midiendo la velocidad de conversión del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual se convierte a su vez en α -glicerofosfato (Glicerol-Pi) por acoplamiento con la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -GDH). La reacción acoplada consume un mol de dinucleótido de nicotinamina adenina reducido (NADH) por mol de DHAP que reacciona (Rozacky, E. E. y col., 1971). Con un exceso de α -GDH, la velocidad de producción de DHAP es equivalente a la oxidación del NADH, la cual se mide por disminución de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresó en μmoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína ($\mu\text{moles}/\text{mg min}$). El volumen total de reacción fue de 1 mL, conteniendo 0.2 mM de NADH y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -GDH en amortiguador (TEA 100 mM:EDTA 10 mM o fosfatos 30 mM, pH 7.4). Los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones de G3P fueron ajustados empleando la ecuación de Michaelis-Menten (Segel, I., 1982). Para determinar la constante de Michaelis (K_m) y el número de recambio (k_{cat}), la concentración del G3P se varió en un intervalo de concentraciones de 0.05 mM a 4.0 mM.

La reacción se inició con la adición de 5 ng de TcTIM. El equipo empleado fue un espectrofotómetro ultravioleta visible HP 8453. Los ensayos se realizaron a 36 °C regulando la temperatura mediante un sistema Peltier y midiéndola con un termistor de referencia secundaria Hart Scientific 5611[®].

2.1.2.2. Medición de la actividad catalítica de TcTIM después de su incubación con la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8, C8).

TcTIM fue incubada a una concentración de 0.0915 μM (5 $\mu\text{g/mL}$) en una solución amortiguadora de TEA 100 mM y EDTA 10 mM o de fosfatos 30 mM pH 7.4, en presencia de una concentración de C8 de 20, 50, 100 o 250 μM . La temperatura en la celda de reacción se mantuvo en un valor fijo de 36 °C por tres horas. Se tomaron alícuotas de 1 μL para medir la actividad enzimática a distintos tiempos (0, 5, 10, 25, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos). La celda de reacción fue preparada como se describió en el apartado anterior.

2.1.2.3. Determinación del tipo de inhibición ejercida por C8.

A partir del análisis de las gráficas de Lineweaver-Burk se determinó el tipo de inhibición ejercida por C8. Se construyeron curvas del inverso de la velocidad de la reacción ($1/v$) contra el inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$), preparando la celda de reacción como se describe en la sección 2.1.2.1, incubando con distintas concentraciones de compuesto 8 (intervalo entre 25 y 250 μM). Con fines comparativos, también se calcularon los valores de la constante de Michaelis (K_m) y de la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$), empleando la ecuación de Michaelis-Menten.

2.1.3. Dicroísmo circular.

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un portaceldas tipo Peltier para el control de temperatura y agitación magnética. Cada uno de los espectros reportados fue corregido por la sustracción del registro de la solución amortiguadora, y es el promedio de tres experimentos. El recorrido de la celda de reacción fue de 0.5 cm y la agitación en ésta se mantuvo en 450 rpm. La elipticidad está reportada en elipticidad por residuo promedio, siendo calculada usando una masa promedio por residuo de 109 gramos por mol de aminoácido (54.7 kDa/502 residuos totales).

2.1.3.1. Obtención de los espectros de dicroísmo circular de TcTIM.

Para obtener los espectros de dicroísmo circular de TcTIM se prepararon soluciones de la enzima cuya concentración fue de 0.183 μM (10 $\mu\text{g/mL}$) en amortiguador de fosfatos 30 mM a pH de 7.4. Las soluciones se filtraron antes de las mediciones, utilizando para ello membranas hidrofílicas de polietersulfona con tamaño de poro de 0.2 μm (Pall Corporation[®]) e inmediatamente se inició el registro. Los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano fueron registrados entre los 190 y 260 nm. El tiempo muerto medido fue de 10 segundos. La temperatura se mantuvo en 36 °C. Para obtener los espectros de dicroísmo circular en presencia del inhibidor, la celda de reacción se preparó de manera semejante, aunque en este caso se adicionó una alícuota de solución stock de C8 de tal manera que la concentración final en la celda fue de 100 μM .

2.1.3.2. Obtención de las cinéticas de desplegamiento seguidas por dicroísmo circular.

Las cinéticas de dicroísmo circular de TcTIM se obtuvieron siguiendo los cambios de elipticidad a una longitud de onda fija de 222 nm, manteniendo la temperatura constante en 36 °C. Se inició el registro únicamente con la solución amortiguadora, transcurridos cinco minutos se inyectó una alícuota de solución stock de TcTIM para obtener una concentración final en la celda de 0.183 μM (10 μg/mL). El registro se siguió durante tres horas y al término de este tiempo se obtuvo un espectro de la enzima en el ultravioleta lejano. Las cinéticas de dicroísmo circular en presencia de C8 se obtuvieron de manera semejante, en este caso la celda al inicio del registro contenía una solución de C8 de concentración 100 μM en amortiguador de fosfatos 30 mM a pH 7.4. La temperatura se mantuvo en 36 °C durante las tres horas que duró el registro.

2.1.4. Fluorescencia.

La obtención de los espectros de emisión y de las cinéticas de fluorescencia –intrínseca y extrínseca- se realizaron en un espectrofluorómetro K2 de ISS (Champaign, IL, USA) equipado con agitación magnética y un sistema Peltier para el control de temperatura, la cual se mantuvo en 36 °C. Las soluciones se filtraron antes de las mediciones utilizando para ello membranas hidrofílicas de polietersulfona con tamaño de poro de 0.2 μm (Pall Corporation®).

2.1.4.1. Obtención de los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de TcTIM.

Para obtener los espectros de emisión de TcTIM se prepararon soluciones de la enzima cuya concentración fue de 0.183 μM (10 μg/mL) en amortiguador de fosfatos 30 mM con un pH de 7.4. Los espectros se obtuvieron excitando a 280 nm y midiendo la emisión en un intervalo entre 300 y 400 nm. Adicionalmente se obtuvieron espectros excitando a 290, 295, 300 y 305 nm y registrando la emisión en un intervalo de 305 y 405, 310 y 410, 315 y 415, y 320 y 420 nm, respectivamente. El tiempo muerto fue de 10 segundos. Por otro lado, se obtuvieron varios espectros de emisión de fluorescencia durante un periodo de tres horas. En la primera hora éstos fueron obtenidos a intervalos de dos minutos, a partir de la segunda hora se obtuvieron cada veinte minutos. En cada espectro obtenido se calculó el centro de masa espectral (C. M. E.) y se siguió el desplazamiento de éste en el tiempo. Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{C. M. E.} = \frac{\sum \lambda I}{\sum I}$$

Donde I es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda λ. Los espectros de emisión de fluorescencia de TcTIM en presencia de C8 fueron obtenidos en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. En este caso la celda de reacción contenía una solución de compuesto 8 a concentraciones de 100 μM en amortiguador de fosfatos 30 mM a pH de 7.4 y una concentración de TcTIM de 0.183 μM (10 μg/mL). La temperatura se mantuvo en 36 °C.

2.1.4.2. Obtención de las cinéticas de emisión de fluorescencia intrínseca de TcTIM.

Las cinéticas de emisión de fluorescencia de TcTIM se obtuvieron excitando a una longitud de onda fija de 280 nm y midiendo la emisión en 322 nm, manteniendo la temperatura constante en 36 °C por tres horas.

Se inició el registro únicamente con la solución amortiguadora, después de transcurrir cinco minutos se inyectó una alícuota de solución stock de TcTIM para obtener una concentración final en la celda de 0.183 μM (10 $\mu\text{g/mL}$). Al término del registro se obtuvo un espectro de emisión con las condiciones reportadas anteriormente.

Las cinéticas en presencia de C8 se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, salvo que se inició el registro con la solución amortiguadora conteniendo el C8 en una concentración de 100 μM .

2.1.4.3. Obtención de las cinéticas de emisión de fluorescencia extrínseca empleando ANS.

Las cinéticas de emisión de fluorescencia extrínseca de ANS se obtuvieron excitando a una longitud de onda fija de 380 nm y midiendo la emisión a 497 nm, en presencia de TcTIM. Se inició el registro con la solución amortiguadora conteniendo una concentración de ANS de 40 μM en buffer de fosfatos 30 mM, después de transcurrir cinco minutos se inyectó una alícuota de solución stock de TcTIM para obtener una concentración final en la celda de 0.183 μM (10 $\mu\text{g/mL}$).

El registro de las cinéticas en presencia de C8 se inició con la solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, conteniendo una concentración de ANS de 40 μM y una concentración de C8 de 100 μM . Después de transcurrir cinco minutos se inyectó una alícuota de solución stock de TcTIM para obtener una concentración final en la celda de 0.183 μM (10 $\mu\text{g/mL}$). La celda se mantuvo en agitación constante y la temperatura fue calibrada a 36 °C. Nuevamente, las cinéticas de emisión se obtuvieron excitando a una longitud de onda fija de 380 nm y midiendo la emisión a 497 nm.

2.1.5. Caracterización de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8, C8).

La sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8), se adquirió en SIGMA-Aldrich, con una pureza del 95%. La fórmula molecular de C8 es $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{S}_3(\text{Na}^+)$, con un peso molecular de 311.38 g/mol.

2.1.5.1. Absorción en el ultravioleta y visible de C8.

Los espectros de absorción ultravioleta de C8 se obtuvieron empleando un espectrofotómetro ultravioleta visible HP modelo 8453. Los ensayos se realizaron a 36 °C regulando la temperatura mediante un sistema Peltier y midiéndola con un termistor de referencia secundaria Hart Scientific 5611[®]. Se obtuvieron espectros a concentraciones de 25, 50, 62.5, 125 y 250 μM , en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, pH 7.4. El registro de la señal se realizó en un intervalo entre los 225 y 400 nm. Las muestras fueron preparadas a partir de una solución stock 0.075 M, en el momento de la medición.

2.1.5.2. Fluorescencia intrínseca.

La obtención de los espectros de emisión se realizó en un espectrofluorómetro K2 de ISS (Champaign, IL, USA) equipado con agitación magnética y un sistema Peltier para el control de temperatura, la cual se mantuvo en 36 °C. Las soluciones se filtraron antes de las mediciones utilizando para ello membranas hidrofílicas de polietersulfona con tamaño de poro de 0.2 μm (Pall Corporation[®]). En todos los casos se usó una celda de cuarzo de 1 cm de recorrido óptico y capacidad de 3 mL.

2.1.5.2.1. Determinación del máximo de emisión.

Para obtener los espectros de emisión de C8 se prepararon soluciones 25, 50, 62.5 125 y 250 μM , en amortiguador de fosfatos 30 mM con un pH de 7.4. Para determinar el máximo de emisión, se obtuvieron una serie de espectros excitando en un intervalo entre los 350 y 370 nm y midiendo la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm.

2.1.5.2.2. Determinación de la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de C8.

Para evaluar la existencia de una dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de C8, se obtuvieron una serie de espectros de emisión de soluciones cuya concentración de C8 se encontraba entre los 10 y los 400 μM . Los espectros se obtuvieron excitando a 357 nm y midiendo la emisión en un intervalo de longitud de onda entre los 370 y los 600 nm. Se realizó el cálculo del centro de masa espectral como se indicó en la sección 2.1.4.1.

2.1.5.2.3. Determinación del efecto de filtro interno.

Para garantizar que no se estuviera trabajando en un intervalo de concentraciones en el que se tuviera efecto de filtro interno, se realizaron cinéticas de fluorescencia en el intervalo de concentración mencionado en la sección 2.1.5.2.2, excitando a 357 nm y midiendo la emisión a 407 nm. El registro se siguió por treinta minutos; utilizando el promedio de dichas cinéticas, se construyó una curva de intensidad de fluorescencia contra concentración de C8.

2.1.5.2.4. Estabilidad de C8 a permanecer en dilución.

Para explorar el efecto del almacenamiento en la fluorescencia de C8, se obtuvieron espectros de emisión a distintos tiempos: fresco, 15 y treinta días. Las muestras, cuya concentración de C8 fue de 250 μM , fueron excitadas a 357 nm y se midió la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm.

2.1.5.2.5. Estabilidad de C8 ante radiaciones sucesivas.

Una muestra fresca conteniendo 250 μM de C8 fue excitada a 357 nm, midiendo la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm. La toma de espectros se realizó en cinco ocasiones a intervalos de 3 minutos.

2.1.5.3. Calorimetría diferencial de barrido.

Para evaluar la pureza de C8, una muestra de 8.36 mg (SIGMA, Chemical Company) pesada con precisión y exactitud fue analizada mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido. El equipo empleado para la determinación del punto de fusión y el calor de fusión fue un calorímetro DSC 2920 Modulated DSC, de TA Instruments. La velocidad de calentamiento utilizada fue de 10°C/min y el intervalo de temperatura evaluado entre 20 y 300 °C. Se emplearon como portamuestras crisoles de aluminio, la composición del gas utilizado fue nitrógeno y el caudal fue de 50 mL/min.

2.2 Abordaje computacional.

El objetivo de realizar un estudio *in silico* -de la simulación del reconocimiento molecular de TcTIM y C8, como herramienta adicional para determinar el mecanismo molecular de la inhibición selectiva de la enzima por el ligando-, fue la de obtener los parámetros de diseño o modificación de moléculas existentes para incrementar la afinidad de la unión, así como la de identificar compuestos que pudieran servir como precursores de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas. Para llevar a cabo lo anterior, se realizó un docking de C8 sobre la superficie de TcTIM, con el objetivo de identificar los posibles sitios de unión. Posteriormente se efectuó una búsqueda de compuestos similares a C8 y con estos se realizaron estudios de docking. Una vez determinadas las características fisicoquímicas de los complejos formados en los sitios de unión elegidos, se obtuvo un farmacóforo a partir del cual se generaron dos quimiotecas para su cribado virtual, con la finalidad de lograr la identificación de compuestos que permitan desestabilizar al dímero activo. Lo anterior se resume en la figura 6.

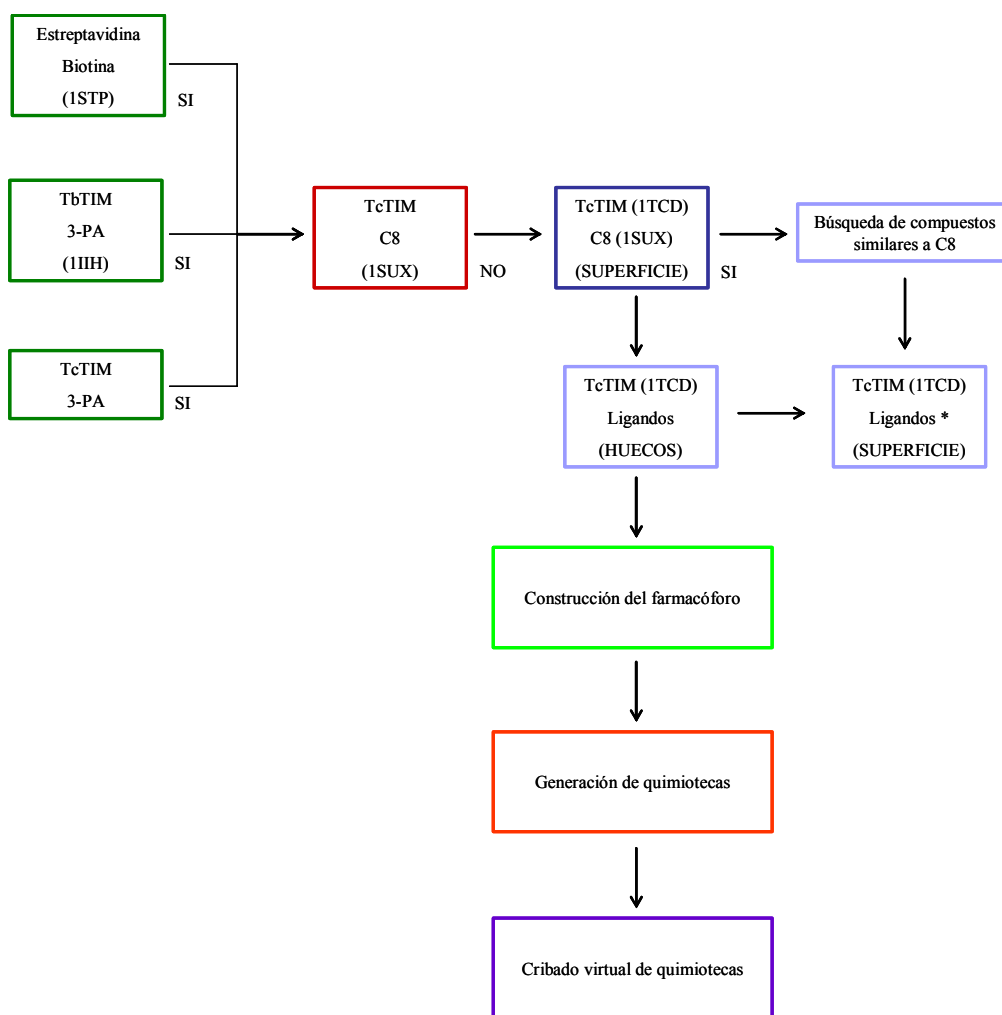


Figura 6. Estrategia seguida durante el abordaje computacional. Ligandos: C8, *ChemDB 2-7, huecos: HSA, HH, HRI. Abreviaturas: 3-PA, 3-fosfoglicerato; C8, ácido 3-(2-benzotiazoltio)-1-propanosulfónico. ChemDB_{número}, compuesto obtenido de la base de datos ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>). HSA, hueco que da acceso al sitio activo; HH, hueco que da acceso a hélices que contienen regiones con tendencia a agregar, y HRI, hueco localizado en la región interfacial.

2.2.1. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular proteína-ligando (docking).

Los archivos utilizados en los estudios de docking se obtuvieron del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>), la estrategia de trabajo se muestra en la figura 5. La validación del método se realizó empleando tres diferentes complejos cristalográficos: estreptavidina y biotina (1STP), triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y 3-fosfoglicerato (3-PA) (1IIIH) y triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (1TCD) y 3-PA (coordenadas del análogo de sustrato) (cuadros verdes en la figura 5). Utilizando estos complejos se definieron los parámetros a emplear durante los estudios de docking; una vez estandarizado el método, se procedió a trabajar con el complejo de interés: triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y ácido 3-(2-benzotiazoliltilio)-1-propano sulfónico (C8, molécula líder) (1SUX) (cuadro rojo en la figura 5). Debido a que en el archivo 1SUX hacían falta las cadenas laterales de algunos residuos de aminoácidos, se decidió trabajar con el archivo 1TCD y las coordenadas del C8 obtenidas del archivo 1SUX (azul marino).

2.2.1.1. Docking.

El docking de los complejos se realizó empleando el conjunto de programas de Autodock 3.0.5. (Morris, G. M. y col., 1998). Los parámetros del docking fueron de 100 pruebas, con 20 millones de evaluaciones de energía por cada prueba y un tamaño de población de 100 individuos (Alfonso, P. y col., 2005).

Inicialmente, cuando la búsqueda de los sitios potenciales de unión se hizo sobre toda la superficie de la proteína, el espacio de búsqueda fue restringido a un paralelepípedo rectangular que abarcaba toda la proteína, proporcionando un espacio extra de 4 Å alrededor de ésta. Para la construcción de la red se empleó un espaciado de 0.55 Å. Cuando la búsqueda se restringió a sitios específicos (por ejemplo la región interfacial), el espacio de búsqueda se confinó en un paralelepípedo centrado en el sitio y el espaciado utilizado en la construcción de la red fue de 0.2 Å.

Para adquirir mayor certeza en la predicción de la localización de los sitios potenciales de unión localizados en la superficie de TcTIM, se decidió hacer una partición de la estructura en 27 bloques, cada uno centrado en una caja de prueba, de tal manera que sobre cada caja se realizaron 100 pruebas, con 20 millones de evaluaciones de energía por cada prueba y un tamaño de población de 100 individuos. Al final de estos ejercicios se obtuvieron 27000 soluciones. En estas cajas de evaluación el espaciado empleado en la construcción de la red fue de 0.375 Å y se proporcionó un espacio extra de 15 Å alrededor de la proteína.

2.2.1.2. Preparación de la molécula blanco.

En todos los casos, el archivo de coordenadas de la proteína fue preparado excluyendo todos los heteroátomos. Los hidrógenos polares y las cargas parciales fueron asignados utilizando Gromacs 3.2.1, usando el campo de fuerzas GROMOS96 43a1 (Lindahl, E. y col., 2001).

2.2.1.3. Preparación del ligando.

En el caso de la preparación de los ligandos, para la asignación de los hidrógenos se utilizó el programa Babel3 y la asignación de las cargas fue hecha con MolCharge 1.3 empleando el algoritmo AM1BCC (Openeye Scientific Software).

2.2.1.4. Complejos proteína-ligando.

Como se mencionó anteriormente, los complejos de estreptavidina y biotina (1STP), triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y 3-PA (1IIH) y el de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (1SUX), se obtuvieron del PDB. El constituido por triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y 3-PA, se construyó empleando las coordenadas del archivo cristalográfico de TcTIM (1TCD) y las coordenadas del 3-PA (1IIH), después de haber realizado un alineamiento de los archivo 1IIH y 1TCD, utilizando la versión 0.99 de PyMol. El mismo procedimiento se siguió en la construcción del complejo de TcTIM y C8 (TIM-C8), aunque en este caso las coordenadas de los átomos de la proteína fueron obtenidos del archivo 1TCD, y las coordenadas de los átomos del ligando obtenidas del archivo 1SUX; se procedió de esta manera porque en el archivo 1SUX algunos residuos de aminoácidos carecían de sus cadenas laterales. Durante todos los ejercicios de docking se trabajó con el archivo TcTIM-C8.

2.2.1.4.1. Validación del método de docking.

Se utilizó un sistema conocido, constituido por estreptavidina y biotina, para realizar una primera aproximación con los programas de docking con los que se trabajaría. La finalidad fue familiarizarse con el programa y reproducir los resultados obtenidos anteriormente por el grupo de investigación del Dr. Javier Sancho, del Instituto de Biocomputación y Sistemas Complejos, de la Universidad de Zaragoza, España.

Por otro lado, utilizando los complejos de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* y 3-PA (1IIH) y el de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y 3-PA (coordenadas obtenidas del archivo 1IIH) se precisaron los parámetros a emplear durante los ejercicios de docking. Se definió como criterio de validación el que el ejercicio de docking localizara el sitio de unión en el sitio activo, ya que se contó con el archivo cristalográfico (1IIH) del complejo de TbTIM y el análogo de sustrato, a partir del que se sabía cuál era el sitio de unión.

Con la finalidad de determinar las características químicas y estructurales que se presentan en la interacción de C8 con TcTIM, una vez estandarizado el método, se procedió a trabajar con el complejo de interés: triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (TcTIM-C8). Se definió como criterio de validación el que el ejercicio de docking localizara el sitio de unión de la región interfacial, ya que se contó con el archivo cristalográfico del complejo TcTIM y C8 (1SUX). En éste, se tenía identificado el sitio de unión de la primera molécula de compuesto 8 (región interfacial). Cuando esto no se cumplió fue necesario modificar los parámetros del docking.

A manera de comprobación se generó un archivo en el que se acoplaron dos dímeros de TcTIM (tetrámero de TcTIM, tratando de simular la orientación en el cristal), buscando formar un hueco en la región interfacial. Sobre ese hueco se realizó un docking para evaluar si efectivamente se podía predecir la unión del C8 en la conformación y posición reportadas por cristalografía.

2.2.1.5. Cálculo de la energía de docking del C8 del cristal.

Para comparar las energías de docking obtenidas para C8 en los sitios elegidos, se hizo el cálculo de la energía de docking del compuesto 8 con las coordenadas reportadas en la estructura cristalográfica (obtenidas del archivo PDB 1SUX). Para poder realizar lo anterior, se construyeron las mallas y el fichero de configuración del docking, especificando el método de evaluación de energía, siendo el mismo que el empleado en todos los ejercicios de docking.

A la conformación que se deseaba evaluar se le adicionaron las cargas de manera semejante a lo realizado en la sección 2.2.1.3 y se ejecutó Autodock. La energía de docking fue obtenida en kcal/mol.

2.2.1.6. Búsqueda de compuestos similares a C8.

Con el objeto de definir las características de tipo químico y estructural que se requieren para lograr la interacción de distintos compuestos sobre los sitios de unión seleccionados, se emplearon compuestos similares a la molécula líder (C8); para ello se realizó una búsqueda por similitud estructural en las siguientes bases de datos:

- <http://blaster.docking.org/zinc/>
- <http://www.emolecules.com/>
- <http://cactus.nci.nih.gov/>
- <http://chembank.broad.harvard.edu/>
- <http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>

Se decidió trabajar con la base de datos de ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>, la cual cuenta con casi un millón de compuestos), puesto que ésta contempla diversos criterios de búsqueda, lo que aseguró que los resultados obtenidos compartían características similares al compuesto de interés. En esta base se pueden realizar búsquedas de compuestos similares por subestructura o empleando criterios químicos, utilizando el criterio de similitud de Tversky o de Tanimoto (Chen, J. y col., 2005). Una ventaja durante la búsqueda fue que dicho criterio toma la forma del coeficiente de Tanimoto cuando los valores de α y β valen 1, y el de Dice cuando éstos valen 0.5 (Willett, P., 1998). Los criterios de búsqueda fueron:

Código SMILES del C8:	<chem>C1=CC=C2C(=C1)N=C(S2)SCCCS(=O)(=O)[O-]</chem>
Búsqueda por:	Similitud
Coefficiente de similitud:	Tversky
Valor de α :	0.9
Valor de β :	0.1
Mínimo porcentaje de similitud:	0.75

Estos compuestos se utilizaron en ejercicios de docking que estaban encaminados a determinar qué grupos podían ser necesarios para que se estableciera el contacto entre un ligando y TcTIM en los sitios elegidos. Se emplearon los mismos parámetros de docking que en el caso del C8, la preparación de cada uno de los ligandos se hizo de acuerdo a la metodología descrita anteriormente.

2.2.1.7. Identificación de las interacciones establecidas en los complejos constituidos por moléculas similares a C8 (molécula líder) y TcTIM.

Una vez que se obtuvieron los resultados de docking de los ligandos con TcTIM (teniendo los ficheros PDB con las coordenadas del receptor y del ligando), se procedió a construir un mapa de las interacciones establecidas. Para ello se empleó el programa LigPlot 4.4.2 y NACCESS 2.1.1. LigPlot es un programa que genera de manera automática una representación esquemática en 2-D de complejos proteína-ligando. Muestra los patrones de interacción entre las dos moléculas, particularmente puentes de hidrógeno y contactos hidrofóbicos, además de la accesibilidad al solvente (Wallace, A. C. y col., 1995).

2.2.1.8. Creación del farmacóforo.

La estrategia seguida en la construcción del farmacóforo fue la siguiente. Con la molécula blanco preparada y con sitios de unión seleccionados, se realizó una búsqueda de moléculas similares al C8 en bases de datos de compuestos químicos (sección 2.2.1.6). Concluida la búsqueda, se obtuvo una lista de compuestos similares, con éstos se realizó un docking sobre toda la superficie y se localizaron sitios potenciales de unión. Una vez caracterizadas las propiedades químicas de los residuos de aminoácidos se procedió a generar el farmacóforo con el que se obtendrían, posteriormente, los compuestos que constituirían las quimiotecas. La creación del farmacóforo se llevó a cabo utilizando el programa LigandScout 1.0.2 (Wolber, G. y col., 2005), empleando un criterio de búsqueda basado en la estructura.

Dado que los farmacóforos representan funciones químicas, éstas son válidas no sólo para los enlaces de la molécula molde, sino también para moléculas desconocidas. Debido a esto, el método que usa LigandScout 1.0.2 es eficiente computacionalmente para realizar barridos virtuales de grandes librerías de compuestos químicos, alimentados como complejos con su receptor. LigandScout busca automáticamente las interacciones entre el ligando y la macromolécula y genera modelos 3D. Los pasos básicos en la generación de los modelos del farmacóforo, basados en la estructura, consisten en la extracción, identificación e interpretación del ligando (estados de hibridación, enlaces, etc.). La deducción del farmacóforo proporciona características tales como donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, área ionizable positiva y negativa, interacciones hidrofóbicas, anillos aromáticos y volumen excluido. Durante la generación del farmacóforo, LigandScout analiza la forma del sitio activo y coloca esferas de volumen excluido en la posición que es estéricamente requerida por el ambiente macromolecular.

Se obtuvieron tres farmacóforos, uno para cada sitio de unión: región interfacial, sitio activo y sitio de hélices constituidas por residuos con alta tendencia de agregación. Durante la generación de las quimiotecas se evitó trabajar con el farmacóforo diseñado para el sitio activo, puesto que se sabe que los sitios activos de los dos organismos involucrados se encuentran estrictamente conservados, y esto limitaba la selectividad hacia la enzima de TcTIM.

2.2.1.9. Generación de las quimiotecas a partir del farmacóforo diseñado.

Las quimiotecas construidas, denominadas emoleculas I (4363 compuestos) y emoleculas II (6899), se construyeron a partir de las especificaciones generadas por el farmacóforo obtenido previamente.

El análisis del farmacóforo, permitió determinar que en el proceso de generación de éstas, la distribución de las regiones debía ser: dos zonas con capacidad para establecer interacciones hidrofóbicas alejadas por una distancia de 3.85 Å, y una zona con capacidad para formar interacciones por carga alejada en el espacio de otra zona con capacidad de formar interacciones hidrofóbicas, por una distancia de 2.75 Å.

Se especificaron además algunas propiedades como peso molecular, valor del coeficiente de partición octanol-agua, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, número de enlaces rotantes, y códigos SMILES. Se propuso introducir los siguientes parámetros en el proceso de búsqueda (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros utilizados en la búsqueda de los compuestos que constituyen las quimiotecas empleadas en los ejercicios de cribado virtual.

Tamaño y flexibilidad	
Anillos	2
Enlaces rotables	6
Átomos aromáticos	9
Características químicas y polaridad	
cLogP	3.747
Aceptores de puente de hidrógeno	2
Donadores de puente de hidrógeno	0
Área ionizable negativa	1
Área ionizable positiva	0

Dichos compuestos se buscaron en la base de estructuras químicas conocida como eMolecules (www.emolecules.com), ya que cuenta con una gran variedad de catálogos sumando casi siete millones de compuestos, además de permitir hacer búsquedas de compuestos similares por subestructura o empleando criterios químicos, utilizando el criterio de similitud de Tversky o el de Tanimoto (Chen, J. y col., 2005).

Se obtuvieron así, dos de las tres quimiotecas empleadas en los ejercicios de cribado virtual. Adicionalmente, se trabajó con la quimioteca de MAYBRIDGE (www.chem.ac.ru/chemistry/database/MAYBRIDGE.en.html), de la que se tiene los compuestos para ensayos *in vitro*.

2.2.2. Cribado virtual de las quimiotecas eMolecules I, eMolecules II y Maybridge.

El cribado virtual de las quimiotecas se llevo a cabo empleando el conjunto de programas de FRED, de las siglas en inglés de Fast Rigid Exhaustive Docking. Éste es un conjunto de programas utilizado para la realización de docking proteína-ligando, en el que la entrada corresponde a un archivo del receptor (proteína) y una base de compuestos o quimioteca (ligandos) y la salida una serie de compuestos que se unen a la proteína (OpenEye Scientific Software, Inc).

2.2.2.1. Validación del método de cribado virtual.

La metodología empleada en el cribado de las tres quimiotecas de interés (emolecules I, emolecules II y Maybridge), se validó previamente con experimentos sobre nueve complejos proteicos, todos con sus respectivas quimiotecas constituidas de ligandos activos e inactivos. Las bases de datos de ligandos se obtuvieron de www.cheminformatics.org, y fueron preparados según la metodología descrita por J. Estrada (Estrada, J., 2006). Se dividieron en dos grupos, los activos y los inactivos, dependiendo de su capacidad para unirse a su respectivo receptor. Los complejos se enlistan a continuación:

- Acetilcolinesterasa, AChE
- Neuraminidasa
- Cell Division Protein Kinase 2, CDK2
- Mitogen-activated protein kinase 14, p38MAP
- Receptor de estrógeno, ERajac
- Receptor de estrógeno, ERasta

- Factor de coagulación Xa, fXafon
- Factor de coagulación Xa, fXajac
- Factor de coagulación Xa, fXajor

En el caso del receptor de estrógenos se contó con dos complejos (ERajac y ERasta), que diferían en la base de compuestos de activos e inactivos (jac=Jacobsson, sta=Stahl), pero que tenían el mismo receptor. La misma situación se tuvo en el caso del factor X de coagulación, en el que los tres complejos (fXafon, fXajac, fXajor), diferían en la base de compuestos de activos e inactivos (fon=Fontaine, jac=Jacobsson, jor=Joriseen-Gilson). Se inició el cribado con los archivos de los receptores y sus respectivos ligandos, ya con hidrógenos y minimizados, empleando el conjunto de programas de la versión 2.2.2. de FRED. Una vez que se validó el método, se procedió a realizar el cribado con la enzima de interés como receptor (triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*) y las quimiotecas (emolecules I, emolecules II y Maybridge).

Parte de la validación consistió en probar múltiples funciones de puntaje, y determinar, aquella con la que se trabajaría al emplear como receptor la enzima de interés (TcTIM). Las funciones de puntaje que se probaron fueron:

- Plp
- Chemgauss2
- Chemgauss3
- Shapegauss
- Chemscore
- OEChemscore
- Screenscore

2.2.2.2. Preparación del receptor.

Para la preparación del receptor se utilizó el programa *FRED receptor*. Esta es una herramienta gráfica que permite generar un archivo del receptor, y utilizarlo en ejercicios de docking con FRED (tutorial FRED receptor v2.1).

El archivo del receptor contiene los residuos que componen el sitio, un volumen en el que el docking se debe de llevar a cabo, y restricciones opcionales basadas en las interacciones con la proteína y/o localizadas en partes de la molécula anclada dentro de regiones definidas del espacio. Para diseñar el receptor, *FRED receptor* requiere un archivo PDB, conteniendo la estructura de la proteína que será empleada como receptor en los ejercicios de docking.

Inicialmente se define una caja, basada en las coordenadas del ligando que se encuentra formando un complejo con el receptor. En este paso, *FRED receptor* nos permite buscar las cavidades y los surcos en el receptor, que pudieran ser sitios de unión. Aunque este paso no es necesario, su utilización puede ayudar a determinar las dimensiones apropiadas de la caja, especialmente cuando no se cuenta con un archivo que tenga un ligando unido al receptor. Cuando se emplea esta opción, es posible ver representados los volúmenes de las formas de los sitios potenciales de unión (translucidos en verde).

Por otro lado, puede visualizarse al ligando rodeado de los residuos que forman el sitio de unión, además de desplegarse una lista que contiene los residuos de aminoácidos en contacto con el sitio de unión y que pueden ser modificados, estos residuos se conocen como “residuos mutables”.

Esta lista sirve al usuario para tener una idea de los posibles estados alternados de los residuos, lo que refleja, entre otras cosas, los diferentes rotámeros. También sirve para observar si ninguno de estos establece una interacción polar o mediada por carga, con el receptor. Una vez que se han completado los pasos anteriores, el programa detectará, en el sitio de unión, las zonas en las que se realizará el docking del ligando.

Para restringir el número de conformaciones examinadas en el sitio de unión durante el proceso de docking, se generan dos formas malladas en función de las características de dicho sitio. Estas formas se definen como contorno interno (forma verde) y contorno externo (en azul). Se ha determinado que el valor del volumen en el que debe oscilar el contorno interno, está en un intervalo entre los 50 y 100 Å³, y el del contorno externo se encuentra entre los 500 y 2000 Å³. En la forma azul debe alojarse, estrictamente, la molécula del ligando, y en la forma verde debe posicionarse al menos un átomo de dicha molécula.

Hasta este punto, se ha definido el sitio de unión sobre el que se realizara el docking. Una vez concluido el proceso, se puede guardar el receptor diseñado en formato OpenEye Binary (.oeb), para su posterior uso en el cribado de quimiotecas empleando el conjunto de programas de FRED 2.2.2.

2.2.2.3. Preparación de las quimiotecas.

La preparación de las quimiotecas se realizó empleando los programas de Flipper y Omega 2.2.1, para la obtención de los estereoisómeros y los confórmeros, respectivamente. Flipper (que forma parte de los productos de omega, pero que no es parte del mismo ejecutable) puede determinar, empleando un programa gráfico qué átomos son estereocentros en una molécula, y/o si un estereocentro ha sido diseñado estereoquímicamente; Flipper no cambia esa estereoisomería, adicionalmente, si un estereocentro no ha sido especificado estereoquímicamente, enumerará tanto los estados estereoquímicos como los estereoisómeros. Por otro lado, en la generación de confórmeros, Omega construye modelos iniciales de estructuras montando plantillas del fragmento a lo largo de los enlaces sigma. Las conformaciones para el fragmento son recuperadas de las bibliotecas generadas previamente (manual de Omega 2.2.1).

El conjunto de moléculas es ensamblado por el alineamiento vectorial simple de todos los fragmentos internos a lo largo de los enlaces sigma. Únicamente un modelo inicial de la molécula es construido, Omega genera modelos adicionales por la enumeración de las conformaciones de los anillos y de los átomos de nitrógeno. Una vez hecho esto, Omega inicia el proceso de búsqueda de las torsiones, examinando la gráfica y determinando los enlaces que son libres de rotar. Después de un proceso de filtrado y de enumeraciones estereoquímicas, Omega genera una librería que corresponde a los confórmeros de los ligandos alimentados.

2.2.2.4. Cribado virtual de las quimiotecas generadas e identificación de nuevas moléculas con potencial farmacológico.

Una vez que se contó con los archivos de los receptores y las respectivas quimiotecas de compuestos, se procedió a realizar el cribado virtual. En la línea de comando se especificó la generación de una caja basada en el ligando, extendiéndola 10 Angstroms a lo largo de cada eje.

Se especificó también que se retuvieran las mejores 100,000 soluciones de docking. Esto con la finalidad de garantizar que se retenían todas las conformaciones de los ligandos anclados.

En todos los casos, al término del cribado se obtuvieron las gráficas de “ROC” (de las siglas en inglés de Receiver Operating Characteristic), esto con el objetivo de determinar el porcentaje de activos recuperados frente a los inactivos, de la base total de compuestos alimentados.

Una vez que se definieron los parámetros a utilizar se procedió a realizar el cribado de las tres quimiotecas sobre la enzima de interés. Las quimiotecas generadas, eMolecules I y eMolecules II, consistieron de un número de compuestos de 4363 y 6898, respectivamente. Por su parte, Maybridge consiste de una base de 10,000 compuestos. Éstas fueron empleadas en ejercicios de cribado virtual empleando como receptor a trifosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*, siguiendo la metodología descrita hasta aquí.

2.2.2.5. Análisis de los resultados obtenidos y determinación de las características de los compuestos que se unen a los receptores.

En el caso de la sección correspondiente a la validación del método, empleando la lista de los compuestos que se conocen como activos y el receptor de trabajo, se generaron las gráficas ROC (de las siglas en inglés de Receiver Operating Characteristic). Estas gráficas permitieron discriminar entre los ligandos activos y los inactivos (Triballeau, N., 2005); del área bajo la curva, la cual representa la posibilidad de recuperar un ligando activo antes que uno inactivo, se determinó que función de evaluación se emplearía en los ejercicios de cribado que involucraron a TcTIM.

En el caso en el que se utilizó a TcTIM como receptor, no se contaba con una lista de compuestos activos, por lo que no fue posible obtener las gráficas ROC. El análisis se limitó a una inspección visual y a una cuantificación del número de puentes de hidrógeno e interacciones catión- π que se establecieron en algunas soluciones del cribado (elegidas al azar).

Para la inspección de los resultados se utilizó la versión 2.1.2 del programa VIDA2, herramienta complementaria del conjunto de programas de FRED. Éste consta de un listado de todas las soluciones de docking (permitiendo visualizar los átomos que se encuentran constituyendo la molécula que ha sido recuperada), un panel que está integrado por una serie de columnas en las que se indican los valores de energía asociados a cada una de las contribuciones que, en conjunto, componen la función de puntaje, la representación en 2D de la molécula, y en el pie del panel el código SMILE que la describe.

2.2.3. Determinación de los modos normales de vibración de TcTIM, empleando modelos GNM.

Un método que permite realizar el análisis de los modos normales de vibración de una macromolécula, empleando modelos que están basados en modelos conocidos como Gaussian Network Models (GNM), reduce una proteína a un conjunto de nodos conectados entre sí mediante interacciones de tipo armónico (Haliloglu, T., 1997, 1999; Bahar, I., 1997, 1998, 1999).

El modelo GNM sitúa un nodo en la posición del C_{α} de cada aminoácido, y todas sus interacciones con el resto de la proteína quedan representadas por interacciones armónicas con nodos que se encuentran a una distancia menor que un cierto límite de inclusión. Lo anterior reduce un sistema complejo a una malla elástica. Estos modelos revelan los modos normales de la malla, así como la correlación de la fluctuación de los nodos en torno a un mínimo; representándose, aunque de manera aproximada, las vibraciones de la macromolécula (Prada-Gracia, D., 2004).

A partir del cálculo de la matriz de correlación, utilizando el archivo conteniendo las coordenadas de todos los átomos de TcTIM (código PDB 1TCD), se obtuvo un perfil de fluctuaciones globales que fueron representativas de los movimientos colectivos de la proteína. Su análisis permitió identificar regiones con baja estabilidad empleando los servidores Elnémo (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/elnecho/index.html>) y MoVIES (<http://ang.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prog/norm.pl>).

2.2.4. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y EDTA, TEA y Tris-HCl.

Para realizar el estudio de la simulación del anclaje molecular de EDTA, TEA y Tris-HCl, en la superficie de TcTIM, se utilizó el conjunto de programas de MOE 2005.06, de las siglas en inglés de Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group Inc.).

El conjunto de programas de MOE, incluye una herramienta llamada “Dock”, con la que se puede realizar el docking de manera rápida y eficiente, una vez que se ha identificado el sitio de unión en la superficie de la proteína.

2.2.4.1. Identificación de los sitios potenciales de unión en la superficie de TcTIM.

Para la identificación de los sitios potenciales de unión presentes en la superficie de TcTIM, se utilizó una herramienta que forma parte del conjunto de programas de MOE, “Site Finder”; una vez que se especifican los parámetros y que se ejecuta la herramienta, aparece una ventana con los sitios identificados. Cada uno de los sitios está caracterizado en cuanto a su constitución de residuos de aminoácidos, las cadenas a las que pertenecen, así como el tamaño de la cavidad y el tipo de interacciones que presentan en ésta. Al posicionarse sobre cada uno de los sitios, pueden visualizarse los residuos de aminoácidos en el contexto de la macromolécula.

2.2.4.2. Generación de las bibliotecas de conformeros.

La generación de las bibliotecas de conformeros inicia con la creación de la molécula de la que se desean obtener dichos conformeros. Cabe mencionar que para la generación de las bibliotecas se emplean varias subrutinas del conjunto de programas de MOE. Una vez generada la molécula, se procede a su preparación, ésta incluye la adición de cargas e hidrógenos y una minimización de la estructura empleando el campo de fuerzas MMFF94x (campo de fuerzas parametrizado para moléculas pequeñas).

En este punto es muy importante cambiar el valor de energía permitida para un conformero, con la finalidad de que la molécula molde sea aceptada dentro del conjunto generado. Esta base de datos será la que se utilizará posteriormente, para llevar a cabo el docking. Para cada una de las moléculas de interés (EDTA, TEA y Tris-HCl), se generó la respectiva biblioteca de conformeros.

2.2.4.3 Docking de las moléculas de EDTA, TEA y Tris-HCl en la superficie de TcTIM.

Para realizar el docking, en la barra del menú principal de MOE, se elige la opción de “Compute”, se posiciona sobre la opción de “Simulations” y se elige “Dock”. “Dock” nos permite realizar la simulación del acoplamiento o reconocimiento molecular entre un ligando pequeño y una macromolécula (del tipo de proteínas o ácidos nucleicos). Al elegir la opción “Dock”, se tendrán que definir los parámetros siguientes:

Output: que será el archivo de salida, aquel en el que se guardaran los resultados obtenidos. El archivo tendrá una extensión correspondiente a una base de datos, .mdb.

Receptor: en este campo se especificará la molécula que fungirá como receptor y que alojará las moléculas de ligando que sean lanzadas para el fin de localizar las moléculas que se unan con mayor energética (asignada de acuerdo a una función de puntuación).

Site: en este campo se especificará el sitio sobre el que buscarán las moléculas con las mejores conformaciones de unión. Puede seleccionarse un sitio en particular e inclusive la molécula completa. Aquí podemos determinar, si se elige un único sitio, la manera en la que la energética se favorecerá si se realizan modificaciones químicas a la estructura de la molécula anclada; y/o por otro lado, si se elige la superficie completa de la proteína, se identificarán los sitios potenciales de unión, siendo probablemente compatibles con los localizados con la opción de “*Site finder*”.

PH4: se refiere a la especificación de un farmacóforo. Debe cargarse directamente de una carpeta que lo contenga.

Ligand: se refiere al campo que contendrá ya sea a un sólo ligando o a una base de datos, e inclusive otra proteína. Debe estar activada la opción de “*Conformational Search*”.

Placement: especifica el método que seguirá el programa para realizar el docking sobre la macromolécula. En nuestro caso “*Alpha triangle*”.

Scoring: se refiere a la función que empleara el programa para asignar los distintos valores de energía a las conformaciones de la molécula de ligando que se unan en el sitio activo (sitio potencial de unión).

Una vez que se han especificado los parámetros se puede ejecutar el docking. En la pantalla aparecerá un recuadro al que el programa nombrará “*Database Viewer*”, en esa ventana se enlistan las conformaciones que se han unido con mayor energía a la superficie del sitio activo. Dependiendo del número de moléculas que se le hayan pedido al programa retener, éstas aparecerán en la ventana.

3. Caracterización de la interacción del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propanolsulfónico (C8) con triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). Estudios experimentales y computacionales.

El estudio de la interacción proteína-ligando provee datos que arrojan luz sobre la función de proteínas, incluyendo enzimas. El conocimiento de los eventos que gobiernan tales procesos es de enorme utilidad puesto que, a partir de la información obtenida de la caracterización del sitio de reconocimiento, es viable desarrollar estrategias para interferir o facilitar la unión de la proteína y el ligando.

En el caso del desarrollo de fármacos, los nuevos avances se basan en el diseño de compuestos partiendo de la estructura tridimensional de la diana terapéutica (molécula blanco); ya que a partir de la caracterización del sitio de reconocimiento, se proponen las modificaciones químicas a realizarse sobre los ligandos, con la finalidad de incrementar la afinidad por el sitio de unión. Para un número importante de macromoléculas se conoce la estructura co-cristalizada con un ligando, de forma que el sitio y el modo de unión de éste sirven como un excelente punto de partida para generar nuevas moléculas con potencial terapéutico (McMartin, C. y col., 1997).

En nuestro caso, el conocimiento del mecanismo molecular de la inhibición de TcTIM por C8 nos permitió proponer una serie de modificaciones químicas en la molécula del ligando, con el objeto de incrementar la afinidad y selectividad de éste por la molécula blanco. Partiendo de los resultados experimentales reportados previamente por Téllez-Valencia y colaboradores (Téllez-Valencia, A. y col., 2004) y los encontrados durante el desarrollo de nuestra investigación, se propuso un posible mecanismo que implica al menos un intermediario en el proceso de inhibición. Probablemente, la unión de la primera molécula de compuesto 8 facilita la unión de la segunda, debido a la exposición de un sitio de unión; ésta, al unirse a la enzima, provoca un cambio en la estructura del homodímero (estado I) que desemboca en la inactivación de la especie activa, generándose posteriormente un intermediario -por la modificación de los contactos de la región interfacial- (estado II), y finalmente en la desnaturalización de éstos (estado III).

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos al evaluar la integridad estructural y funcional de TcTIM, así como los obtenidos al utilizar distintos servidores disponibles en la Internet; éstos nos permitieron realizar valoraciones energéticas y conformacionales de TcTIM (EINémo, CASTp, TANGO, COREX-Best, Alanine Scanning), con la finalidad de tener elementos teóricos que nos auxiliaran en el análisis y discusión de los resultados experimentales, que sustentan el mecanismo planteado.

Debido a que la estructura de las enzimas cambia conforme se aumenta una condición desnaturalizante, en este caso la presencia de un inhibidor, se esperaba que la proporción entre el número de moléculas de enzima que se encuentran en el estado nativo y el desnaturalizado se modificara; esto se determinó mediante el seguimiento de una señal lo suficientemente sensible a los cambios en la conformación de la enzima; cambios en la señal de espectroscopía de dicroísmo circular en el caso de la estructura secundaria, y de fluorescencia para estructura terciaria. De igual manera, el seguimiento de la actividad enzimática en presencia del inhibidor, proporcionó información sobre la integridad conformacional de la macromolécula.

3.1. Actividad enzimática.

Debido a que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del C8 sobre la actividad enzimática de TcTIM, se hizo necesario descartar posibles fuentes de inestabilización de nuestro objeto de estudio; es por ello que como se menciona en los anexos I a III, se exploraron distintas condiciones experimentales, incluyendo la temperatura y diferentes soluciones amortiguadoras. Se determinó que el sistema regulador empleado en el desarrollo de nuestra investigación sería el amortiguador de fosfatos, trabajando a una temperatura de 36 °C y pH de 7.4 (condiciones fisiológicas).

Se sabe que los fosfatos inhiben la actividad enzimática de TcTIM, es por ello que se consideró necesario determinar la pérdida de la capacidad catalítica, con respecto al sistema constituido por TEA 100 mM y EDTA 10mM (solución amortiguadora empleada por Téllez-Valencia y colaboradores en los estudios realizados en 2002 y que constituyen una referencia importante para nuestra investigación). El hecho de cambiar el amortiguador utilizado tuvo una repercusión en los parámetros catalíticos (ver fig. 7, tabla 2), observándose una disminución de la actividad, a una concentración de sustrato de 1mM, del 42 %.

Por otro lado, al evaluarse el efecto del C8 sobre los parámetros cinéticos de TcTIM, empleando la solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, se observó lo siguiente (fig. 7).

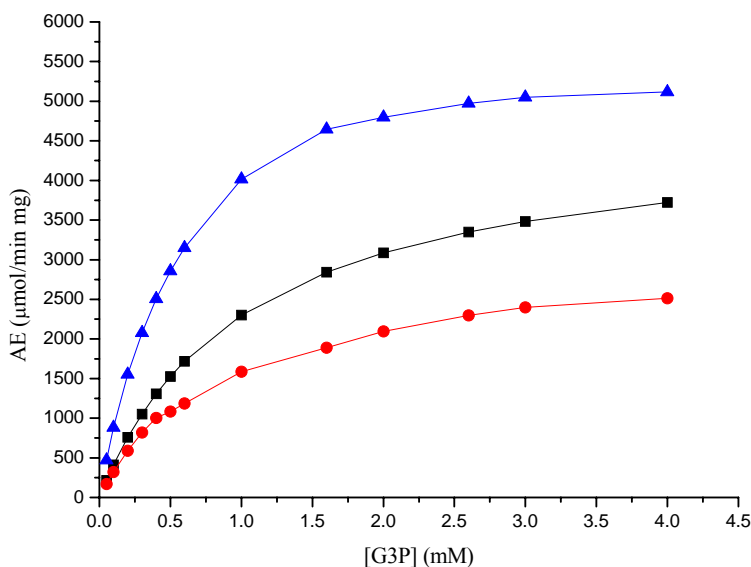


Fig. 7. Comparación de las cinéticas enzimáticas de TcTIM obtenidas en amortiguador de fosfatos 30 mM en presencia (●) y ausencia (■) de compuesto 8 ([C8]=100 μM) pH 7.4 y 36 °C. Se muestra la actividad registrada en solución amortiguadora de TEA 100 mM:EDTA 10mM en ausencia de C8 (▲). En general, se observa una disminución en la actividad enzimática y efectos en los parámetros cinéticos de TcTIM (ver tabla 2).

Se puede apreciar un efecto sobre la actividad enzimática, ésta disminuye en presencia de C8, aunque la afinidad aparentemente no cambia (ver tabla 2).

Tabla 2. Parámetros cinéticos de TcTIM determinados en distintos reguladores manteniendo el pH en un valor de 7.4 a 36 °C. La concentración del sustrato varió entre 0.05 y 4.0 mM. Los valores de la incertidumbre provienen del promedio de tres replicas.

Amortiguador	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
TEA 100 mM:EDTA 10 mM	0.53±0.08	2331	4.39 X 10 ⁶
Fosfatos 30 mM	0.9±0.17	1696	1.88 X 10 ⁶
Fosfatos 30 mM : C8 100 µM	0.7±0.22	1145	1.63 X 10 ⁶

Se observa una disminución en el número de eventos catalíticos que realiza cada sitio activo de TcTIM por unidad de tiempo (k_{cat}), lo cual puede atribuirse a cambios estructurales, debido al efecto del compuesto 8, que influyen sobre la capacidad de la enzima para llevar a cabo su función. La frecuencia con la que la enzima y el sustrato se encuentran en la solución se mantiene constante, es decir, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) se mantiene en el mismo orden de magnitud.

Reportes de Téllez-Valencia, A. y col. en 2002, indican que el efecto del compuesto 8 es dependiente de la concentración y que la inactivación es mayor conforme aumenta el tiempo de incubación. En pruebas de actividad enzimática, el compuesto 8 logró un 95% de inactivación. Cuando se determinó la concentración de compuesto 8 en la que se registra un 50% de reducción en la señal de actividad (I_{50}), se observó que ésta es trece veces menor que la determinada para la TIM de humano (hTIM); lo cual nos permite apreciar que el efecto del compuesto 8 depende de las diferencias estructurales de cada enzima, por lo que sería posible afectar selectivamente las enzimas de distintos organismos. En nuestro caso seguimos la pérdida de actividad de TcTIM incubada por dos horas y media, inducida por una concentración de 20, 50, 100 y 250 µM del compuesto 8, midiendo la actividad enzimática a distintos tiempos (fig. 8).

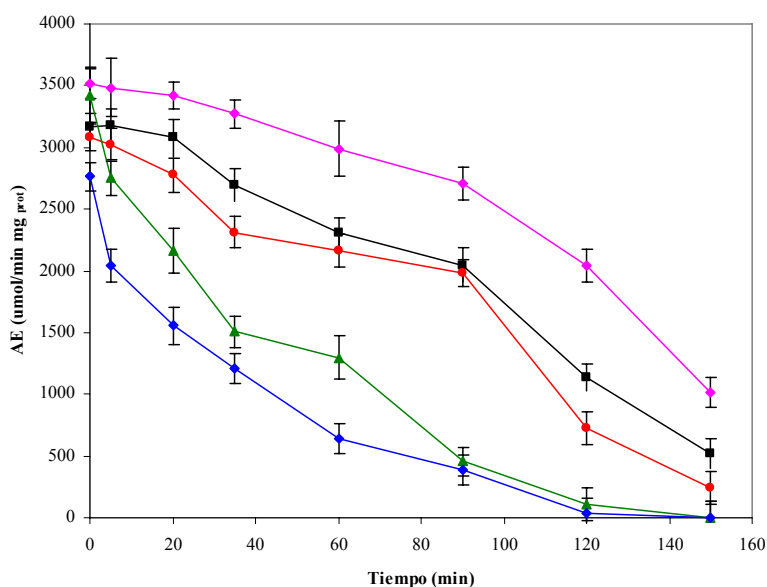


Fig. 8. Comparación de las cinéticas enzimáticas de TcTIM obtenida en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM en presencia de distintas concentraciones de compuesto 8 (♦ ausencia de C8, ■ 20 µM, ● 50 µM, ▲ 100 µM y ◆ 200 µM), a pH 7.4 y 36 °C.

Las gráficas anteriores nos permiten observar que el efecto del compuesto 8 es mayor conforme aumenta el tiempo de incubación en cualquiera de las concentraciones empleadas; por otro lado, se puede apreciar que a partir de las dos horas la inactivación es total, tanto a una concentración de 100 µM como a 250 µM del compuesto 8.

Si centramos nuestra atención en la curva correspondiente a una concentración de 100 μM observamos un efecto “protector” de los fosfatos en los primeros minutos de interacción del compuesto 8 con TcTIM, aunque transcurrida una hora de incubación el efecto registrado es similar en las dos concentraciones. Está reportado que la medición de la actividad enzimática es un método sensible y específico para caracterizar el efecto de un inhibidor sobre una enzima, ya que para que una proteína lleve a cabo su función se requiere que se encuentre en su estado nativo. Es decir, la actividad enzimática dependerá de la integridad de la estructura terciaria, y cuaternaria cuando ésta exista. Al seguir la pérdida de estructura secundaria y terciaria de la TcTIM inducida por el C8, observamos que desde los primeros minutos de contacto existe un cambio en la señal registrada que puede ser asociado al efecto del inhibidor.

3.1.1. Determinación del tipo de inhibición ejercida por el C8.

Para determinar el tipo de inhibidor con el que trabajamos, se construyeron curvas de $1/v$ contra la inversa de la concentración de sustrato, incubando con distintas concentraciones de compuesto 8, calculándose los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$. Es sabido que la acción de un inhibidor implica la unión de éste a la enzima, y que los efectos de dicha unión se ven reflejados en los parámetros cinéticos de la macromolécula, lo que permite distinguir entre los distintos tipos de inhibición que puede sufrir una enzima. Los resultados se muestran a continuación (fig. 9).

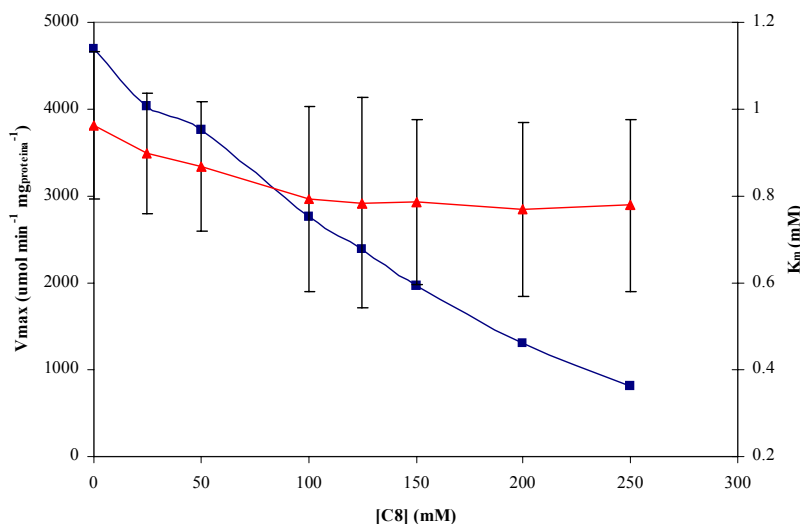


Fig. 9. Seguimiento de los valores de la constante de Michaelis, K_m (\blacktriangle) y de la velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$ (\blacksquare), obtenidos del promedio de tres cinéticas enzimáticas de TcTIM. La celda de reacción se preparó como se describe en la sección 2.1.2.1. Las concentraciones empleadas de C8 fueron de 25, 50, 100, 125, 150, 200 y 250 μM . El pH se mantuvo en un valor de 7.4 y la temperatura en 36 $^{\circ}\text{C}$. Se observa una disminución en la velocidad máxima, sin cambios estadísticamente significativos en el valor de K_m .

Puede apreciarse una disminución en los valores de la velocidad máxima, sin cambios estadísticamente significativos en el valor de la constante de afinidad. La inhibición es de tipo *no competitiva* cuando dichos efectos no se contrarrestan al incrementar la concentración de sustrato, es decir, la unión del inhibidor y del sustrato no son mutuamente excluyentes. La cinética de la inhibición no competitiva se caracteriza por una disminución en la velocidad máxima, sin cambios en el valor de K_m . La acción de un inhibidor no competitivo implica la unión del inhibidor tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, este complejo ternario puede ser parcial o totalmente inactivo.

En nuestro caso, y considerando que se requieren de al menos dos moléculas para inhibir por arriba del 95% a TcTIM, la unión de la primera molécula aparentemente se uniría al complejo enzima-sustrato (con un dímero intacto), observándose actividad enzimática y baja desestructuración de la conformación activa de la enzima (respaldado por los datos de cristalografía de rayos-x y de cinéticas de actividad). La propagación de los efectos de la unión de la segunda molécula de C8 a la superficie de TcTIM, desembocaría en la pérdida de compactación de la enzima, la exposición de regiones hidrofóbicas y finalmente, en la formación de agregados con tendencia a precipitar (datos mostrados en las secciones siguientes).

3.2. Fluorescencia intrínseca y extrínseca.

En el caso del seguimiento de la estructura terciaria mediante mediciones de fluorescencia intrínseca y extrínseca (ANS), se logró evaluar la pérdida de compactación de la enzima, ya que se pudo apreciar una disminución en la intensidad de fluorescencia intrínseca y un aumento en la intensidad de fluorescencia extrínseca. Lo anterior indica que existe un proceso de exposición de los fluoróforos constitutivos de las proteínas (tirosina (Tyr) y triptófano (Trp)), y un relajamiento de la estructura que permite el alojamiento del ANS en zonas hidrofóbicas de la estructura de TcTIM (fig. 10 y 13).

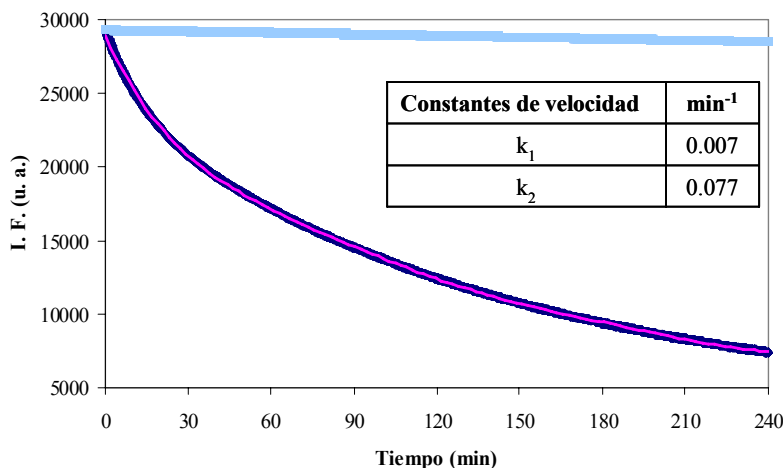


Fig. 10. Cinética de fluorescencia intrínseca de TcTIM obtenida en amortiguador de fosfatos 30 mM en ausencia (●) y presencia (■) de compuesto 8 ([C8]=100 μM) pH 7.4 y 36 °C, excitando a 280 nm y midiendo la emisión a 322 nm. Se muestran en la tabla inserta las constantes de velocidad de cada etapa obtenidas del ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos exponenciales ($y = C_0 + A*((\exp(-k_1*t))-1) + B*((\exp(-k_2*t))-1)$); donde C_0 es el valor inicial de la señal, A y B son las amplitudes de los cambios en la señal, k_1 y k_2 son las constantes de velocidad en min^{-1}). La curva en magenta corresponde al trazo del modelo ajustado con la ecuación descrita anteriormente.

Mediante el registro de fluorescencia intrínseca puede apreciarse un proceso de al menos dos etapas. En la primera etapa es posible que la unión del compuesto 8 sobre el dímero activo actúe desestabilizando la estructura mediante la perturbación de la región interfacial, ya que se sabe que la primera de las dos moléculas necesarias para inactivar a TcTIM se une en esta zona (Télez-Valencia, A. y col., 2002); probablemente la unión de la segunda molécula tenga un efecto en la estructura, de tal manera que se permita el acceso a zonas hidrofóbicas de la macromolécula, provocando la exposición de los triptófanos y por lo tanto una disminución de la intensidad de fluorescencia registrada (fig. 10 y 11).

Por otro lado, se estudió el efecto de la longitud de onda de excitación sobre el máximo de emisión. TcTIM, incubada con una concentración de C8 de 100 μM , fue excitada a diferentes longitudes de onda (en un rango entre los 280 y 305 nm), registrándose el máximo de emisión a cada longitud de onda. Como se muestra en la figura 11b, existe una ligera dependencia del máximo de emisión con la longitud de onda de excitación, se observó una diferencia en el máximo de emisión, desplazada hacia el rojo (longitudes de onda más altas) (REES, red-edge excitation shift). Este fenómeno es generalmente atribuido a cambios en la restricción del movimiento de los residuos de Trp, además de que dicho desplazamiento indica el ambiente heterogéneo, debido a la variación en la localización de los grupos polares, en la vecindad de los residuos de Trp (Demchenko, A. P., 1988, Demchenko, A. P. y col., 1988, Chen, Y. y col., 1998; Pattanaik, P. y col., 2003).

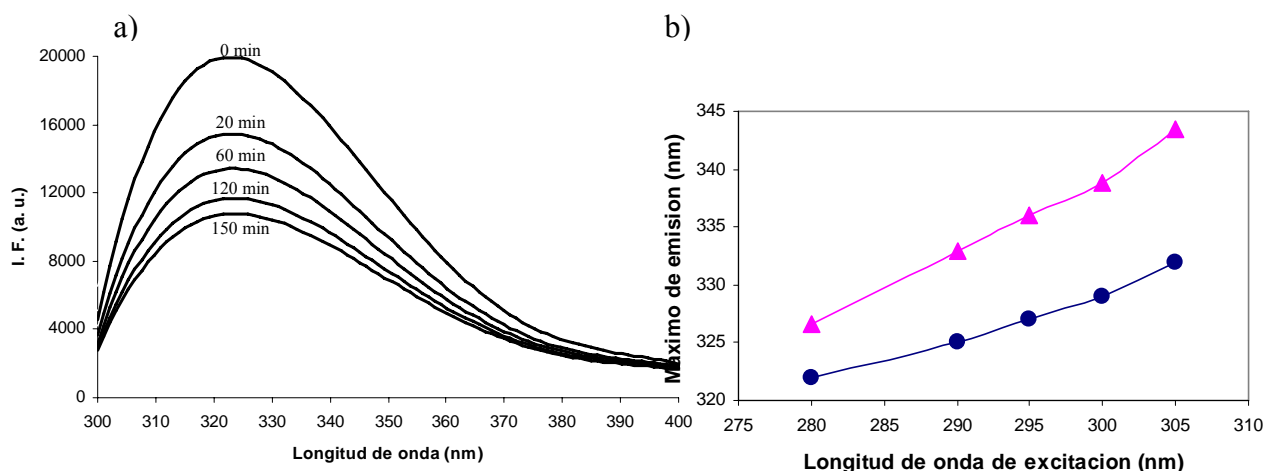


Fig. 11. a) Espectros de emisión de fluorescencia de TcTIM obtenidos en amortiguador de fosfatos 30 mM en presencia de compuesto 8 ([C8]=100 μM) a pH 7.4 y 36 $^{\circ}\text{C}$ (excitación: 280 nm, intervalo de emisión: 300-400 nm). b) Se muestra la dependencia del máximo de emisión con la longitud de onda de excitación en ausencia (●) y presencia (▲) de C8.

Al hacer un seguimiento del desplazamiento del centro de masa espectral excitando a una longitud de onda de 295 nm y registrando la emisión entre los 310 y 410 nm pudimos apreciar un desplazamiento hacia longitudes de onda más altas (aprox. 350 nm), lo que indica la exposición de triptófanos (fig. 12).

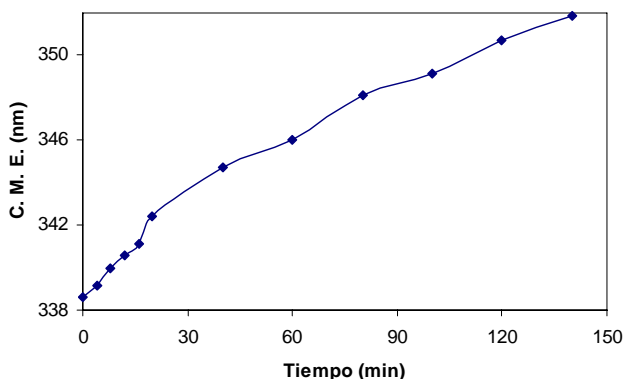


Fig. 12. Centros de masa espectral obtenidos a partir de los espectros de emisión de fluorescencia de TcTIM obtenidos en amortiguador de fosfatos 30 mM en presencia de compuesto 8 ([C8]=100 μM) a pH 7.4 y 36 $^{\circ}\text{C}$, con un intervalo de emisión entre los 310 y 410 nm. El cálculo del C. M. E. se realizó empleando la fórmula descrita en la sección 2.1.4.1. Puede observarse un desplazamiento del C. M. E. hacia longitudes más altas, lo que indica el cambio en el ambiente que circundan a los residuos de Trp.

En lo que se refiere al aumento en la intensidad de fluorescencia extrínseca (fig. 13), y recordando que el fluoróforo extrínseco ANS presenta una dependencia con la polaridad del ambiente incrementándose conforme ésta disminuye, podemos decir que dicho aumento en la intensidad se debe a la unión del ANS a regiones hidrofóbicas de TcTIM, debido a la expansión de la estructura. Se sabe que los grupos catiónicos en las proteínas nativas se encuentran, en la mayoría de los casos, expuestos al solvente y el ANS flúorese débilmente en esas condiciones. Sin embargo, al desplegar los grupos no polares que se encuentran en el interior de la proteína y exponerlos al solvente, como ocurre en un proceso de desnaturalización parcial, la intensidad de fluorescencia del sistema aumenta considerablemente. Una posible explicación consiste en que posiblemente se favorece la interacción de los grupos no polares del ANS en contacto con las cadenas laterales hidrofóbicas de los residuos de aminoácidos que se encontraban en el interior de la proteína nativa.

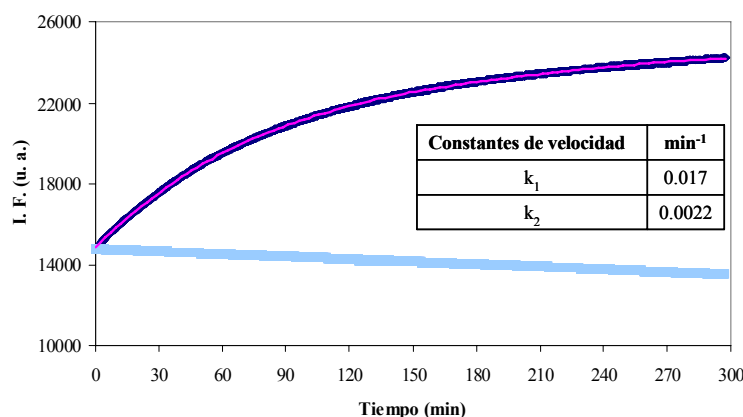


Fig. 13. Cinética de fluorescencia extrínseca de TcTIM obtenida en amortiguador de fosfatos 30 mM en ausencia (■) y presencia (■) de compuesto 8 ([C8]=100 μM pH 7.4 y 36 °C, excitando a 380 nm y midiendo la emisión a 497 nm). Se muestran en la tabla inserta las constantes de velocidad de cada etapa obtenidas del ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos exponenciales ($y = C_0 + A * ((\exp(-k_1 * t)) - 1) + B * ((\exp(-k_2 * t)) - 1)$); donde C_0 es el valor inicial de la señal, A y B son las amplitudes de los cambios en la señal, k_1 y k_2 son las constantes de velocidad en min^{-1} . La curva en magenta corresponde al trazo del modelo ajustado con la ecuación descrita anteriormente.

Generalmente, la pérdida de la estructura terciaria está asociada al rompimiento de algunas o todas las interacciones que estabilizan dicha estructura, generándose proteínas con una conformación muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente. Cuando este relajamiento en la estructura da lugar a la exposición de zonas hidrofóbicas éstas pueden interactuar formándose agregados que tienden a precipitar (Dobson, C. M., 2004).

Es importante resaltar que, en todos los casos en los que se mantuvo a TcTIM en contacto con el compuesto 8, se observó agregación después de aproximadamente noventa minutos de iniciados los experimentos. El que se haya observado un aumento exponencial en la intensidad de fluorescencia extrínseca, cuando se dejó transcurrir el experimento por más de cuatro horas, quizá tenga que ver con la formación de agregados y la difusión del ANS al interior de éstos, provocando el incremento en la intensidad de fluorescencia que sólo disminuía hasta pasadas las seis horas, momento en el que posiblemente los agregados precipitaban y por lo tanto se alejaban de la zona de detección del espectrofluorómetro (datos no mostrados).

3.3. Dicroísmo circular.

En nuestro trabajo el seguimiento de la pérdida de estructura secundaria se realizó empleando la técnica de dicroísmo circular. El registro obtenido se muestra en la siguiente figura (fig. 14).

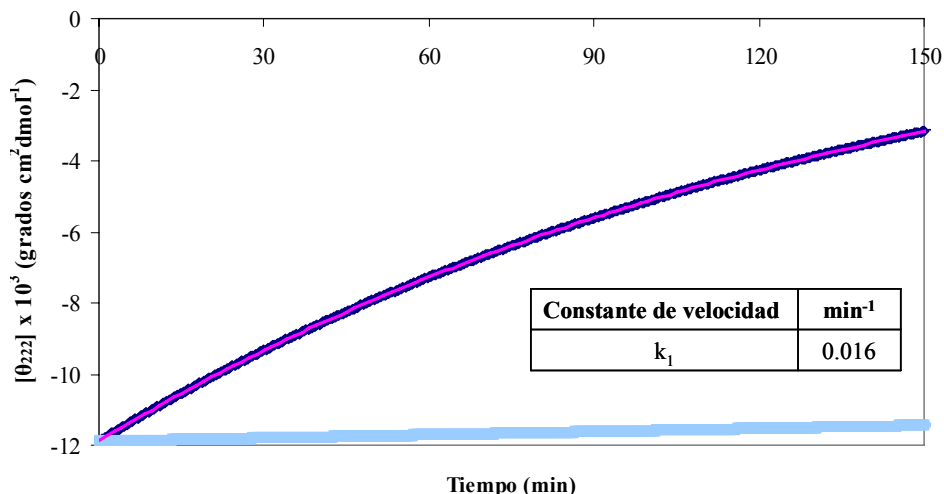


Fig. 14. Cinética de dicroísmo circular de TcTIM obtenida en amortiguador de fosfatos 30 mM en ausencia (■) y presencia (■) de compuesto 8 ([C8]=100 μM) pH 7.4 y 36 °C. Se muestran en la tabla inserta la constante de velocidad del proceso, obtenida del ajuste de los datos experimentales a un modelo de una exponencial sencilla ($y = C_0 + A*((\exp(-k_1*t))-1)$); donde C_0 es el valor inicial de la señal, A es la amplitud del cambio en la señal, y k_1 es la constante de velocidad en min^{-1}). La curva en magenta corresponde al trazo del modelo ajustado con la ecuación descrita anteriormente.

Puede apreciarse la pérdida de la estructura secundaria inducida por el compuesto 8 desde los primeros momentos de contacto. Es importante mencionar que se obtuvo un espectro de dicroísmo circular al inicio y al término de la cinética, observándose pérdida de estructura secundaria, principalmente de α -hélice (señal a 222 nm). Los espectros se muestran en la figura 15.

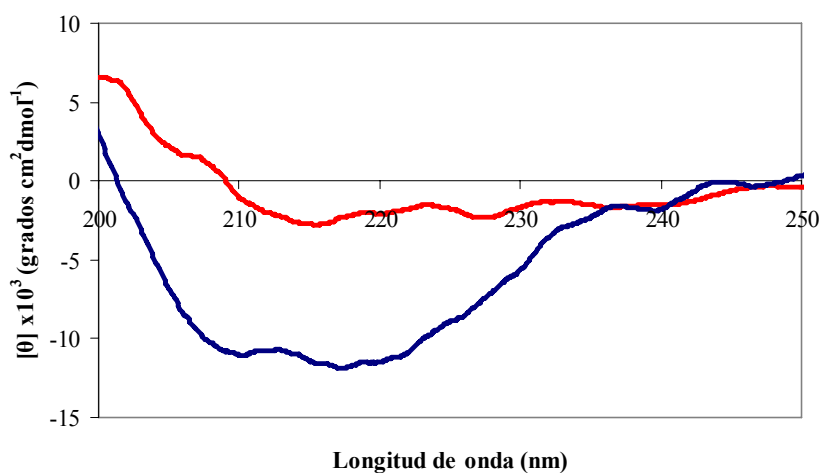


Fig. 15. Espectros de dicroísmo circular de TcTIM obtenidos en amortiguador de fosfatos 30 mM en presencia de compuesto 8 ([C8]=100 μM) a pH 7.4 y 36 °C. Se muestra el registro obtenido al inicio (azul marino) y al final (rojo) de la cinética de inhibición.

La pérdida de estructura secundaria puede atribuirse a un relajamiento de la estructura debido al rompimiento de algunos de los enlaces que se encuentran estabilizándola. Una exposición de zonas más profundas de la proteína, que presentan fluctuaciones conformacionales locales, pueden dar lugar a la pérdida completa del empaquetamiento provocando un desplegamiento significativo e inclusive la desnaturalización de la enzima. En nuestro caso, pudimos observar estructura residual, además de un proceso de agregación, lo que habla de un proceso provocado por la exposición e interacción de zonas hidrofóbicas.

Como se mencionó en la sección 1.3, datos mostrados por Téllez-Valencia y colaboradores en 2002, revelan que la inhibición de TcTIM es el resultado de la unión de dos moléculas de C8. El primer sitio de unión ha sido identificado empleando la técnica de cristalografía de rayos-X, lo que indica que no es esta molécula la que genera cambios significativos en la estructura de TcTIM, que desencadenen la inhibición de la enzima. Aparentemente, la unión de la segunda molécula es la que provoca los cambios observados a nivel de estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, expuestos en las secciones anteriores de este capítulo.

3.4. Identificación y evaluación de la accesibilidad a sitios de unión con características que favorecen la desestabilización de TcTIM.

En el proceso de inhibición de TcTIM por C8, suponemos que la segunda molécula puede unirse en distintos sitios de la estructura que presenten cavidades, pero que la magnitud del efecto estará en función del tipo de aminoácidos que estén constituyendo dicha cavidad. La unión a sitios que contengan aminoácidos con mayor propensión a desestabilizar la estructura -debido por ejemplo, a su tendencia de agregar o a una alta probabilidad de formar parte de regiones con propensión a sufrir cambios locales de plegamiento/desplegamiento-, provocará un mayor efecto. A partir de la estructura pueden determinarse cuáles son estos residuos, empleando dos herramientas computacionales llamadas TANGO (<http://tango.embl.de/>) y COREX-Best (www.hbcg.utmb.edu/hilser/corexbest.htm), respectivamente. A continuación se presentan los resultados de la identificación de zonas con dichas características, empleando estos dos servidores disponibles en la Internet.

En el caso de la predicción de las regiones con tendencia a agregar, la salida del servidor TANGO nos da una idea de la propensión que presenta cada uno de los residuos a formar agregados. El algoritmo empleado por dicho servidor identifica las regiones β -agregantes de una secuencia de proteína considerando que, estructuralmente, las regiones de nucleación suelen encontrarse enterradas y con sus puentes de hidrógeno satisfechos. Se sabe que la agregación de proteínas es un proceso inespecífico causado por la formación de contactos no nativos entre proteínas parcialmente desplegadas. Recientemente ha sido postulado que la formación de una hoja β intermolecular, la cual inicia con una secuencia específica de aminoácidos con alta hidrofobicidad, actúa como un núcleo de agregación (Linding, R. y col., 2004, Fernández-Escamilla, A. M. y col., 2004). TANGO detecta, basado en la secuencia, las regiones que son ricas en residuos hidrofóbicos alifáticos (Val, Leu, Ile) y en residuos aromáticos (Phe, Tyr, Trp); identificando además los residuos que flanquean las secuencias, da un puntaje adicional si éstas son ricas en residuos cargados (Asp, Glu, Lys, Arg) o en prolina (Pro).

La siguiente tabla es un resumen de los resultados obtenidos (tabla 3).

Tabla 3. Residuos con tendencia a agregar obtenidos empleando el servidor TANGO (<http://tango.embl.de/>). En negritas los residuos con mayor tendencia de agregación predicha.

Residuos (estructura secundaria)	Residuos que presentan agregación potencial
38-41 (hébra β)	V38,Q39,C40,V41
79-84 (hélice α)	V79,S80,L81,Q82,I83,L84
90-95 (hébra β)	S90,W91,V92,V93,L94,G95
122-129 (hébra β)	F122,H123,V124,I125,V126,C127,V128,G129
140-153 (hélice α)	T140, A141, A142, V143, V144, L145, T146, Q147, L148, A149, A150, V151, A152, Q153
158-174 (hélice α)	E158, A159, W160, S161, R162, V163, V164, I165, A166, Y167 , V170, W171, A172, I173, G174
203-207 (hélice α)	I203, A204, A205, Q206, L207
229-237 (hébra β)	I229, N230, G231, F232, L233, V234, G235, G236, A237

La exposición e interacción de estas zonas probablemente desencadenen una serie de eventos que conlleven al colapso de la estructura y formación de agregados en la solución de proteína. Cabe mencionar que de estos residuos no todos se encuentran en cavidades en la superficie, de hecho la mayoría de ellos se encuentran hacia el interior de la proteína (zonas hidrofóbicas).

Los residuos que se encuentran en las posiciones 160 a 167, son accesibles a través de una de las cavidades detectadas por CASTp (cavidad 75) (datos mostrados más adelante) y es probable que su exposición por efecto de la unión del compuesto 8 desencadene el proceso de desplegamiento que finalmente llevara a TcTIM a desnaturalizarse. En la siguiente imagen se muestra la localización espacial de los residuos detectados por TANGO con tendencia a agregar (fig. 16).

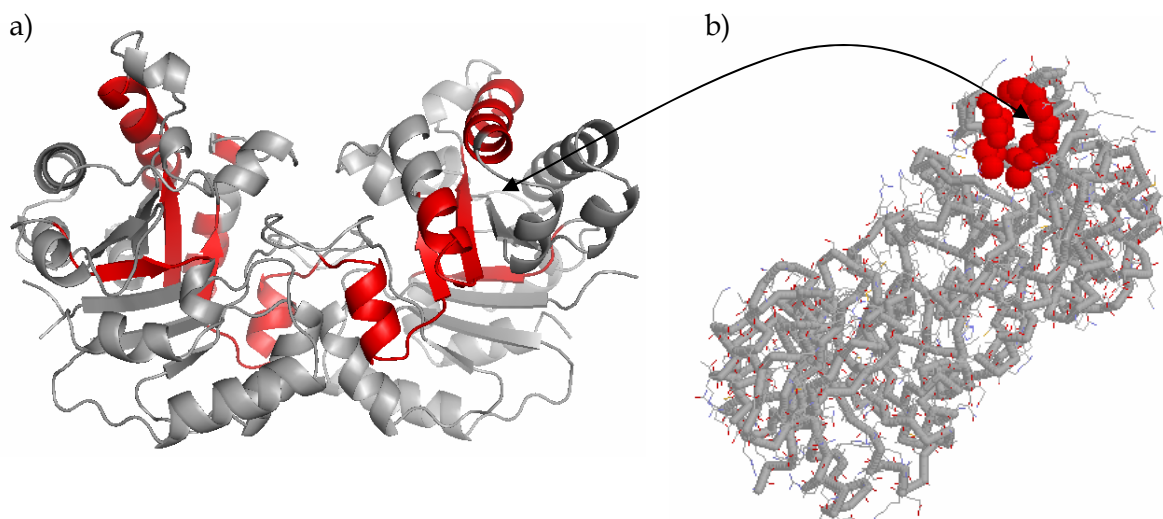


Fig. 16. Localización espacial de los residuos potencialmente propensos a formar agregados detectados por el servidor TANGO empleando el visualizador RasMol 2.7.2.1.1. En rojo las hebras β y hélices α que contienen los residuos con mayor tendencia de agregación (a) y a los que pueden accederse y afectarse al interactuar con una de las cavidades con mayor área predicha por CASTp (b).

Es importante resaltar que las tres hebras β del interior del barril de TIM, representan las secuencias de residuos que fueron localizadas cerca de una de las cavidades con mayor área para alojar ligandos. La exposición particular de estas hebras β y su posterior desnaturalización podría dar lugar al inicio de un proceso de pérdida de estructura secundaria.

Con esta información nos dimos a la tarea de evaluar las zonas más inestables de la estructura de TcTIM, empleando para ello el servidor COREX-Best, y éstas coincidieron, en un alto porcentaje, con las zonas que están constituidas por residuos con alta tendencia de agregación y que son fácilmente accesibles a través de algunas de las cavidades detectadas tanto por CASTp.

En la figura 17 (a y b) se muestran los resultados obtenidos por residuo de aminoácido, observándose que la región comprendida entre los residuos 67 y 90 es aquella que presenta menor estabilidad, existiendo una dependencia directa de la probabilidad de desplegamiento con el valor de la constante de estabilidad (Hilser, V. J. y col., 2006, Liu, T. y col., 2006, Whitten, S. T. y col., 2006).

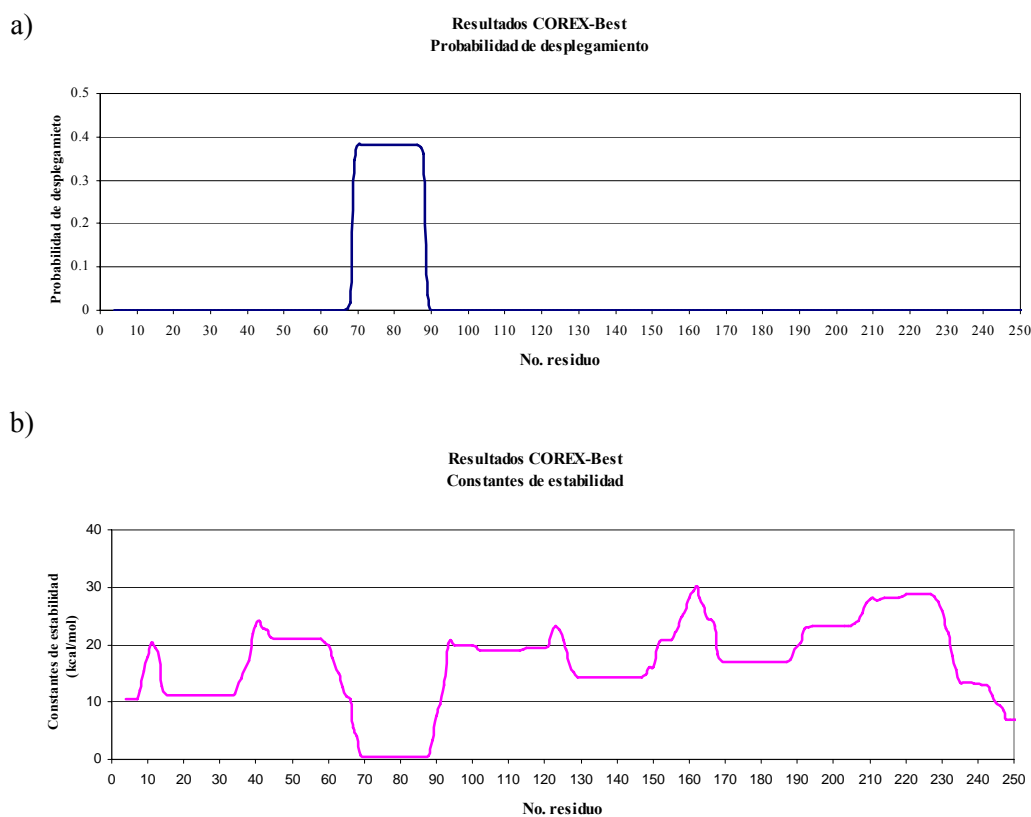


Fig. 17. a) Probabilidad de desplegamiento de los residuos de aminoácidos que constituyen a TcTIM (azul), determinada empleando el servidor COREX-Best (<http://www.hbcg.utmb.edu/hilser/corexbest.htm>). Se observa que los residuos del 67 al 90 (y que forman parte de la hebra β_3 y de la hélice α_4 , son los que presentan mayor probabilidad de desnaturalizarse). b) Los valores de las constantes de estabilidad (magenta) se encuentran relacionados con la tendencia de los residuos a desplegarse.

Las proteínas, bajo condiciones nativas, sufren fluctuaciones conformacionales de pequeña y gran escala, que en conjunto definen el ensamble del estado nativo (Hilser, V. J. y col., 1996), COREX-Best nos permite modelarlo al generar un gran número de diferentes estados conformacionales, a partir de un grupo de unidades de plegamiento predefinidas (Hilser, V. T. y col., 1997; Hilser, V. T. y col., 1997).

Un tratamiento posterior permite determinar cuales de estas unidades tendrán una mayor probabilidad de sufrir desplegamiento, a partir del cálculo de su constante de estabilidad. Puesto que investigaciones recientes han revelado que el estado nativo es un conjunto conformacional definido por múltiples formas parcialmente desplegadas (Cremades, N. y col., 2006) probablemente la unión del C8 a sitios cercanos a zonas que sufren reacciones de plegamiento/desplegamiento traerá como consecuencia la desestabilización de la estructura y el colapso funcional de la enzima.

Como se ha mencionado, el acceso a estas zonas inestables es posible a través de una serie de cavidades presentes en la superficie de TcTIM. Se sabe que aunque la conformación nativa de las proteínas se encuentra bien empacada, éstas contienen numerosas cavidades que juegan un papel clave en el alojamiento de moléculas pequeñas que permiten cambios conformacionales en la estructura. A partir de las coordenadas tridimensionales de una proteína es posible identificar estas cavidades. Una herramienta computacional disponible para llevar a cabo esta tarea es CASTp, ya que localiza y mide las cavidades accesibles superficiales, así como las cavidades inaccesibles interiores, en proteínas y otras moléculas (Liang, J. y col., 1998). Al emplear este algoritmo, logramos determinar que existen al menos 77 cavidades presentes en TcTIM y que a través de la cavidad 75 es posible acceder a las zonas definidas como inestables (fig. 20). Adicionalmente, utilizamos el algoritmo de CASTp para hacer una primera aproximación del posible segundo sitio de unión para el C8 en TcTIM (datos mostrados más adelante).

3.4.1. Identificación de los modos de vibración que presenta la estructura de TcTIM y su implicación en la exposición de sitios de unión.

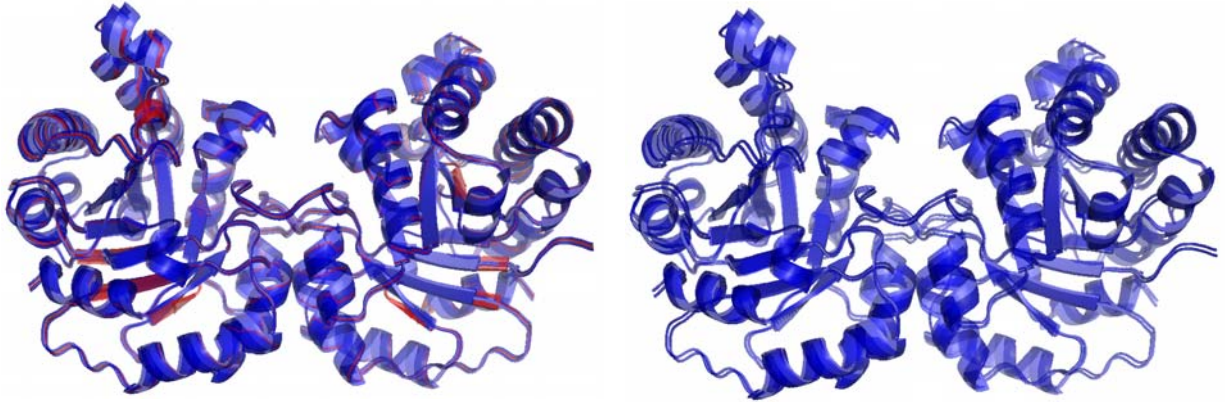
La conformación de una enzima no debe ser concebida como una estructura rígida, de hecho, las propiedades dinámicas de las macromoléculas juegan un papel trascendental en distintas funciones biológicas incluyendo la catálisis, la regulación y la actividad (Tama, F., 2003). Recientemente ha sido reconocido que los movimientos de las proteínas pueden ser modelados usando modos normales de vibración de baja frecuencia. En este sentido, Yves-Henri Sanejouand y colaboradores, han desarrollado una herramienta computacional, denominada Elnémo, que permite estimar los modos normales de vibración de baja frecuencia de una proteína a partir de su estructura tridimensional (Tama, F. y col., 2000; Tama, F. y col., 2001; Delarue, M. y col., 2002).

Debe destacarse que un uso importante de esta herramienta es la identificación de los cambios conformacionales asociados a la movilidad natural de la molécula. Este algoritmo nos permite estimar los modos normales de vibración de TcTIM, pudiéndose identificar de manera aproximada los movimientos que presenta la enzima. La salida del servidor está constituida por un conjunto de modos, cada uno constituido de una serie de modelos (11), que incorporan los movimientos identificados y que, al visualizarse en conjunto, dan una idea de las zonas que sufren desplazamientos dentro de la proteína.

Al enviar al servidor de Elnémo el archivo PDB de TcTIM (1TCD), la salida nos indicó que el posible movimiento interno que facilita el efecto del compuesto 8, involucra directamente a la región interfacial y una zona de hélices que da acceso a tres hebras β constituidas por residuos con alta tendencia a agregar detectadas con el servidor TANGO (modo 7 y 9) (fig. 18). Cabe resaltar que en el cálculo que realiza Elnémo, las amplitudes de las vibraciones no pueden estimarse, por lo que se asigna un valor razonable pero arbitrario. Debido a esto, los archivos PDB que fueron considerados para análisis posteriores, fueron los correspondientes a aquellos que con respecto a la estructura cristalográfica, presentaban un valor de RMSD de 0.293

(modelos 5 y 7) y de 0.895 (modelos 3 y 9), valores que no representaban desplazamientos estructurales poco probables de suceder.

(a)



(b)

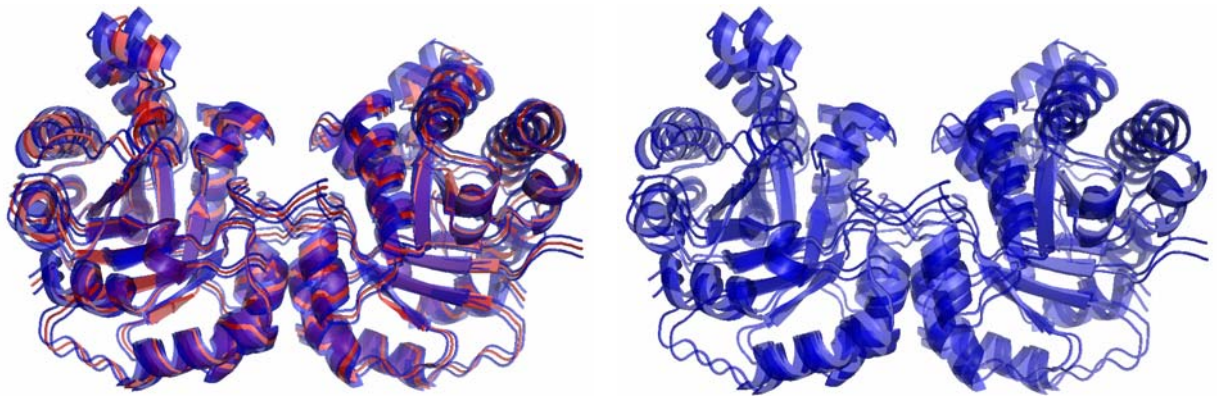


Fig. 18. Salida del servidor ElNémo (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/elnemo/index.html>) para el cálculo de los modos normales de vibración (MNV) de TcTIM. Se muestra únicamente el modo 7, el cual muy probablemente se encuentra implicado en la exposición de sitios de unión a ligandos en TcTIM. Cada modo está constituido por 11 modelos, los cuales son acoplados para generar la animación del movimiento de la proteína. Aquí únicamente se muestran los modelos (a) 5 y 7 y (b) 3 y 9. En rojo la estructura que corresponde a las coordenadas de TcTIM (ID PDB 1TCD), en azul las estructuras correspondientes a las coordenadas de los modelos obtenidos con ElNémo.

El conocimiento de la estructura no es suficiente para comprender y controlar la función proteica, sobretodo considerando que la función es una propiedad dinámica. Desde este punto de vista, tratar de identificar las zonas que presentan fluctuaciones en la estructura de la proteína puede proporcionar información que va desde el conocimiento de los factores que generan la función, hasta la identificación de sitios potenciales de unión a ligandos pequeños, que no se encuentran expuestos permanentemente en la estructura de las biomoléculas.

Las funciones biológicas de las proteínas, son controladas generalmente por movimientos cooperativos o fluctuaciones correlacionadas que involucran regiones grandes de la estructura (Horiuchi, T. y col., 1991, García, A. E. y col., 1996, Frauenfelder, H. y col., 1998, Hinsen, K. y col., 1998). Diversos estudios han mostrado la validez de las aproximaciones que emplean el análisis de los modos normales de vibración, para extraer información útil acerca de movimientos

de larga escala, de proteínas cercanas a su conformación de estado nativo (Noguti, T. y col., 1982, Atilgan, A. R. y col., 2001).

En este sentido, se han desarrollado una serie de herramientas computacionales (realistas físicamente), para realizar una exploración eficiente de los movimientos colectivos de sistemas proteicos (Echols, N. y col., 2003, Suhre, K. y col., 2004, Waco, H. y col., 2003 y 2004, Cao, Z. W. y col., 2004, Yang, L. W. y col., 2005). Un modelo recientemente propuesto, conocido como GNM, de las siglas en inglés de Gaussian Network Model, está basado en un análisis de la densidad de empaquetamiento local y de topología de contactos de enlace y de no enlace, en una estructura dada (Bahar, I. y col., 1997; Haliloglu, T. y col., 1997). Tanto los movimientos lentos (globales), como los rápidos (locales), son dilucidados por la descomposición de las dinámicas vibracionales. Los modos lentos proporcionan información sobre los movimientos cooperativos de dominios grandes (relevantes en el proceso del reconocimiento y la unión), así como en la identificación de regiones que se mantienen sin cambio (“estacionarias”) durante el movimiento colectivo de la macromolécula. Estas últimas, actúan como dominios “bisagra”, limitando los movimientos colectivos experimentados por dominios a los que se encuentran conectados. Las regiones “bisagra”, juegan un papel activo en la modulación de la actividad catalítica. Por otro lado, los modos rápidos indican la posición de los residuos confinados hacia el interior de la estructura terciaria; estos se relacionan generalmente con el núcleo de plegamiento y/o con los residuos conservados, por lo que su mutación provocaría un efecto disruptivo sobre la estabilidad y función de la biomolécula (Demirel, M. C. y col., 1998). Distintas variaciones al modelo de GNM permiten acceder a datos que van desde el cálculo de los movimientos colectivos de grandes zonas de la proteína (servidor: ElNémo, citado anteriormente), hasta datos de vibraciones experimentadas por átomo en la estructura (servidor: MoViES, <http://ang.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prog/norm.pl>).

En nuestro caso, el empleo de estas herramientas permitió identificar zonas de la estructura de TcTIM que sufren movimientos que permiten el acceso a zonas constituidas por residuos con tendencia a agregar (fig. 16) o a zonas de baja estabilidad (fig. 17). Como mencionamos anteriormente, al emplear el servidor ElNémo, en el que los movimientos son expresados como una superposición de modos de diferentes frecuencias, se encontró que los modos 7 y 9 permitirían el acceso a zonas que mantienen la estabilidad estructural de TcTIM, debido a la magnitud de los movimientos colectivos implicados.

En el caso del modo 7, se observaron fundamentalmente tres movimientos que generaron modificaciones a nivel de estructura secundaria. Los residuos que van de la Phe61 a la Ala65 y de la Arg208 a la Gly212, pierden momentáneamente su carácter de hebra β , y los residuos que van de la Gly236 a la Leu239, pierden el carácter de hélice α . Estos cambios en la estructura, producto de las vibraciones de los residuos de aminoácidos que forman las estructuras secundarias, originan la exposición de áreas de acceso a sitios que en otro momento se encuentran obstruidas por las cadenas laterales de los aminoácidos. Si consideramos que existen efectos de propagación a lo largo de la estructura de las macromoléculas, estos movimientos podrían alcanzar zonas involucradas, por ejemplo, en la estabilidad global de las biomoléculas. Los residuos 61-65 y 208-212, están cercanos en el espacio a un alto porcentaje de residuos con alta tendencia de agregación, detectados con el servidor TANGO. Los residuos 236-239 se encuentran localizados hacia la superficie de la proteína, éstos al perder su carácter de hélice α permitirían un fácil acceso de moléculas del solvente hacia el sitio activo de TcTIM (fig. 19a).

El modo 9 se caracteriza por presentar tres movimientos que involucran residuos que se encuentran constituyendo estructuras secundarias del tipo hélice α , éstos son los residuos que van de la Thr28 a Ala31, de la Ser97 a la Tyr102, y de la Gly236 a la Leu239. En los tres casos, los

movimientos vibracionales ocasionan la pérdida momentánea del carácter de hélice α . Puede apreciarse que únicamente un bajo porcentaje de los residuos involucrados en los movimientos del modo 9 se encuentra cercano en la estructura, a residuos inestables (fig. 19a).

Las observaciones anteriores permiten pensar que el modo que podría auxiliarnos en la descripción molecular de lo que experimentalmente observamos, es el modo 7. En éste, la perturbación de los ambientes locales, debido a los movimientos colectivos que exponen las estructuras constituidas por residuos con alta tendencia a agregar, desembocan en la inestabilización de la macromolécula. Durante los ensayos *in vitro* se observó agregación (proceso que implica necesariamente la interacción de zonas hidrofóbicas), siendo más marcada cuando la enzima permanecía en condiciones que favorecerían su desestabilización. Posiblemente, los movimientos propios de la enzima favorecen la entrada de solvente a zonas hidrofóbicas, teniendo consecuencias a nivel local, que al propagarse hacia zonas más internas desencadenan un proceso de desnaturalización con formación de agregados. Adicionalmente podemos observar que los residuos involucrados en los movimientos del modo 7 también se encuentran constituyendo algunas de las cavidades presentes en TcTIM (identificadas con el servidor CASTp), de tal manera que los movimientos de la enzima podrían estar exponiendo sitios de unión en TcTIM, que no se encuentran accesibles en todo momento y que podrían alojar ligandos pequeños (fig. 19b).

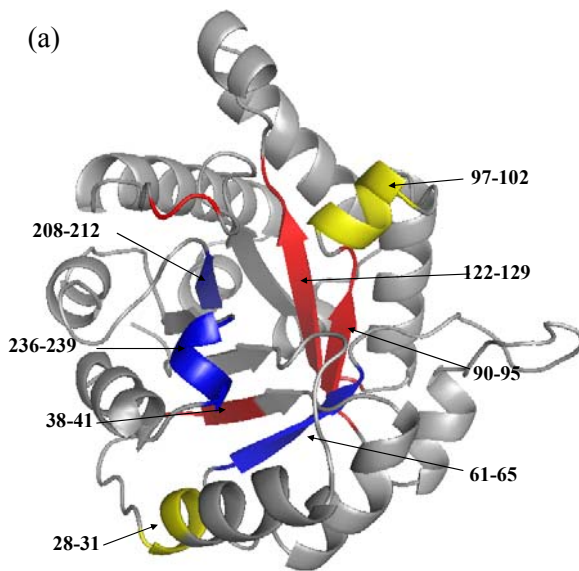
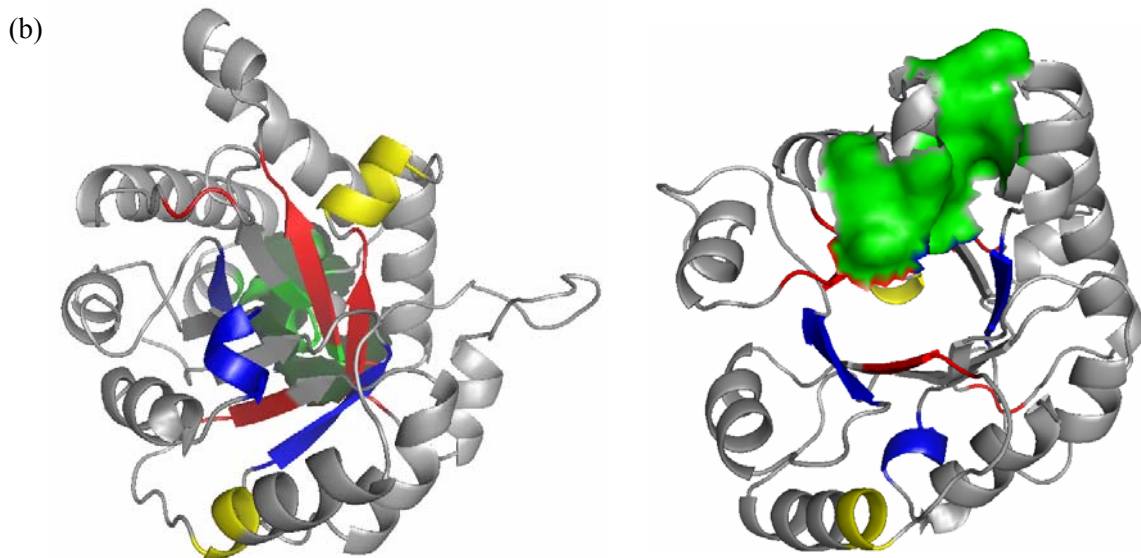


Fig. 19. Localización espacial de los residuos involucrados en los movimientos que generan modificaciones a nivel de estructura secundaria en TcTIM y que podrían estar participando en la exposición del segundo sitio de unión a C8, éstos fueron identificados con el servidor Elnémo; en azul, el modo 7 (F61 a A65, R208 a G212 y G236 a L239) y en amarillo, el modo 9 (T28 a A31, S97 a Y102, y G236 a L239). (a) Se aprecia que los residuos 61-65 y 208-212, están cercanos en el espacio a un alto porcentaje de los residuos con alta tendencia de agregación, detectados con el servidor TANGO (en rojo). Los residuos 236-239 se encuentran localizados hacia la superficie de la proteína, éstos al perder su carácter de hélice α permitirían un fácil acceso de moléculas del solvente hacia el sitio activo de TcTIM. En (b) se observa que una parte de los residuos involucrados en los movimientos del modo 7 también se encuentran constituyendo la cavidad 75 (en verde), identificada con el servidor CASTp y el conjunto de programas de MOE. Imágenes generadas empleando el visualizador Pymol v0.99.



La determinación de la magnitud de las vibraciones por átomo, proporciona elementos para la identificación de los residuos que contribuyen mayoritariamente a la energía cinética. Al utilizar el servidor MoViES (<http://ang.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prog/norm.pl>), se identificaron las frecuencias de las vibraciones por átomo de los residuos involucrados en el modo 7 (F61 a A65, R208 a G212 y G236 a L239). La tabla 4 presenta los resultados correspondientes a los átomos que constituyen los residuos involucrados en el modo 7 de vibración. Se resaltan en rojo los átomos que contribuyen en mayor medida a la energía cinética por residuo.

Puede observarse que los aminoácidos no polares como la Leu y la Ile, contribuyen con un mayor porcentaje a la función que describe la energía cinética; posiblemente, la longitud de sus cadenas laterales les confiere mayor probabilidad de movimiento debido a las pocas interacciones con la cadena principal de la molécula y a las escasas restricciones al movimiento por parte de los residuos vecinos. No sucede lo mismo con los átomos que constituyen a los residuos con cadenas laterales más cortas, en las que la contribución de los átomos es, en general, menor.

Tabla 4. Determinación de las vibraciones por átomo, de los residuos involucrados en el modo 7 de vibración de TcTIM. Las últimas dos columnas muestran la frecuencia de vibración y la contribución de ésta a la energía cinética por residuo.

Cadena	Residuo	Átomo	Frecuencia de vibración (cm ⁻¹)	% Contribución a la función de la energía cinética
B	Phe61	O	53.6	5.74
B	Phe61	CE1	31.7	2.53
A	Arg208	O	64.2	3.74
B	Arg208	O	68.1	2.62
B	Arg208	NH1	48.4	8.18
B	Arg208	NH2	34.2	1.96
B	Arg208	CD	32.1	2.21
A	Ile209	CG1	97.2	29.74
A	Ile209	CG1	95.4	11.14
A	Ile209	CG2	97.2	4.53
A	Ile209	CG2	48.4	3.77
A	Ile209	CD1	48.4	4.15
A	Ile209	CD1	33.6	5.69
B	Ile209	CG1	97.5	19.82
B	Ile209	CG1	97.1	27.47
B	Ile209	CG2	97.1	4.59
B	Ile209	CG2	51.5	4.62
B	Ile209	CD1	51.5	4.44
B	Ile209	CD1	34.7	10.91
A	Leu210	CD1	66.1	2.52
A	Leu210	CD2	45.7	3.84
A	Leu210	CD2	41.4	5.15
B	Leu210	CD1	45.8	4.93
B	Leu210	CD1	40.1	3.63
B	Leu210	CD2	40.1	11.88
B	Leu210	CD2	37.4	3.74

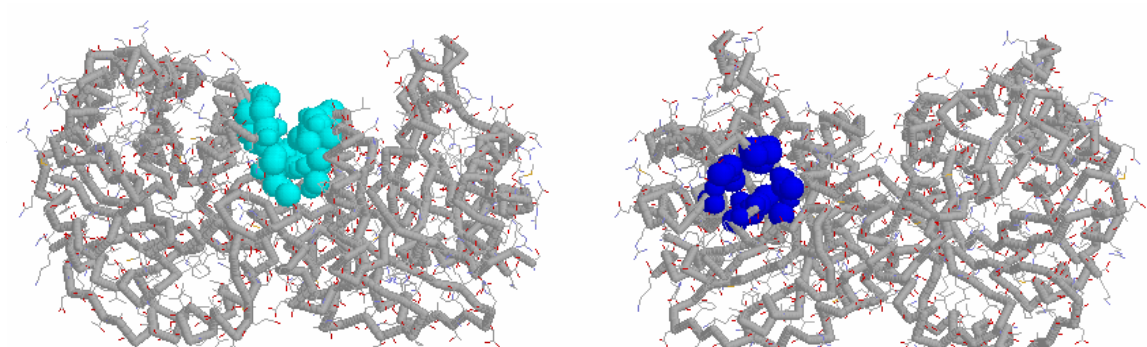
A	Tyr211	O	78.6	2.17
A	Tyr211	CE1	37.0	2.76
A	Tyr211	CD1	37.3	1.98
B	Tyr211	O	70.1	2.73
B	Tyr211	O	66.6	2.08
B	Tyr211	CD2	30.3	4.23
A	Gly212	O	48.4	3.41
A	Gly212	O	48.2	6.95
A	Gly212	O	43.6	4.30
B	Gly212	O	54.4	5.42
B	Gly212	O	43.5	3.04
B	Gly212	O	33.2	4.41
A	Gly236	O	93.8	3.80
A	Gly236	O	93.3	2.45
A	Gly236	O	90.5	4.22
B	Gly236	O	98.8	4.32
B	Gly236	O	93.6	3.26
A	Ala237	O	73.3	7.37
A	Ala237	O	50.4	5.58
B	Ala237	O	98.8	3.71
B	Ala237	CB	48.9	3.54
B	Ala237	CB	31.1	3.93
A	Ser238	O	94.5	10.21
A	Ser238	O	91.8	5.52
A	Ser238	OG	73.3	6.52
B	Ser238	O	95.4	4.63
B	Ser238	O	89.3	3.88
B	Ser238	OG	95.5	3.59
B	Ser238	OG	61.0	7.0
A	Leu239	CD1	47.0	10.79
A	Leu239	CD1	37.0	4.68
A	Leu239	CD2	41.5	12.66
A	Leu239	O	37.0	6.80
B	Leu239	CD1	48.9	14.38
B	Leu239	CD2	42.4	33.24
B	Leu239	CG	42.4	3.70
B	Leu239	O	38.9	10.59
B	Leu239	O	36.5	5.29

Es importante resaltar que varios átomos pueden estar vibrando a una misma frecuencia y tener contribuciones distintas a la función que describe la distribución de la energía cinética.

Considerando los datos reportados por Téllez-Valencia, A. y col. (Téllez-Valencia, A. y col., 2002) y los obtenidos en la salida de Elnémo, es viable pensar que el compuesto 8 se une,

además del sitio localizado en la región interfacial, a un segundo sitio cuya accesibilidad puede ser facilitada por los movimientos propios de la proteína, y que es expuesto una vez que se ha unido la primera molécula. Los resultados sugieren que los movimientos intrínsecos de TcTIM facilitan, una vez que se han unido las dos moléculas necesarias para inactivarla, la pérdida de compactación de la estructura cuaternaria y probablemente el desempaquetamiento de cada uno de los monómeros de TcTIM.

Al mandar los archivos en formato PDB de los modelos 3 y 5, del modo 7 de vibración (obtenido de la salida de Elnémo) a CASTp, logramos determinar que existen 78 cavidades en la estructura de TcTIM con tamaño suficiente para alojar ligandos. Descartando las cavidades localizadas hacia zonas muy inaccesibles en la estructura, igual que aquellas que presentaban un volumen muy pequeño con respecto al de C8, el número se redujo a 13. De éstas, consideramos sólo cuatro para comparaciones posteriores. La cavidad 78 (localizada en la región interfacial, área 456.9 \AA^2 , volumen 638 \AA^3) contiene a los tres residuos de aminoácido que interactúan con la primera molécula del compuesto 8 que se une, la cavidad 75 da acceso a las hebras constituidas por residuos con tendencia a agregar, y dos más, las cavidades 76 y 77, dan acceso a los sitios activos (fig. 20).



Por otro lado, se ha estudiado el sitio de unión de la primera molécula del compuesto 8, tanto por métodos experimentales (Téllez-Valencia, A. y col., 2004) como computacionales (Espinosa-Fonseca, L. M. y col., 2004; Espinosa-Fonseca, L. M. y col., 2005). Este compuesto interactúa con el C ζ de Phe75_A (el cual está localizado a 4.7 Å de distancia de los anillos del C8), el grupo OH de Tyr102_B (localizado a 3.4 Å de distancia del S2 del C8) y con el N ϵ de Arg71_A (localizado a 3.3 Å de distancia del C5 del C8) en la cavidad 78 (ver fig. 4, sección 1.3). Como se ha mencionado, el segundo sitio de unión no ha podido identificarse debido, probablemente, a que esta unión desnaturaliza a TcTIM y evita la cristalización de la proteína, lo cual limita su análisis por difracción de rayos-X.

3.4.2. Determinación de los residuos estabilizadores de la región interfacial.

Puesto que el primer sitio de unión se encuentra localizado en la región interfacial, y dado que sabemos que en enzimas multiméricas las regiones interfaciales se encuentran estabilizando en un alto porcentaje a la macromolécula, el dilucidar el papel que juegan cada uno de los residuos de dicha región nos permitirá correlacionar el efecto de la unión de C8 con la magnitud de los eventos producidos, así como a su propagación a zonas distantes de la proteína.

En TcTIM, los residuos que forman la región interfacial son claves en la estabilidad de la enzima, aunque se tiene conocimiento de que no todos contribuyen con la misma intensidad (Pérez-Montfort, R. y col., 1999, Zomosa-Signoret, V. y col., 2003). Al emplear el servidor ROBETTA (<http://robetta.bakerlab.org>), se determinaron cuáles de las cadenas laterales en la región interfacial favorecen la estabilidad y cuáles no. La información de entrada para el cálculo es la estructura tridimensional del complejo proteína-proteína, la salida es una lista de “sitios calientes” o cadenas laterales que se predicen como desestabilizantes del contacto interfacial cuando son mutadas por alanina (Ala) (Kim, D. E. y col., 2004).

Haciendo la analogía de un complejo proteína-proteína con una enzima dimérica, se puede tener información de los residuos de la región interfacial que estabilizan al dímero. Se envía al servidor la estructura cristalográfica de éste, definiéndose cada uno de los monómeros como una proteína del sistema; la información proporcionada es calculada de manera similar al caso del complejo proteico. Se considera que un cambio en la energía libre de más de 1 kcal/mol lo desestabiliza, es decir, el residuo que fue sustituido por Ala es necesario para mantener la estabilidad. Cuando la mutación por Ala genera valores de energía, iguales o por debajo de -0.8 kcal/mol, se toma a esos residuos como desestabilizadores de la estructura, y se considera que la sustitución por Ala favorece la estabilidad (Kortemme, T. y col., 2004; Kortemme, T. y col., 2002). Al enviar el archivo de TcTIM, depositado en el PDB, se obtuvo la predicción de los residuos de la región interfacial que estabilizan al dímero (tabla 5, fig. 20).

Tabla 5. Residuos de aminoácidos predichos como estabilizantes de la región interfacial de TcTIM, según el algoritmo de Alanine Scanning. En rojo los residuos que se encuentran interactuando con la molécula de compuesto 8 (Téllez-Valencia, A., 2004), en azul los residuos que se predicen como los más importantes para la estabilidad del dímero. Abreviaturas: No. Res., numeración de los residuos del archivo PDB, $\Delta\Delta G$, cambio predicho en la energía libre de unión debido a la mutación por Ala.

Cadena	No. Res.	Residuo	$\Delta\Delta G$	Cadena	No. Res.	Residuo	$\Delta\Delta G$
A	12	Asn	1.78	-	-	-	-
A	14	Lys	1.18	B	14	Lys	1.34
-	-	-	-	B	18	Ser	-0.06
A	19	Glu	0.20	-	-	-	-
A	45	Thr	1.78	B	45	Thr	1.92
A	46	Phe	1.21	B	46	Phe	1.14

A	47	Leu	3.24	B	47	Leu	3.21
A	48	His	2.00	B	48	His	2.10
A	66	Gln	1.42	B	66	Gln	1.47
A	75	Phe	0.86	B	75	Phe	4.17
A	76	Thr	1.52	B	76	Thr	1.35
A	83	Ile	1.87	B	83	Ile	1.88
A	87	Tyr	1.17	B	87	Tyr	1.44
A	96	His	0.39	B	96	His	1.21
A	98	Glu	3.80	B	98	Glu	2.03
A	99	Arg	2.77	B	99	Arg	2.12
A	102	Tyr	1.33	B	102	Tyr	1.32

De los valores de $\Delta\Delta G$ (cambio predicho en la energía libre de unión debido a la mutación por alanina) puede observarse que el ácido glutámico 98 y la leucina 47 de la cadena A (Glu97_A y Leu47_A, respectivamente), así como la fenilalanina 75 y la leucina 47 de la cadena B (Phe75_B y Leu47_B, respectivamente), se predicen como los residuos de la región interfacial más importantes para la estabilidad del complejo de TcTIM. Es probable que las interacciones que establecen estos residuos contribuyan a la estabilidad del dímero. Cabe resaltar que dos de los residuos que se encuentran interactuando con el compuesto 8 aparecen dentro de los que estabilizan la región interfacial del dímero (Phe75_B y Tyr102_A). Probablemente la unión de la primera molécula de compuesto 8 que se une, facilita la interacción de la segunda y los efectos de ésta se propagan a zonas distantes de la proteína.

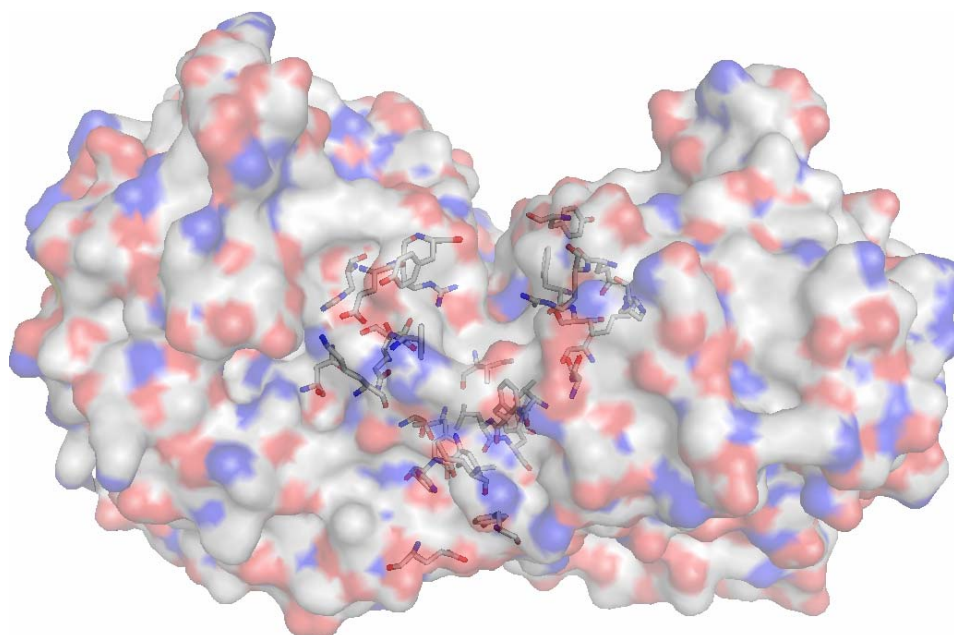


Figura 21. Localización espacial de los residuos de la región interfacial de TcTIM que estabilizan al dímero de TcTIM. Se muestran únicamente aquellos que fueron predichos como estabilizadores de la región interfacial por el servidor ROSETTA. Es interesante hacer notar que no sólo Cys15 contribuye a la estabilidad del dímero, papel atribuido básicamente por los estudios estructurales en los que se observa que este residuo es rodeado por el asa 3 de la otra subunidad, sino que otros residuos pueden ser esenciales para lograr la estabilización de la enzima. La imagen fue generada empleando el programa Pymol v0.99.

A manera de comparación, y con la finalidad de validar los resultados arrojados por ROBETTA, centraremos nuestra atención en el residuo Glu19, el primer residuo de la hélice 1 de TcTIM. El cambio por Ala origina un valor de $\Delta\Delta G$ de 0.20 kcal/mol. En el caso de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), se sabe que en el residuo correspondiente a esta posición (Gln18), el N amida está unido por medio de un puente de hidrógeno al oxígeno del enlace peptídico entre Asp85 y Phe86 de la hélice 3 de la otra subunidad, y que a su vez el oxígeno del grupo carboxílico de la Asp85 está también unido a través de un puente de hidrógeno al N en el enlace peptídico entre Ser17 y Gln18 (Maldonado, E. y col., 1998). Tal cantidad de interacciones son estabilizadoras de la región interfacial, por lo que ROBETTA asigna un valor de $\Delta\Delta G$ de 1.48 kcal/mol. En el caso de TcTIM estas interacciones están ausentes, por lo que en el caso de TbTIM, los valores determinados por ROBETTA asignan correctamente la importancia de Gln18, Asp85 y Phe86 a la estabilidad del complejo; así como el papel que juega el Glu19 en la región interfacial de TcTIM cuya cadena lateral está más expuesta al solvente. En las respectivas estructuras tridimensionales, esta porción de la región interfacial es más abierta en TcTIM que en TbTIM (Reyes-Vivas, H. y col., 2001) (fig. 22).

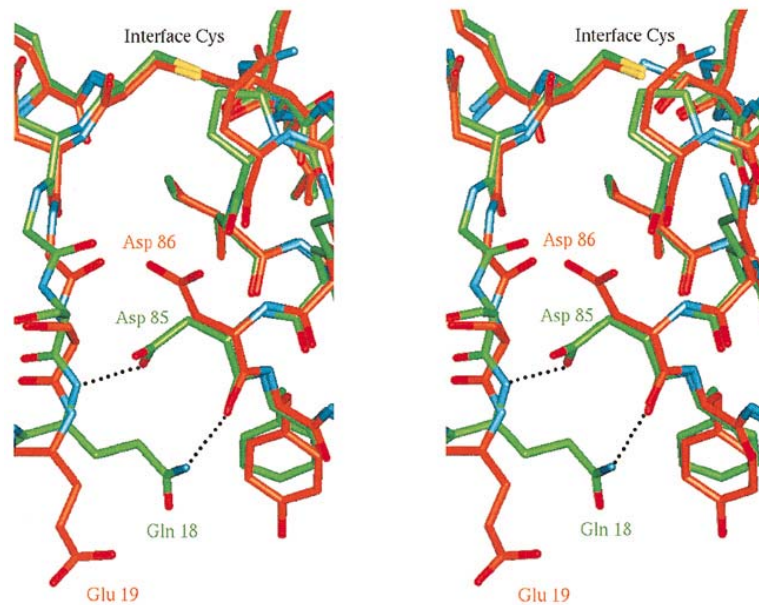


Figura 22. Vista de la región entre el loop 1 en el monómero B y una porción de la hélice 3 de la subunidad vecina. Se muestra una comparación entre TcTIM y TbTIM (triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*), las cuales se muestran en naranja y verde, respectivamente (tomado de Maldonado, E. y col., 1998).

La Cys15 es uno de los tres residuos que se encuentran totalmente expuestos en el monómero y completamente ocultos en el dímero, los otros dos son Leu47_A y Thr76_A que se encuentran en el loop 2 y loop 3, respectivamente. Alanine Scanning no detecta la importancia de Cys15 en la estabilización de la región interfacial de TcTIM, lo cual es de llamar la atención, ya que se cuenta con resultados experimentales *in vitro* que concluyen sobre la importancia de este residuo en el mantenimiento de la estabilidad de la enzima. Sin embargo, asigna valores altos de $\Delta\Delta G$ a los dos últimos residuos, lo que sugiere que ambos son esenciales para mantener la estabilidad del complejo, en especial la Leu47_A. Thr76_A establece tres contactos con distintos átomos de Glu98_B y de Arg99_B, mientras que Thr76_B establece igual número de contactos con distintos átomos de Glu98_A y de Arg99_A. Las distancias se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Contactos que establece el residuo de Thr76. Se indica con qué átomos interactúa para contribuir a la estabilización de la estructura de TcTIM.

Thr76 _A		Thr76 _B	
Átomos en contacto	Distancia (Å)	Átomos en contacto	Distancia (Å)
OG1(Thr76 _A)-OE1(Glu98 _B)	2.54	OG1(Thr76 _B)-OE1(Glu98 _A)	2.94
N(Thr76 _A)-OE1(Glu98 _B)	2.9	N(Thr75 _B)-OE1(Glu98 _A)	2.96
NH1(Thr76 _A)-O(Arg99 _B)	2.96	O(Thr75 _B)-NH1(Arg99 _A)	2.86

Es importante hacer notar que ROBETTA detectó los residuos que constituyen la región interfacial, evaluando el papel que desempeña cada uno de ellos en la estabilidad del homodímero. Glu98 y Arg99 fueron los residuos que se predijeron como los residuos de la región interfacial que contribuyen mayormente a la estabilidad del dímero de TcTIM.

Lo Conte y colaboradores determinaron la estructura atómica de los sitios de reconocimiento en las regiones interfaciales de complejos proteicos, puntualizando acerca del carácter químico de las regiones interfaciales, el cual está determinado por las características fisicoquímicas de los residuos de aminoácido y por las contribuciones de las moléculas de agua (Lo Conte, L. y col., 1999). Entre los residuos que fueron predichos como estabilizadores destacan Arg, Asp, Glu, Lys, Ser, Thr, Tyr, Phe, Gln, Leu, Ile e His, coincidiendo en un alto porcentaje con los resultados encontrados con el servidor ROBETTA. La estabilidad de muchas proteínas oligoméricas, está directamente relacionada con el tamaño de la región interfacial, la cual es relativamente grande ($\sim 1600 \text{ \AA}^2$) y con una óptima complementariedad electrostática y de forma (Janin, J. y col., 1988, Janin, J., 1995).

3.5. Propuesta de un mecanismo molecular de inhibición de TcTIM por C8.

En resumen, se observó, desde los primeros minutos de contacto de la enzima con C8, un efecto sobre la estructura secundaria y terciaria, además de la formación de agregados. La actividad enzimática fue evaluada en las mismas condiciones en las que se determinó la integridad de la estructura de la proteína, y ésta también se vio afectada.

De los datos experimentales y del cálculo de las constantes de velocidad, podemos decir que existe un proceso de relajación de la estructura terciaria que permite la exposición de triptófanos; el cual se lleva a cabo en dos etapas. En la primera de ellas se observa un proceso rápido de exposición de los fluoróforos con una constante de velocidad de 0.077 s^{-1} , conforme aumenta el tiempo de exposición de TcTIM a una concentración de $100 \mu\text{M}$ de compuesto 8, es notable una segunda etapa más lenta (constante de velocidad de 0.007 s^{-1}); esto nos habla de un proceso en el que la unión del ligando desestabiliza los contactos que permiten que TcTIM se mantenga compacta. Durante esta relajación es viable acceder a zonas hidrofóbicas de la proteína; la presencia de una molécula como el ANS nos permite determinar que efectivamente el proceso de relajación es de dos etapas. En este caso la constante de velocidad del proceso de introducción del ANS, en la primera parte del proceso, a zonas internas de la proteína tiene una constante de 0.017 s^{-1} . Una segunda etapa más lenta tiene asociada una constante de velocidad de 0.0022 s^{-1} .

De manera simultánea se tiene una pérdida de estructura secundaria, esta pérdida es descrita por un modelo de una exponencial sencilla (con una constante de velocidad de 0.016 s^{-1}), lo que nos habla de un proceso de una sola etapa; es decir, el proceso de pérdida de estructura terciaria se acompaña de la pérdida de la integridad de las estructuras secundarias que constituyen los barriles $(\alpha/\beta)_8$ de la estructura de TcTIM. Todos estos eventos fueron simultáneos (fig. 23).

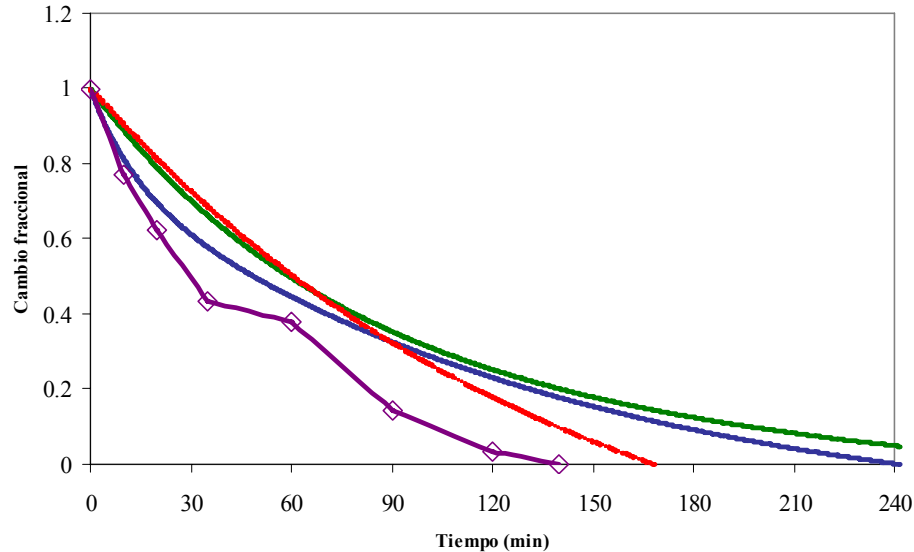


Fig. 23. Comparación de las cinéticas de diámetro circular, θ_{222} (rojo), fluorescencia intrínseca, IFI₃₂₂ (azul), fluorescencia de ANS, IFE₃₈₀ (verde) y actividad enzimática (morado), obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM a pH 7.4 y 36 °C, en presencia de una concentración de C8 de 100 μ M. Los trazos cinéticos se muestran normalizados para apreciar mejor el efecto de C8 sobre la estructura y actividad de TcTIM.

La pérdida de compactación y de conformación tiene que ver con la modificación del equilibrio de las fuerzas no covalentes que estabilizan a la estructura. Experimentalmente se observa que desde los primeros minutos de contacto se desencadena la desestabilización de los enlaces que mantienen a las estructuras secundarias y terciarias de la enzima; presentándose, como es de esperarse, una disminución en la función de la macromolécula.

Es sabido que TcTIM es estabilizada en gran medida por los residuos que constituyen la región interfacial. Nussinov y colaboradores han determinado cuales residuos son críticos en los sitios de unión de proteínas, y en particular de las regiones interfaciales (Tsai, C. J. y col., 1997). Reportaron que si bien, en general, esas regiones de interacción son hidrofóbicas, también contienen residuos polares conservados en localizaciones específicas; de tal manera que los sitios que son considerados puntos clave en la estabilización de regiones interfaciales tienen características mediadas por interacciones polares y características mediadas por los alrededores de los anillos de residuos hidrofóbicos (Hu, Z. y col., 2000).

Según diversos reportes, residuos como Trp, Arg y Tyr se encuentran implicados en el reconocimiento y estabilización de las regiones interfaciales, estos residuos se encuentran además rodeados por un caparazón de residuos energéticamente menos importantes pero que sirven para obstruir el paso de solvente a estos puntos clave (Bogan, A. A., 1998). Lo anterior resulta un buen punto de partida para tratar de explicar lo que molecularmente sucede cuando la primera molécula de C8 se ancla al sitio de unión localizado en la región interfacial. De la estructura cristalográfica se sabe que éste interactúa con los residuos de Arg₇₁ y Phe₇₅, de la cadena A, y de Tyr₁₀₂, de la cadena B (fig. 24a).

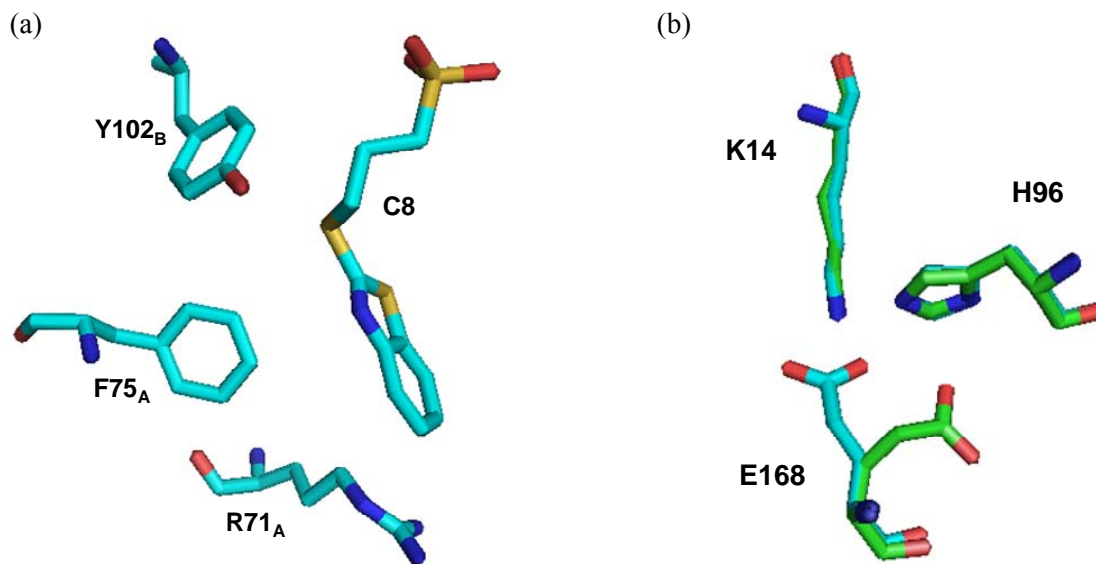


Fig. 24. Identificación de los residuos que se encuentran interactuando con la primera molécula de C8 que se une en el sitio de unión localizado en la región interfacial de TcTIM (a) y visualización de los cambios inducidos en los residuos catalíticos (b), en cian TcTIM co-cristalizada con C8 (ID PDB 1SUX), en verde TcTIM cristalizada sin C8 (ID PDB 1TCD). Se observa un desplazamiento de E168 de 3.6 Å con respecto a la enzima nativa, los otros dos residuos catalíticos no sufren cambios significativos debido a la presencia de C8. Imagen generada con el visualizador Pymol v0.99, DeLano Scientific y datos tomados de Téllez-Valencia, A., 2004.

Dos de los tres residuos con los que interactúa C8 (Arg y Tyr) son considerados como residuos que aparecen periódicamente en las 1,629 regiones interfaciales estudiadas por Zengjian Hu y colaboradores (Hu, Z. y col., 2000).

Tanto en el proceso de plegamiento como en el de unión de ligandos a superficies proteicas, está ampliamente aceptado que si los residuos muestran una tendencia a estar conservados, es porque éstos desempeñan algún papel trascendente en la estructura o en la función de la macromolécula. En el proceso de la unión de ligandos, los residuos conservados quizás contribuyen a la estabilidad estructural, catálisis o reconocimiento molecular.

Partiendo de esta afirmación, y de las evidencias obtenidas experimentalmente, la interacción de C8 con los residuos de Arg₇₁ y Tyr₇₅ está influyendo en la estabilidad de la enzima. La interacción de éstos con C8 origina una desestabilización en uno de los residuos catalíticos (fig. 24b), que se refleja desde los primeros minutos a nivel de la actividad enzimática; aparentemente estos cambios estructurales comprometen la función de TcTIM puesto que, aunque se sigue apreciando actividad, ésta decrece casi un 20 % durante los 10 minutos siguientes a la incubación inicial de TcTIM con C8 (ver fig. 23). Lo anterior nos hace pensar en la existencia de rutas de propagación de los efectos de la unión del ligando, que probablemente facilitan la unión de una segunda molécula.

Debido a la magnitud de los eventos, es muy probable que zonas adyacentes al sitio de unión en la región interfacial resulten de gran importancia para la estabilidad de la enzima. Datos teóricos, obtenidos con el servidor TANGO y COREX-Best, nos permitieron identificar residuos que resultan ser altamente desestabilizantes de la estructura de la macromolécula (fig. 16 y tabla 3, y fig. 17, respectivamente).

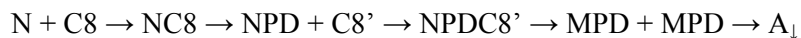
Los movimientos propios de la enzima, pueden dar lugar a la exposición de nuevos sitios de unión puesto que, según Horn y colaboradores, existen sitios de unión a ligandos en las macromoléculas que no se encuentran accesibles en la estructura nativa, sino que son expuestos únicamente después de que una serie de eventos permite la exposición del sitio debido a perturbaciones en los movimientos naturales de la molécula (Horn, J. R. y col., 2003). Uno de los movimientos más pronunciados en TcTIM involucra directamente a la región interfacial. Éste se caracteriza por representar la elongación y encogimiento de un “resorte”. Si suponemos un equilibrio entre un dímero y dos monómeros parcialmente individualizados, pero que en el espacio se encuentran lo suficientemente cerca como para no exponer demasiada área hidrofóbica (que a su vez derive en el colapso de la estructura), podemos pensar que es este movimiento el que genera la exposición del sitio para unir a C8, y que cambios en la magnitud de dicho movimiento pueden dar lugar al rompimiento de fuerzas que estabilicen al dímero nativo.

Dado que las fuerzas no covalentes operan a corta distancia y a que la contribución energética individual es baja, se requiere la participación de un alto número de las mismas para lograr una interacción estable de los monómeros. Si la unión de C8 propaga su efecto iniciando con el rompimiento local de una gran cantidad de este tipo de interacciones, es de esperarse un efecto lo suficientemente significativo como para causar una pérdida dramática de la conformación funcional de la enzima. Por otro lado, considerando que la unión de C8 disminuye la libertad de movimiento de esta zona, actuando como grapa molecular, y que este evento desencadena una disminución de flexibilidad molecular en la vecindad del sitio de unión, es de esperarse que las zonas detectadas como altamente inestables, y que se encuentran relativamente cerca de este sitio, jueguen un papel clave en la exposición de un segundo sitio de unión a C8.

Este otro sitio, más alejado de la región interfacial, puede jugar un papel clave en la perturbación del equilibrio del conjunto de conformaciones que dan lugar al estado nativo. Estos eventos, que modifican sustancialmente la estructura y conformación de TcTIM, se reflejan en la actividad de la enzima. La tensión de las fuerzas no covalentes involucradas en la estabilización de la estructura terciaria colapsan, dando paso a la ruptura de puentes de hidrógeno que estabilizan a dichas estructuras y que mantienen ocultas regiones hidrofóbicas de la macromolécula, las cuales al interactuar entre sí dan lugar a la formación de agregados.

La pérdida de estructura secundaria observada tiene que ver con la perturbación de las características de las estructuras helicoidales y laminares que constituyen a TcTIM. Puede ser que exista, conforme se va expandiendo la estructura de TcTIM, el alejamiento en el espacio de los dipolos C=O y N-H de los enlaces peptídicos vecinos, de tal manera que no existe una interacción dipolo-dipolo óptima que produzca la trama de puentes de hidrógeno cooperativos (intracatenarios, dentro de un mismo segmento del esqueleto peptídico) necesarios para mantener las estructuras helicoidales, o entre dos o más segmentos diferentes de la misma cadena para mantener las estructuras laminares.

Un mecanismo preliminar de la inhibición de TcTIM puede ser el siguiente:



La unión de la primera molécula de C8 al dímero nativo de TcTIM (NC8) provoca un efecto que genera un estado parcialmente desplegado (NPD), como discutimos texto arriba, debido probablemente a la desestabilización de la región interfacial.

La perturbación en los movimientos naturales de la conformación de TcTIM, posiblemente expone un segundo sitio de unión en el que se aloja la otra molécula de C8 necesaria para concretar la inhibición (NPDC8'). La unión de esta molécula maximiza los efectos a nivel estructural y funcional de la enzima, de tal manera que el dímero parcialmente desplegado, con la región interfacial inestabilizada, se escinde en dos monómeros parcialmente desplegados (MPD), que debido a la exposición de zonas hidrofóbicas forman agregados (A) que tienden a precipitar.

En resumen, la unión de la primera molécula de C8 facilita la unión de una segunda, debido a la exposición de un sitio de unión; ésta, al unirse a la enzima, provoca un cambio en la estructura del homodímero (estado I) que desemboca en la inactivación de la especie activa, generándose posteriormente dos intermediarios monoméricos, por la modificación de los contactos de la región interfacial (estado II), y finalmente en la desnaturalización de éstos (estado III).

Puesto que C8 no se comporta como un inhibidor convencional proponemos que éste es un inhibidor estructural, que actúa desestabilizando la conformación de la macromolécula con la concomitante pérdida de la actividad enzimática.

4. Estudios de simulación del reconocimiento molecular proteína-ligando (docking) y de cribado virtual, en el contexto del diseño de fármacos asistido por computadora. Identificación de moléculas con capacidad para unirse a TcTIM.

Los nuevos avances en el desarrollo de fármacos se basan por un lado, en determinar las anomalías bioquímicas que causan las enfermedades, y por otro, en el diseño de compuestos (fármacos) que puedan prevenir o corregir estas anomalías de un modo específico. Un fármaco es una molécula que interfiere en un determinado proceso bioquímico, bien sea fisiológico o fisiopatológico, de forma que dicho proceso se ve bloqueado o reforzado por la acción de éste. Su acción se produce mayoritariamente por un mecanismo selectivo de interacción con un sistema biológico (DNA, proteína, membrana celular); en este contexto diremos que el fármaco es un ligando de una diana terapéutica o de una molécula blanco, la macromolécula biológica. Cuando el fármaco está incorporado en un vehículo apropiado para su administración en pacientes, de forma que puede alcanzar el proceso bioquímico que debe modular, entonces tenemos un medicamento, del cual decimos que el fármaco es el principio activo (Gutiérrez de Terán, H., 2004). Se habla de diseño racional de fármacos si los cambios en selectividad, potencia, afinidad con el receptor y eficacia terapéutica son propuestos por conocimiento estructural. En el desarrollo del fármaco también se consideran factores como la posibilidad de absorción del compuesto, el grado de estabilidad en los tejidos y líquidos, así como de metabolismo y de toxicidad (Lipinski, C. A. y col., 2001).

Además de los receptores propios de las células, las enzimas son también blancos importantes para la acción de los fármacos. Mientras que los fármacos dirigidos a los receptores se clasifican en agonistas o antagonistas, los fármacos dirigidos a las enzimas se clasifican en inhibidores o activadores (inductores). En el caso de los inhibidores, éstos bien pueden ocupar temporalmente el centro activo por semejanza estructural con el sustrato original (inhibidor competitivo) o bien alterar la conformación espacial de la enzima (uniéndose a un sitio distinto del sitio catalítico, provocando una disminución de la velocidad máxima sin alterar la afinidad), impidiendo su unión al sustrato (inhibidor no competitivo); debido a lo anterior, es posible neutralizar la actividad de las biomoléculas empleando inhibidores de la función enzimática. En este sentido, si se busca eliminar la actividad de enzimas utilizadas en rutas metabólicas de organismos patógenos, es necesario desarrollar compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales de éstas, aprovechando las diferencias estructurales presentes entre la enzima del parásito y del hospedero. Es sabido que muchos fármacos son inhibidores de la función de una enzima a través de un bloqueo efectivo del sitio activo o de las zonas coadyuvantes de la catálisis (Mattos, C. y col., 1996, Rarey, M. y col., 1996), lo que representa una dificultad cuando se busca selectividad en el caso de que la enzima a inhibir se encuentre presente tanto en el parásito como en el hospedero; en estos casos es deseable desarrollar compuestos que se unan con gran firmeza y alta especificidad a los sitios funcionales, el conocimiento detallado de la geometría del sitio de unión puede permitirnos desarrollar un fármaco con ambas características.

En el proceso del diseño de fármacos, la primera etapa consiste en identificar la diana terapéutica. Cuando se trabaja con proteínas y particularmente con enzimas, deben considerarse tres factores importantes: la especificidad de la enzima, la afinidad o energía con que se fija el sustrato a ella, y la geometría del sitio de unión. La siguiente etapa en el diseño de fármacos, es la identificación de moléculas líderes (compuestos que muestran tener una actividad significativamente alta sobre el blanco seleccionado). Las moléculas líderes que poseen alta actividad biológica y que son químicamente viables, son caracterizadas estructuralmente y sometidas a un proceso de optimización de su potencia farmacológica.

En este paso se generan derivados de las moléculas líderes, y se determina su estructura tridimensional, así como la relación que existe entre la actividad biológica que manifiestan y algunas de sus propiedades moleculares (Leach, A. R. y col., 2004).

Estos nuevos compuestos son sintetizados en el laboratorio y, si confirman poseer mayor potencia farmacológica, se reincorporan al proceso de optimización en una serie de etapas iterativas. Si alguna de estas sustancias logra unirse con suficiente firmeza al blanco, entonces se realiza un estudio detallado de su estabilidad química y metabólica, sus propiedades fisicoquímicas -tales como la solubilidad y lipofilidad-, su selectividad y de su posible mecanismo de acción. Se obtiene entonces una molécula que puede ser considerada un fármaco potencial. El proceso descrito es conocido como *High-throughput screening* (HTS).

En las primeras etapas del desarrollo de fármacos, los experimentos masivos requieren de un gran despliegue de recursos puesto que, además de utilizar grandes bancos de datos, es necesario procesar y almacenar grandes cantidades de resultados experimentales. Debido a lo anterior, en años recientes se ha optado por los estudios *in silico*; en éstos, los ensayos encaminados a encontrar moléculas líderes de una forma eficiente y relativamente económica, son llevados a cabo mediante simulaciones moleculares por computadora. En este contexto, la aplicación de métodos de simulación del reconocimiento molecular proteína-ligando (docking) y de cribado virtual, cobran cada vez mas importancia en el proceso de descubrimiento de fármacos, complementando a las técnicas de HTS, descritas arriba de manera general.

El uso de las herramientas computacionales, al igual que sucede con otras áreas del conocimiento, ha facilitado y abaratado los costos de las diversas etapas del diseño y desarrollo de los fármacos. Además, independientemente de las aplicaciones informáticas generales, como la automatización de procesos o manejo de bases de datos, existe otra serie de aplicaciones informáticas específicamente desarrolladas para el área biológica. Por ejemplo, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas empleando métodos bioinformáticos de predicción de genes (Parra, G. y col., 2000), el filtrado de bibliotecas moleculares y/o el diseño de nuevos compuestos con alta probabilidad de presentar la actividad biológica deseada. De igual manera, las reacciones químicas pueden ser diseñadas o predichas mediante técnicas de química computacional (Warshel, A., 1991), además de que la farmacocinética, el metabolismo y la toxicología de un compuesto pueden predecirse *in silico* (Bugrim, A. y col., 2004, Boobis, A. y col., 2002).

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos al emplear una serie de herramientas computacionales para identificar y determinar las características de los sitios potenciales de unión presentes en triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), con el objeto de facilitar la comprensión a nivel molecular del reconocimiento intermolecular entre la enzima y el ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (C8, molécula líder); e identificar nuevos inhibidores que puedan servir como precursores de fármacos contra la enfermedad de Chagas. La localización de los sitios de unión, su descripción y su caracterización, desde un punto de vista teórico, permitió entre otras cosas hacer una estimación del modo en que determinados ligandos actúan sobre TcTIM.

En este sentido, una vez determinados los sitios de unión, y contando con una quimioteca generada a partir de una molécula líder, se realizó un ejercicio de cribado virtual con la finalidad de identificar moléculas capaces de actuar como inhibidores de la actividad de TcTIM, dicho cribado fue hecho empleando el conjunto de programas de Fast Rigid Exhaustive Docking (FRED) (OpenEye Scientific Software, Inc.).

Cabe mencionarse que para poder considerar como inhibidores a las moléculas obtenidas computacionalmente, sería recomendable realizar la síntesis de las moléculas, siempre que esto fuera posible, y probar su eficacia *in vitro* e *in vivo* empleando diversas técnicas experimentales.

4.1. Docking

Existen diversos conjuntos de programas diseñados para auxiliar a los investigadores en la búsqueda de moléculas con potencial farmacológico. En nuestro caso inicialmente empleamos un método de simulación por computadora para el desarrollo de fármacos, que ha rendido resultados exitosos, AutoDock (Sousa, S. y col., 2006). Este método de reconocimiento molecular o docking, es ampliamente utilizado alrededor del mundo por compañías privadas y por instituciones de investigación pública para el hallazgo de nuevos compuestos con efectos terapéuticos. AutoDock es un conjunto de programas de docking diseñado para predecir la forma en que moléculas pequeñas, como substratos o candidatos a drogas (ligandos flexibles), se unen a un receptor con una estructura 3D conocida, así como la afinidad de dicha unión (Morris, G. M. y col., 1998).

Si bien la técnica del docking representa una alternativa a los procedimientos de ensayo masivo de laboratorio, de manera más importante ha sido utilizada en el diseño de fármacos, tanto para llevar a cabo las etapas de identificación del sitio de unión sobre el blanco, como las de construcción y evaluación de los complejos moleculares resultantes; además de ser empleada en estudios de interacción proteína-proteína (Hetényi, C. y col., 2002, Rosenfeld, R. J. y col., 2003, Alfonso, P. y col., 2005; Hetényi, C. y col., 2006).

En un estudio de docking es recomendable que la estructura tridimensional de la molécula blanco haya sido previamente determinada, ya sea por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear, aunque pueden emplearse estructuras obtenidas mediante modelado por homología. La fuente principal de estructuras tridimensionales de proteínas es el Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, en la mayor parte de los casos, los archivos depositados en esta base de datos no pueden ser utilizados directamente en estudios de diseño de fármacos, sino hasta realizar algunas adecuaciones. Normalmente, las modificaciones que deben hacerse a estas moléculas son la adición de los átomos de hidrógeno, que representan casi la mitad de los átomos totales en una proteína y cuya posición no es detectada por la técnica de difracción de rayos X, la remoción de las moléculas de agua que están unidas a la superficie de la proteína, y que con gran frecuencia ocupan el sitio de unión, la eliminación de ligandos presentes durante la determinación de la estructura tridimensional y finalmente, el modelado de las regiones que no pudieron ser determinadas experimentalmente o que resultaron ser ambiguas (Padilla-Zúñiga, J. A. y col., 2002). Durante el docking, es imprescindible conocer la carga eléctrica que corresponde a cada átomo del blanco, considerando los efectos electrostáticos que pueden sufrir los átomos con cargas parciales (Weiner, S. J. y col., 1986).

Una vez preparada la molécula blanco, es posible localizar los sitios que pueden alojar a un ligando. Criterios como el tamaño del hueco (apropiado para acoger a un ligando) o la flexibilidad e hidrofobicidad, son de gran importancia para determinar el sitio de unión, puesto que éste suele ser más hidrofóbico y flexible que otros huecos presentes en la diana. La superficie de una proteína es irregular, con una serie de protuberancias y huecos que forman un relieve complejo. Generalmente, es en esos huecos donde las moléculas orgánicas pueden unirse. Sin embargo, debido al tiempo de cálculo que implica, no es práctico probar el conjunto de las moléculas de la base de datos en todas las orientaciones posibles sobre cada uno de los sitios potenciales de unión.

Por ello es necesario seleccionar, generalmente, uno sólo de los huecos para su estudio. Una estrategia, para localizar y seleccionar esos huecos, es enviar el archivo PDB de la estructura tridimensional a uno de los múltiples servidores disponibles en la Internet, por ejemplo CASTp (<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>).

Por otro lado, si se cuenta con un ligando de partida los programas de docking permiten, aunque de manera aproximada, la identificación de los sitios potenciales de unión al realizar un docking sobre la superficie completa de la molécula blanco; dependiendo del número de pruebas que se realicen, la predicción de los sitios será mejor. Con esta exploración se obtiene una colección de posibles posiciones de acoplamiento ligando-proteína, que el programa ordena según el valor que su función de energía le haya dado a cada solución (función de scoring o puntaje).

Es importante aclarar que el propósito de una función de evaluación es discriminar, en un tiempo razonable de cálculo, entre las posiciones correctas (posiciones con un bajo RMSD -Root of Mean Square Deviations- con respecto a la posición cristalográfica cuando se cuenta con ella, o valores muy negativos de energía, así como configuraciones de baja tensión intramolecular, cuando no es así) y el resto de soluciones encontradas en el proceso de búsqueda. Los sitios seleccionados serán aquellos que presenten las mejores estimaciones de la energía de unión del complejo ligando-receptor.

4.1.1. Estudios de simulación del reconocimiento molecular C8 sobre la estructura de TcTIM.

Como mencionamos en el capítulo anterior, experimentalmente, se ha reportado el sitio de unión de la primera molécula de C8 en TcTIM (Téllez-Valencia, A. y col., 2004). El segundo sitio de unión no ha podido determinarse debido probablemente a que esta unión desnaturaliza a TcTIM y evita la cristalización de la proteína, limitando su análisis por difracción de rayos-X.

Debido a lo anterior, la finalidad de esta sección es determinar el segundo sitio de unión a C8 en la estructura de TcTIM y proponer modificaciones químicas sobre la molécula líder (C8), que incrementen su afinidad por los sitios de unión. Se exponen a continuación los resultados obtenidos con relación al estudio de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y C8.

4.1.1.1. Validación del método.

4.1.1.1.1. Complejo de estreptavidina-biotina.

Como se mencionó en la metodología, antes de proceder a la identificación de los sitios de unión en la estructura de TcTIM, se realizó la validación del método empleando un sistema conocido. Para ello se utilizó un complejo de estreptavidina y biotina. Al realizarse el docking sobre el complejo, se lograron reproducir los resultados obtenidos anteriormente por el grupo de investigación del departamento de Bioquímica de la Universidad de Zaragoza; además de que se logró predecir el sitio de unión para biotina en la superficie de estreptavidina, reportado por cristalografía (datos no mostrados).

4.1.1.1.2. Complejo de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* con 3-fosfoglicerato.

Para realizar la validación del método con una enzima con alto porcentaje de similitud con la enzima en estudio, se utilizó el archivo de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma brucei* (TbTIM), co-cristalizada con el análogo de sustrato, el 3-fosfoglicerato (3-PA). Se utilizó este complejo porque a partir de él se tenía conocimiento del sitio de unión del análogo de sustrato, siendo éste el sitio activo. Así, si el ejercicio de docking lograba localizar dicho sitio, podía pensarse en la confiabilidad del método.

Los ejercicios de docking revelaron que el ligando visitaba los dos sitios activos de la enzima con una energética de unión de -10.53 kcal/mol (fig. 24).

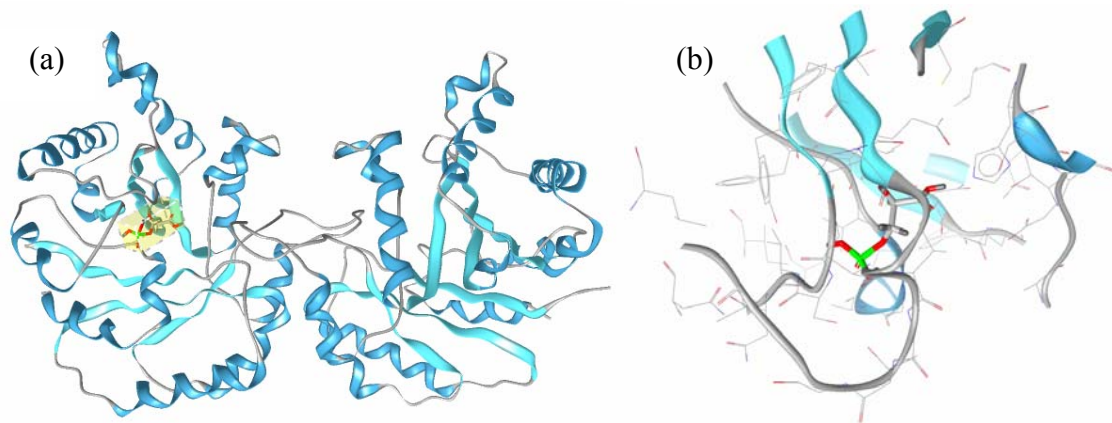


Figura 24. (a) Localización espacial del sitio de unión en TbTIM de 3-PA empleando el visualizador de LigandScout 1.0.2. Se sabe que el análogo de sustrato 3-PA se une al sitio activo de TbTIM. Mediante los ejercicios de docking se identificó correctamente el sitio de unión; la solución de más baja energía correspondió al sitio activo. (b) Acercamiento al ligando en el sitio activo.

4.1.1.1.3. Complejo de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* con 3-fosfoglicerato.

Posteriormente, se realizó el mismo ejercicio utilizando como archivo de proteína el correspondiente a triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM). En este caso, para evaluar la posible localización del análogo de sustrato en TcTIM, y emplearlo como elemento de validación, se hizo un alineamiento estructural entre TbTIM y TcTIM (códigos PDB: 1IIH y 1TCD, respectivamente), empleando la versión 0.99 de PyMol. El alineamiento tuvo un valor de RMSD de 0.532 Å y se localizó al 3-PA en el sitio activo.

Una vez que se contó con las coordenadas del 3-PA, se procedió a realizar un ejercicio de docking utilizando como enzima blanco a TcTIM. Nuevamente se lograron predecir los sitios de unión que implicaban al sitio activo, siendo el valor de la energía de docking de -10.18 kcal/mol (fig. 25).

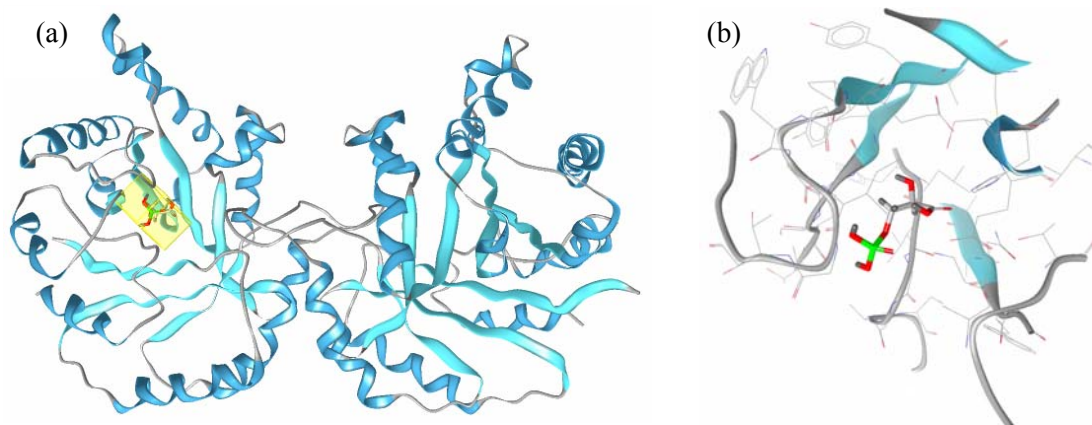


Figura 25. (a) Localización espacial del sitio de unión de 3-PA en TcTIM empleando el visualizador de LigandScout 1.0.2. Mediante los ejercicios de docking se identificó correctamente el sitio de unión del análogo de sustrato 3-PA; nuevamente, la solución de más baja energía correspondió al sitio activo. (b) Acercamiento al ligando en el sitio activo.

En ambos casos, los ejercicios de docking sobre la superficie de la proteína se realizaron con un espaciado entre los puntos de la malla (resolución) de 0.55 Å, y aunque se tuvo un perfil inicial de los sitios de unión, se consideró necesario incrementar la resolución al momento de trabajar con el complejo de TIM-C8.

4.1.1.2. Localización de los sitios de unión presentes en la estructura de TcTIM.

Al igual que en la etapa de validación del método, en los primeros ensayos de localización de sitios, se empleó un complejo a partir del cual se tenía conocimiento de un sitio de unión observado experimentalmente. Si el docking localizaba ese sitio de unión podíamos pensar en la confiabilidad de la metodología utilizada. En el caso del complejo TcTIM-C8, el sitio que se esperaba localizar fue el reportado por cristalografía por Téllez-Valencia y colaboradores, en la región interfacial de TcTIM (Téllez-Valencia, A. y col., 2004).

Se realizó el docking del C8 sobre TcTIM para predecir los posibles sitios de unión, utilizándose el archivo 1TCD. Se consiguieron identificar los sitios de unión sobre la superficie de TcTIM, aunque ninguno de ellos involucraba la región interfacial y sí al sitio activo. Se encontraron además, sitios que involucraban regiones que dan acceso a zonas que contienen hebras con tendencia a agregar (determinadas con TANGO, <http://tango.embl.de/>, como se describió en la sección 3.4). Al ejecutarse el docking empleando el archivo de TcTIM con información de coordenadas de C8 (1SUX), con cadenas laterales añadidas empleando el programa SCWRL3 (aunque sin realizar una minimización local de éstas), nuevamente se identificaron sitios de unión en la zona de los sitios activos pero no de la región interfacial.

Para evaluar la posible orientación de C8 en la región interfacial, se generó un archivo PDB que contenía las coordenadas de dos dímeros formando un hueco en la región interfacial (tetrámero), y se centró la búsqueda sobre éste; se consiguió localizar sitios de unión en esta zona. Lo anterior se hizo sólo para evaluar si era posible encontrar el sitio de unión reportado en la literatura por métodos cristalográficos.

Se encontró una conformación cercana a la zona de la reportada por Téllez-Valencia y colaboradores en 2004, pero que no se encontraba interactuando con los residuos reportados por dichos autores. El valor de la energía de docking fue de -8.92 kcal/mol (fig. 26).

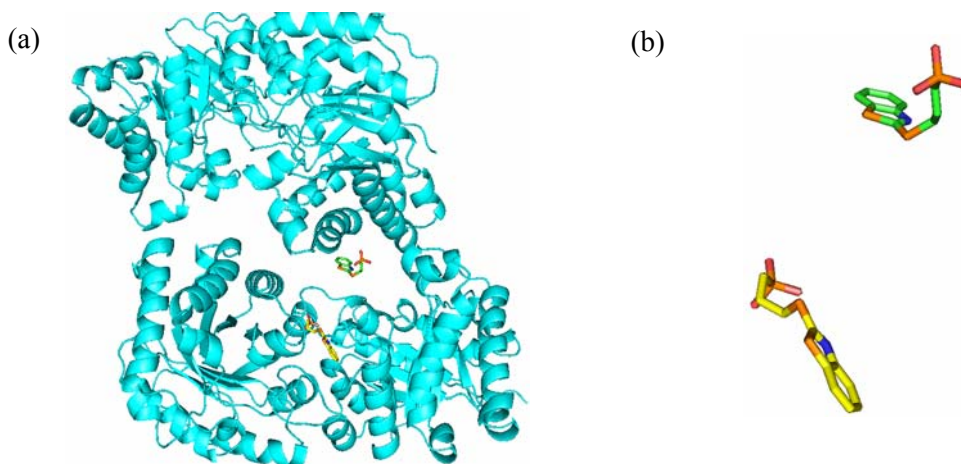


Figura 26. (a) Localización espacial del sitio de unión de C8 en un tetrámero de TcTIM, empleando el visualizador Pymol 0.9.7. (b) Se muestran las dos moléculas de C8, en amarillo la configuración correspondiente a la solución de menor energía determinada por docking. En verde, la configuración encontrada por estudios de cristalografía de rayos-X, reportada por Téllez-Valencia y col. en 2004.

Cabe mencionar que se realizó el cálculo de la energía de docking de la molécula de C8 del cristal, y ésta tuvo un valor de 1.94 kcal/mol, lo que indica que es una conformación con demasiada tensión conformacional. Lo anterior podría hacer pensar que la posición reportada es consecuencia del confinamiento de C8 entre dos dímeros de TcTIM en el cristal, y que probablemente ésta no sea una configuración fácilmente adoptada por C8 en solución.

Dado que, cuando se trabajó con un sólo dímero no se consiguió identificar el sitio de unión de la región interfacial observado experimentalmente, se procedió a hacer modificaciones en los parámetros empleados en los ejercicios de docking. Las modificaciones propuestas fueron hechas basándonos en los reportes de Hetényi y colaboradores en 2002, y de Alfonso y colaboradores en 2005. Se modificaron los valores del espaciado para generar la malla y el tamaño de la población. Al trabajar con la superficie completa de enzima, el mejor compromiso se encontró cuando se establecieron los siguientes valores (tabla 7).

Tabla 7. Parámetros empleados en los estudios de docking (datos basados en los estudios de Hetényi et al, 2002 y Alfonso et al, 2005).

Número de puntos en la malla	126 126 126
Espaciado de la malla	0.375
Tamaño de la población	100
Número de evaluaciones de energía	20,000,000
Número de generaciones	27,000
Número de pruebas	100

Como se mencionó en la metodología, se hizo la partición de la proteína en 27 bloques, cada uno centrado en una caja de prueba.

En estas cajas de evaluación el espaciado empleado en la construcción de la red fue de 0.375 Å y se proporcionó un espacio extra de 15 Å alrededor de la proteína. Lo anterior aseguró que se tendrían poblaciones representativas del espacio conformacional.

Cuando se realizó el docking sobre la superficie se lograron predecir sitios de unión en las huecos que dan acceso al sitio activo (**HSA**, Hueco que da acceso al Sitio Activo), tanto de la cadena A como de la cadena B, y a regiones que dan acceso a hebras que contienen residuos con tendencia a agregar (**HH**, Hueco que da acceso al sitio de Hebras), además de la región interfacial (**HRI**, Hueco que da acceso a la Región Interfacial) (fig. 27).

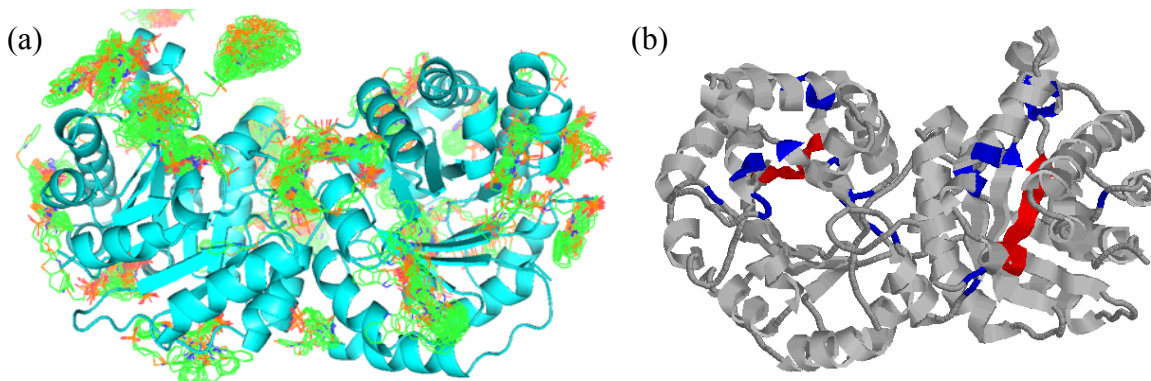


Figura 27. (a) Localización espacial de todos los sitios de unión de C8 en la superficie de TcTIM, predichos con los programas de Autodock 3.0.5 (b) Localización espacial de los residuos detectados por el servidor TANGO (azul y rojo). En rojo, la hebra que contiene a los residuos con mayor tendencia de agregación y a los que puede accederse a través de las cavidades predichas por Autodock 3.0.5. Imágenes generadas empleando el visualizador RasMol 2.7.2.1.1.

Ninguna de las configuraciones encontradas en la región interfacial corresponde a la molécula de C8 reportada por cristalografía. Las configuraciones con los mejores valores de energía, son las que se encuentran localizadas en HSA_A , ésta aloja a la mayor parte de las configuraciones (51%). Otras configuraciones con valores de energía favorables visitan HSA_B (19%) y HH (19%), distintas conformaciones se localizan en pequeños huecos presentes en la superficie de TcTIM, aunque en general presentan valores de energía poco favorables (-7.65, promedio). En la tabla 8 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en un ejercicio de docking sobre toda la superficie de la proteína.

Muchas de las soluciones tenían asociados valores de energía altos (no mostrados en la tabla), éstos se obtuvieron debido a la localización de la caja de prueba. Dicha caja se situaba en el espacio que rodeaba a la proteína, por lo que la energía de docking de las conformaciones resultó extremadamente alta. Muchas de estas soluciones no se consideran puesto que ni siquiera involucran un contacto entre la proteína y el ligando (fig. 27).

Las soluciones de las conformaciones localizadas en la superficie de la proteína, con valores de energía por arriba de -8.5 kcal/mol (siempre y cuando no se encuentren en los bolsillos que pueden alojar moléculas), tampoco son consideradas. Bajo estos criterios, los sitios más poblados correspondieron al sitio activo y a la zona de hélices.

Tabla 8. Resumen de los datos de energía de docking del compuesto 8 al realizarse sobre toda la superficie de TcTIM (empleando los parámetros listados en la tabla 7). Solución encontrada en HSA_A[▲], HSA_B[◆] y HH[■], las soluciones correspondientes al hueco de la región interfacial computaron energías por arriba de los -8.63 kcal/mol, por lo que no se encontraron dentro e las 40 mejores posiciones.

Posición	Energía de docking	Posición	Energía de docking	Posición	Energía de docking	Posición	Energía de docking
1 [▲]	-10,54	11 [▲]	-9,79	21 [■]	-9,57	31 [▲]	-9,48
2 [▲]	-10,5	12 [▲]	-9,76	22 [■]	-9,55	32 [◆]	-9,46
3 [▲]	-10,23	13 [▲]	-9,73	23 [■]	-9,55	33 [■]	-9,45
4 [▲]	-10,14	14 [■]	-9,72	24 [■]	-9,54	34 [■]	-9,44
5 [▲]	-10,13	15 [◆]	-9,7	25 [◆]	-9,54	35 [▲]	-9,43
6 [▲]	-10,02	16 [■]	-9,69	26 [■]	-9,49	36 [◆]	-9,42
7 [▲]	-9,99	17 [◆]	-9,65	27 [■]	-9,49	37 [■]	-9,41
8 [◆]	-9,94	18 [■]	-9,6	28 [▲]	-9,49	38 [■]	-9,4
9 [▲]	-9,88	19 [■]	-9,59	29 [■]	-9,48	39 [▲]	-9,37
10 [▲]	-9,82	20 [▲]	-9,57	30 [■]	-9,48	40 [■]	-9,36

La conformación de mejor energía (-10.54 kcal/mol) se encontró unida al sitio activo de la cadena A (HSA_A) (fig. 28-a). En el caso de la conformación de mejor energía encontrada en la región interfacial (-8.63 kcal/mol) se observó que ésta no correspondía en localización y distribución espacial a la reportada por cristalografía, ya que a pesar de que aparentemente existe una interacción del anillo de benzotiazol con el anillo aromático de la fenilalanina, ésta no es de la misma naturaleza (fig. 28-b).

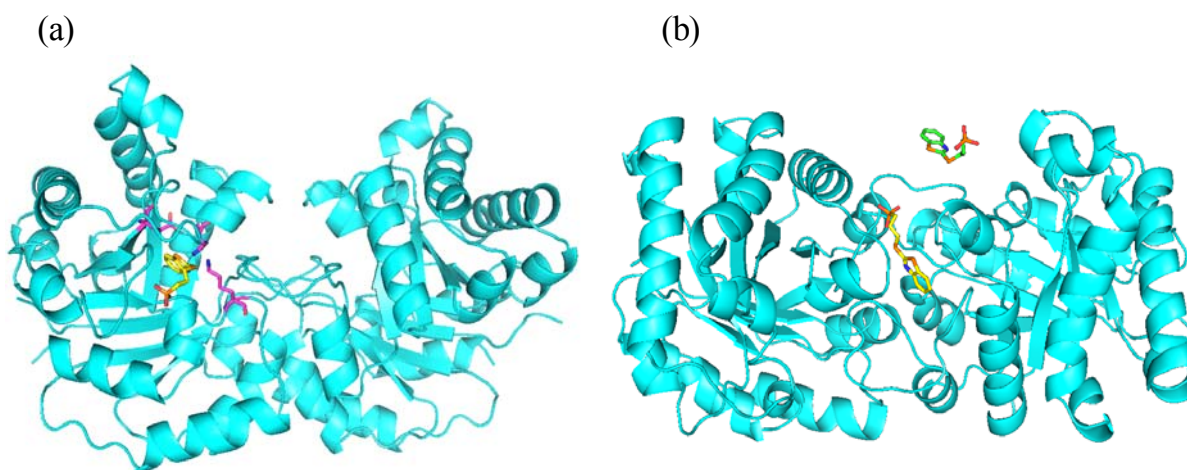


Figura 28. Localización espacial de los sitios de unión de C8 en el dímero de TcTIM, empleando el visualizador PyMol 0.9.7. (a) Configuración correspondiente a la solución de menor energía determinada por docking (amarillo), se resaltan los residuos catalíticos K14, H96 y E168 (magenta). (b) Solución de mayor energía localizada en la región interfacial (amarillo), comparada con la configuración encontrada por estudios de cristalografía de rayos-X (verde).

4.1.1.3. Identificación de las interacciones establecidas entre el ligando y la proteína en distintos sitios de unión.

Una vez que se determinaron los parámetros de ejecución del docking y que se identificaron sitios potenciales de unión en la enzima blanco, se procedió a realizar ejercicios de docking con el complejo TcTIM-C8, centrando las cajas de prueba en los siguientes sitios:

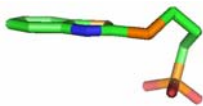
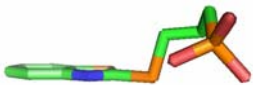
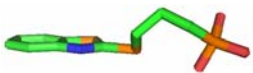
- Sitio activo (HSA)
- Región interfacial (HRI)
- Hélices con residuos con alta tendencia de agregación (HH)

Lo anterior con la finalidad de determinar el tipo de interacciones que se establecen entre el ligando y la proteína en los distintos sitios de unión, y emplear esta información en la construcción de un farmacóforo, éste fue utilizado posteriormente en la construcción de quimiotecas para realizar ejercicios de cribado virtual e identificar nuevas moléculas líderes (Kenny, B. A. y col., 1998, Broach, J. R. y col., 1996, Kuntz, I. D., 1992).

Cuando se centró la búsqueda en éstos sitios, los parámetros usados fueron los mismos que los enlistados en la tabla 7, salvo el empleado en la generación de la malla (0.2 Å). Los resultados mostrados en la tabla 9 corresponden a las soluciones con mejor puntaje en cada uno de los ejercicios de docking. La energía de docking más baja la registró una conformación localizada en el sitio activo de la cadena A.

Si tomamos el valor de la energía de docking como criterio para determinar la probabilidad de que C8 se una a la cavidad, entonces podríamos pensar que la cavidad con más alta probabilidad de alojar una molécula de C8 corresponde al sitio activo, seguida de la cavidad localizada en la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos de aminoácidos con alta tendencia de agregación y finalmente, la cavidad de la región interfacial.

Tabla 9. Resumen de los datos de energía de docking del compuesto 8 al realizarse sobre el sitio activo, la zona de hélices de agregación y la región interfacial de TcTIM (empleando los parámetros listados en la tabla 7, con 0.2 Å de resolución).

Sitio	Energía de docking (kcal/mol)	Conformación
HSA	-10.92	
HH	-9.55	
HRI	-9.13	

A partir de los datos obtenidos al realizar el docking del complejo TcTIM-C8 (centrado en la superficie total, en HIR, HSA y HH), puede apreciarse que, aparentemente, el C8 se une preferencialmente al sitio activo de la subunidad A y a la zona cercana a las hebras que contienen regiones con tendencia a agregar, teniendo la región interfacial menor probabilidad de ser visitada. Lo anterior considerando que la configuración de menor energía, con respecto a otras, estará más favorecida. Las interacciones establecidas por C8 en los distintos sitios de unión se muestran a continuación (fig. 29).

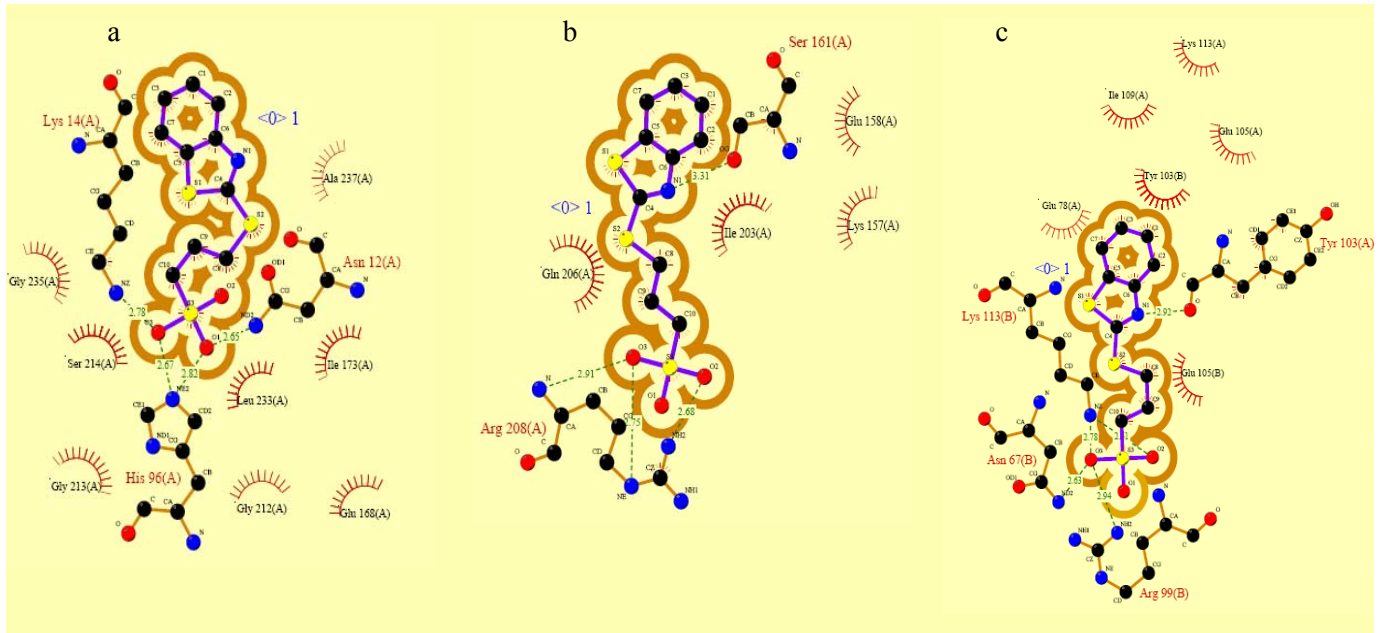


Fig. 29. Determinación de las interacciones establecidas entre C8 y TcTIM en los sitios de unión identificados con Autodock 3.0.5. (a) sitio activo (HSA), (b) hélices con residuos con alta tendencia a agregar (HH) y (c) región interfacial (HIR). Los contactos hidrofóbicos se distinguen como semiesferas rojas, los puentes de hidrogeno en línea punteada verde y la accesibilidad al solvente como la línea marrón que delimita a la molécula. Figurada generada empleando el programa LigPlot 4.4.2.

4.1.1.4. Mecanismo del reconocimiento molecular entre TcTIM y C8. Descripción del proceso de inhibición.

Experimentalmente se tiene conocimiento de que C8 induce un proceso de pérdida de estructura terciaria, secundaria y actividad enzimática. Se propone que existe un proceso de relajación de la estructura terciaria que permite el acceso a zonas hidrofóbicas de la proteína y exposición de los fluoróforos intrínsecos. Simultáneamente se presenta la pérdida de estructura secundaria, y desde los primeros minutos de contacto, también la actividad enzimática de TcTIM disminuye, aunque ésta retiene más del 80% de su capacidad para catalizar la reacción de isomerización, lo cual indica que los residuos catalíticos no han sufrido perturbaciones de consideración (ver fig. 21). De estudios realizados con anterioridad, se sabe que se necesitan dos moléculas de C8 para lograr una inactivación por arriba del 90%.

Con esta información y la obtenida a partir de los ejercicios de docking, puede pensarse en un mecanismo en el que una primera molécula se une a la estructura nativa en una zona que no involucra los residuos catalíticos (puesto que se conserva un alto porcentaje de actividad enzimática); esta unión desestabilizaría contactos terciarios, a partir de la información cristalográfica se puede proponer la región interfacial.

Los efectos de la unión podrían propagarse a larga distancia induciendo la exposición de un segundo sitio de unión a C8 (posiblemente HH), provocando una disminución más dramática en la actividad enzimática. La perturbación de regiones poco estables podría originar la exposición de sitios hidrofóbicos que dan origen a un proceso de agregación, atribuido a la desestabilización de la región interfacial y de la estructura global de la proteína, debido a la pérdida de contactos secundarios y terciarios.

Está ampliamente aceptado que el efecto hidrofóbico juega un papel esencial en la estabilidad de las proteínas, puesto que se ha observado que el interior de las proteínas globulares tiende a ser más hidrofóbico que sus superficies (Bernal, J. D., 1939, Kauzmann, W. 1959, Dill, K. A., 1990, Kamtetekar, S., 1993). Las observaciones acerca de que las interacciones hidrofóbicas guían el plegamiento de proteínas, han sido extendidas a la unión y estabilización de éstas, sugiriendo que el efecto hidrofóbico representa la mayor contribución en la asociación de proteínas y que en muchos casos, su perturbación desemboca en la formación de agregados debido a la interacción de zonas hidrofóbicas expuestas (Goto, K., 1995). Considerando estas observaciones, podemos pensar en un efecto desestabilizante de los contactos hidrofóbicos por parte de las moléculas de C8.

Los resultados de estudios teóricos obtenidos hasta el momento, nos permiten proponer al menos tres sitios potenciales de unión para la segunda molécula de compuesto 8: el primero localizado en el sitio activo, el segundo en una zona que contiene las hélices con regiones con alta tendencia de agregación y un tercero en la región interfacial. Creemos que el sitio activo es difícil de atacar puesto que los experimentos de actividad enzimática, revelan que el tipo de inhibición es no competitiva. La zona de hélices parece ser la que posee mayor probabilidad de ser atacada puesto que en ese sitio el sustrato no se une y además esa zona justamente es una de las que sufre movimientos de mayor amplitud exponiendo, probablemente, un sitio de unión al ligando que desencadene los efectos más drásticos de inhibición. Durante los ensayos experimentales se observa agregación, la realización de experimentos de cinéticas de agregación permitiría extraer mayor información al respecto. Por otro lado, a partir de los valores de energía de docking y de los cálculos de los modos normales de vibración, parece ser que el sitio de la región interfacial es el menos probable para unir la segunda molécula de C8 y generar los efectos observados sobre la estructura y función de TcTIM.

De manera general podemos decir que, la primera molécula de C8 se une a la región interfacial, los efectos de la unión se propagan y en presencia de concentraciones de sustrato fisiológicas el sitio de unión favorecido resultaría la zona de las hélices y no el del sitio activo; lo anterior provocaría la exposición de regiones hidrofóbicas con la subsiguiente agregación intra e intermolecular (la cual es observada experimentalmente). TcTIM es inhibida por C8 mediante un proceso cooperativo.

4.1.2. Obtención, mediante estudios *in silico*, de derivados de C8 con potencial inhibitorio.

La información obtenida a partir de los estudios de docking puede emplearse, por ejemplo, en el diseño de un fármaco. Para llevar a cabo lo anterior, pueden identificarse moléculas que al ser simulada su posición en el sitio de unión, proporcionan información sobre las características moleculares necesarias para lograr una buena interacción del ligando con el receptor. Si se cuenta con una molécula líder la tarea se simplifica, ya que las moléculas elegidas deben cumplir con ciertos criterios de inclusión; éstos estarán dictados por las características estructurales y químicas de la molécula líder. Para realizar la búsqueda de estas moléculas se emplean las bases de datos de compuestos orgánicos que están disponibles a través de la Internet y que provienen tanto de fuentes públicas como privadas. El proceso de búsqueda se puede realizar por subestructura o por similitud, la diferencia estriba en el tipo de información de partida con la que se cuente. La búsqueda por subestructura implica la recuperación de todas las moléculas presentes en una base de datos que contengan la subestructura definida por el usuario, independientemente del contexto en el que ésta aparezca (Willett, P., 1998). Se realiza una búsqueda por subestructura cuando se carece de una molécula de partida. Por el contrario, la búsqueda por similitud generalmente involucra la especificación de una molécula de entrada o estructura blanco. El blanco está caracterizado por uno o más descriptores moleculares y este conjunto de descriptores es comparado con cada uno de los descriptores presentes en las moléculas que constituyen la base de datos. Esta comparación permite el cálculo de una medida de similitud entre la estructura blanco y cada una de las estructuras de la base.

Las medidas de similaridad que son empleadas para cuantificar el grado de semejanza involucran, generalmente, tres componentes principales. La representación que es utilizada para caracterizar a las moléculas que son comparadas (descriptores moleculares), el esquema de pesado que es empleado para asignar diferentes grados de importancia a los varios componentes de dicha representación y el coeficiente de similaridad, el cual es utilizado para proporcionar una medida cuantitativa del grado de relación estructural entre un par de representaciones estructurales (Willett, P., 1998, Maldonado, A. G. y col., 2006). Un coeficiente de asociación normalizado, generalmente el coeficiente de Tanimoto, es empleado para obtener un valor numérico de la similaridad entre la estructura blanco y cada una de las estructuras de la base de datos, aunque pueden emplearse otros coeficientes como el de Tversky, el cual es un coeficiente de similitud asimétrico (Willett, P., 2005).

Una vez que se han seleccionado los compuestos que presentan similitud con la molécula líder, para hacer uso de ellos en los ejercicios de docking, es necesario someterlos a una serie de etapas de adecuación previas. El acondicionamiento a que deben sujetarse las moléculas es similar al discutido para el blanco. Deben añadirse átomos de hidrógeno, ya que en muchos complejos proteína-ligando están involucradas las interacciones de puentes de hidrógeno; debe darse una representación tridimensional a las moléculas, pues en la mayoría de los casos sólo se cuenta con una imagen plana o una fórmula codificada de ellas (representación 2D) (Weininger, D., 1998) y debe estimarse la carga parcial de cada uno de los átomos que constituyen al compuesto. En esta última tarea, debe considerarse que las moléculas pequeñas poseen una mayor variedad de tipos de átomo y grupos funcionales que las proteínas conocidas. Por ello, en vez de emplear tablas de valores promedio para la asignación de cargas, puede utilizarse un algoritmo basado en cálculos de electronegatividad de los átomos involucrados en cada enlace químico (Gasteiger, J. y col., 1980).

Como se mencionó anteriormente, pueden realizarse ensayos de acoplamiento e identificar y caracterizar el modo de unión de éstos a la proteína, consiguiendo describir el tipo de interacciones presentes en el complejo.

El ensamble de las características químicas y físicas, que precisan el modo específico de la asociación del ligando en el sitio de unión en la macromolécula, proporciona información que puede ser aprovechada en la construcción de un farmacóforo. Un farmacóforo puede ser definido como un conjunto de características estéricas y electrostáticas, las cuales son necesarias para asegurar una óptima interacción entre el ligando y la macromolécula (Langer, T. y col., 2004); si se han determinado los grupos farmacofóricos necesarios para la interacción con el receptor, de cualquier ligando potencial, a este grupo se le denomina farmacóforo; si se establecen relaciones geométricas entre los distintos grupos farmacofóricos, entonces se tiene un farmacóforo 3D. La contraparte de este farmacóforo estará formada por los grupos del receptor que interactúan con los grupos farmacofóricos, con lo cual podemos analizar la distribución espacial de estos grupos en el receptor y obtener una representación esquemática del sitio de unión. El conocimiento de la estructura del receptor y el análisis de un conjunto de ligandos puede proporcionar información para diseñar moléculas más potentes sobre dicho receptor. Idealmente el sitio de unión debe ser un bolsillo o hueco más o menos profundo, con una serie de grupos funcionales en las cadenas de los residuos capaces de establecer enlaces tipo puentes de hidrógeno, bien como donadores o aceptores, con ciertas propiedades hidrofóbicas y de un volumen apropiado para acoger a los ligandos.

El diseño racional de drogas esta basado en principios en los que los compuestos líderes, generalmente similares estructuralmente, son modificados hasta conseguir incrementar sus energías de unión, y con esto su potencial farmacológico (optimización de compuestos). Las modificaciones en la estructura alteran de modo inherente las características químicas de los ligandos. Se ha sugerido que puesto que los fragmentos subestructurales dictan actividades biológicas similares, éstas deben considerarse en el diseño, además de las características del sitio específico donde va a actuar. Una vez establecida la localización del sitio de unión, y contando con una base de compuestos químicos se puede recurrir al cribado virtual de alta eficacia con el fin de optimizar los posibles candidatos a fármacos. El cribado virtual consiste en evaluar compuestos procedentes de quimiotecas frente a la molécula blanco. El programa seguido proporciona un índice de complementariedad en función de las interacciones favorables en el sitio de unión.

Una etapa final en los experimentos de los compuestos ensayados *in silico*, es identificar aquellos que mejor ajusten para sintetizarlos posteriormente en el laboratorio. Con el fin de reducir el número de compuestos a preparar, se aplica la regla del 5 de Lipinski que permite filtrar los compuestos con máxima probabilidad de absorción por vía oral (Lipinski, C. A. y col., 2001). Adicionalmente, se podrán considerar otros factores como la estabilidad química y metabólica y la viabilidad de sintetizar los compuestos seleccionados. Finalmente, estos compuestos deberán ser evaluados biológicamente. Si los resultados biológicos corresponden con las perspectivas teóricas, se llevarán a cabo estudios experimentales de determinación estructural de los complejos. Estos procesos se pueden repetir de forma cíclica hasta tener una molécula que pueda considerarse como fármaco.

Durante las primeras aproximaciones del diseño, no se espera que los compuestos de trabajo manifiesten una alta afinidad por la cavidad del blanco; inclusive muchas de las soluciones encontradas podrían no ser representativas del reconocimiento molecular real.

Por esta razón, es necesario realizar un número considerable de simulaciones por computadora que logren una mejor descripción del espacio de conformaciones del ligando. Esto implica ensayar mayor número de orientaciones y optimizar cada una de ellas, e incluso permitir una mayor movilidad a la molécula orgánica a través de una revisión de sus rotámeros de menor energía. Esta metodología requiere de tiempos de cálculo por molécula relativamente grandes pero accesibles, dado que se estudia un número mucho menor de compuestos respecto al de la primera etapa de la simulación. La importancia de tener orientaciones confiables de los ligandos radica en que éstas permiten postular hipótesis sobre las características moleculares de la unión y la manera en que podrían modificarse las estructuras para aumentar su afinidad (o selectividad) por el blanco. Con base en esas premisas es posible diseñar derivados de los compuestos líderes sobre los que se realicen nuevas simulaciones del reconocimiento molecular, así como pruebas de laboratorio de su capacidad inhibitoria sobre el blanco.

Toda esta información permite conocer detalles específicos de la fisicoquímica de la interacción proteína-ligando, tales como la naturaleza polar o hidrofóbica de los grupos participantes, la existencia de grupos ionizables involucrados en el reconocimiento, la cooperatividad y el tipo de proceso de inhibición e incluso la identificación de los puentes de hidrógeno más importantes para la asociación. Este trabajo genera por una parte, un nuevo grupo de compuestos líder caracterizados y con afinidad mejorada; y por otra, información que ayuda a ratificar o rectificar las hipótesis sobre los detalles de la unión, con lo que se retroalimenta el proceso de diseño y ensayo. El proceso descrito puede conducir al descubrimiento de moléculas cuya afinidad, medida por su constante de inhibición (K_i), se encuentra del orden de mili o micromolar en la etapa de selección de líderes, y hasta de nano o picomolar cuando se han localizado los mejores derivados de estos líderes. La selectividad también mejora durante este proceso, aunque en ocasiones es necesario comprometer uno de estos dos factores para favorecer al otro. Finalmente, lo ideal sería que las simulaciones realizadas originalmente *in silico* y que propusieron a los ensayos *in vitro* se conviertan en experimentos *in vivo*; pues debe probarse que los compuestos que muestran gran afinidad y selectividad por el blanco no interfieren significativamente con otros procesos dentro de un organismo, y que los productos de degradación del ligando tampoco resulten ser tóxicos; aunque para llegar a esta etapa se requiere de periodos de tiempo largos.

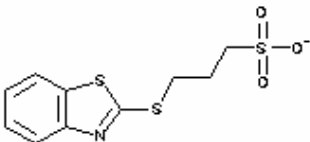
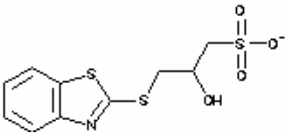
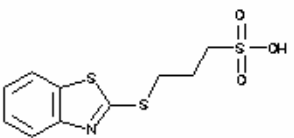
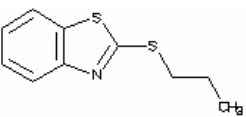
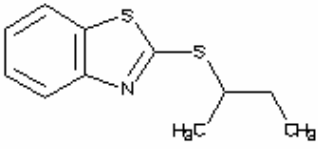
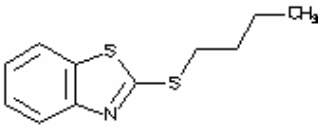
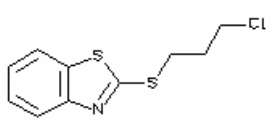
En esta etapa de nuestro trabajo de investigación, obtuvimos compuestos similares a nuestra molécula líder (C8), se generó un farmacóforo y a partir de éste se construyó una quimioteca. Esta quimioteca se empleó para realizar un ejercicio de cribado virtual y finalmente se identificaron una serie de compuestos líderes que pueden ser considerados como guías en el diseño de fármacos contra la enfermedad de Chagas.

4.1.2.1 Búsqueda de compuestos similares a C8 (molécula líder) y localización de sitios de unión en la estructura de TcTIM.

Con la molécula blanco preparada y con sitios de unión seleccionados, se realizó una búsqueda de moléculas similares al C8 en bases de datos de compuestos químicos (Xue, L. y col., 2004). Se determinó que la base de datos en la que se buscarían los compuestos similares sería la base de estructuras químicas conocida como ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>), ya que cuenta con una gran variedad de catálogos, además de permitir hacer búsquedas de compuestos similares por subestructura o empleando criterios químicos, utilizando el criterio de similitud de Tversky o de Tanimoto (Chen, J. y col., 2005); una ventaja durante la búsqueda es que éste toma la forma del coeficiente de Tanimoto cuando los valores de α y β valen 1, y el de Dice cuando éstos valen 0.5 (Willett, P., 1998).

La información requerida para realizar la búsqueda involucró propiedades como peso molecular, valor del coeficiente de partición octanol-agua, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, número de enlaces rotables, y códigos SMILES, Zinc, etc. Concluida la búsqueda, se obtuvo una lista de compuestos similares. De éstos se eligieron los primeros seis (con valores de similitud entre 90.7 y 75.5%, tabla 10) para realizar el docking sobre toda la superficie y localizar sitios potenciales de unión.

Tabla 10. Compuestos similares a la molécula líder (C8), obtenidos empleando la base de datos de ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>). Los valores de α y β se fijaron en 1 (Coeficiente de Tanimoto).

Molécula	Estructura	% Similitud
PS100		100
ChemDB2		90.7
ChemDB3		86.4
ChemDB4		80.0
ChemDB5		79.4
ChemDB6		76.5
ChemDB7		75.5

Al realizarse el docking de cada uno de los seis compuestos, sobre toda la superficie de TcTIM, se identificaron sitios de unión para los análogos del ligando; observándose que generalmente, predominaban dos sitios (HSA y HH). Se identificaron los residuos que se encontraban constituyendo los sitios potenciales de unión, con ayuda del servidor CASTp (<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>), y se definieron los huecos a los que correspondían (anexo IV).

Las energías de docking más bajas se muestran en la tabla 11, las mejores soluciones se encontraron localizadas en el sitio activo, de la subunidad A, de la proteína (HSA).

Tabla 11. Resumen de los datos de energía de docking más bajos, correspondientes a los compuestos obtenidos del ChemDB. El docking se llevo a cabo sobre toda la superficie de TcTIM (empleando los parámetros listados en la tabla 7).

Identificador	Energía estimada de docking (kcal/mol)
ChemDB2-HSA	-11.43
ChemDB3-HSA	-10.19
ChemDB4-HSA	-7.98
ChemDB5-HSA	-8.29
ChemDB6-HSA	-8.26
ChemDB7-HSA	-8.20

En todos los casos, los sitios de unión involucraron predominantemente a HSA y HH, respectivamente; una vez más se corroboró que eran estos los sitios más probables de unión de ligandos pequeños en la superficie de TcTIM. Se eligieron dichos sitios para realizar un docking con mayor resolución y comparar los valores de energía estimada, además de los valores de las constantes de inhibición con los obtenidos para el C8. Los resultados se muestran a continuación.

4.1.2.1.1. Cavidad que da acceso a la zona de hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación (HH).

En el caso del docking llevado a cabo en la zona de las hélices que dan acceso a las hebras que contienen regiones con tendencia a agregar se encontraron los siguientes valores:

Tabla 12. Resumen de los datos de energía de docking de los análogos del compuesto 8, además de los valores de las constantes de inhibición. Se muestra únicamente el resultado que ocupó la primera posición de acuerdo a la función de evaluación de Autodock 3.0.5.

Identificador	Energía estimada de docking (kcal/mol)	Constante de inhibición K_i (Temperatura = 298.15 K)
ChemDB2-HH	-10.20	+1.57e-06
ChemDB3-HH	-10.00	+2.49e-06
ChemDB4-HH	-7.32	+2.80e-05
ChemDB5-HH	-7.54	+2.22e-05
ChemDB6-HH	7.70	+2.54e-05
ChemDB7-HH	-7.77	+2.22e-05

Las soluciones observadas de manera conjunta en HH (fig. 30), permiten apreciar que los compuestos con mejores valores de energía muestran el anillo de benzotiazol orientado hacia el exterior del hueco, estableciendo interacciones hidrofóbicas, generalmente, con el residuo de Lys157, Glu158 e Ile203.

Las cadenas alifáticas de ChemDB2 y ChemDB3, presentan interacciones de al menos tres puentes de hidrógeno con Arg208, característica que no se encuentra presente en los compuestos restantes (fig. 31).

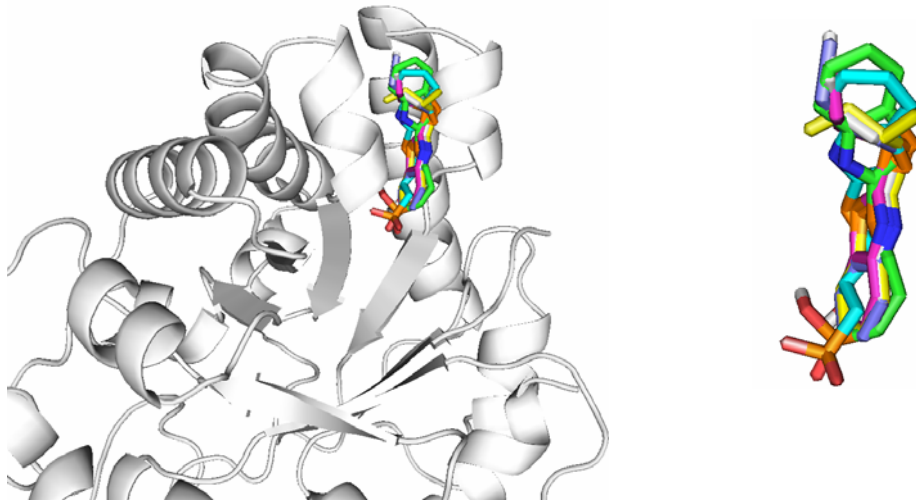


Figura 30. Localización espacial de las configuraciones de menor energía de los compuestos similares a C8 en HH. Las imágenes fueron generadas empleando el visualizador de Pymol 0.9.7.

En las siguientes figuras, se pueden visualizar las interacciones que establecen los compuestos con mayor energía de docking (ChemDB2 y ChemDB3), con algunos residuos de aminoácidos del receptor.

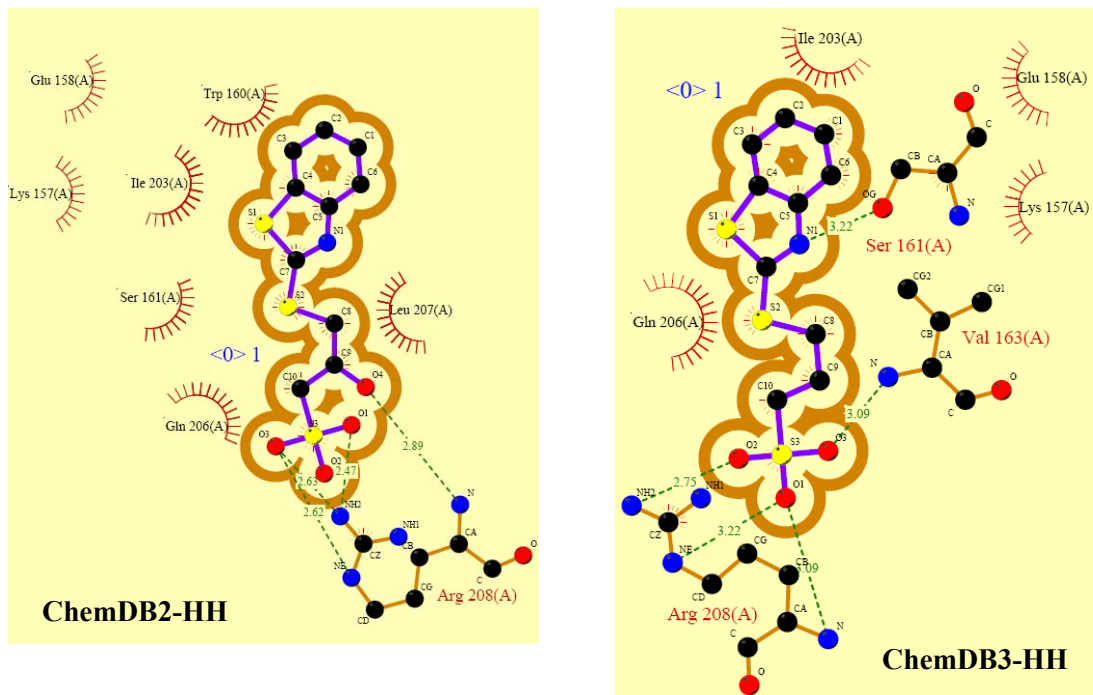


Figura 31. Identificación de las interacciones establecidas entre dos compuestos similares al C8 y TeTIM. Los contactos hidrofóbicos se distinguen como semiesferas rojas, los puentes de hidrógeno en línea punteada verde y la accesibilidad al solvente como la línea marrón que delimita a la molécula. Figura generada empleando el programa LigPlot 4.4.2.

Pareciera ser que la presencia del anillo de benzotiazol es esencial para el establecimiento de una buena interacción, aunque no tan significativo como el grupo sulfato, a juzgar por el número de contactos que establece con parte de los residuos que constituyen el sitio.

4.1.2.1.2. Cavidad que da acceso a la región interfacial (HRI).

En el caso del hueco que da acceso a la región interfacial (HRI), todas las soluciones presentan una energía de docking semejantes que las obtenidas para HH.

Tabla 13. Resumen de los datos de energía de docking de los análogos del compuesto 8, localizados en el hueco de la región interfacial. Se muestran los valores de las constantes de inhibición.

Identificador	Energía estimada de docking (kcal/mol)	Constante de inhibición K_i (Temperatura = 298.15 K)
ChemDB2-HRI	-10.69	+1.10e-07
ChemDB3-HSA	-10.48	+1.41e-06
ChemDB4-HSA	-7.77	+1.42e-05
ChemDB5-HSA	-8.40	+4.82e-06
ChemDB6-HSA	-8.35	+8.55e-06
ChemDB7-HSA	-8.29	+8.43e-06

Cuando se observan las soluciones de manera simultánea se aprecia que, en todos los casos, el anillo de benzotiazol se encuentra orientado hacia el exterior del hueco (fig. 32).

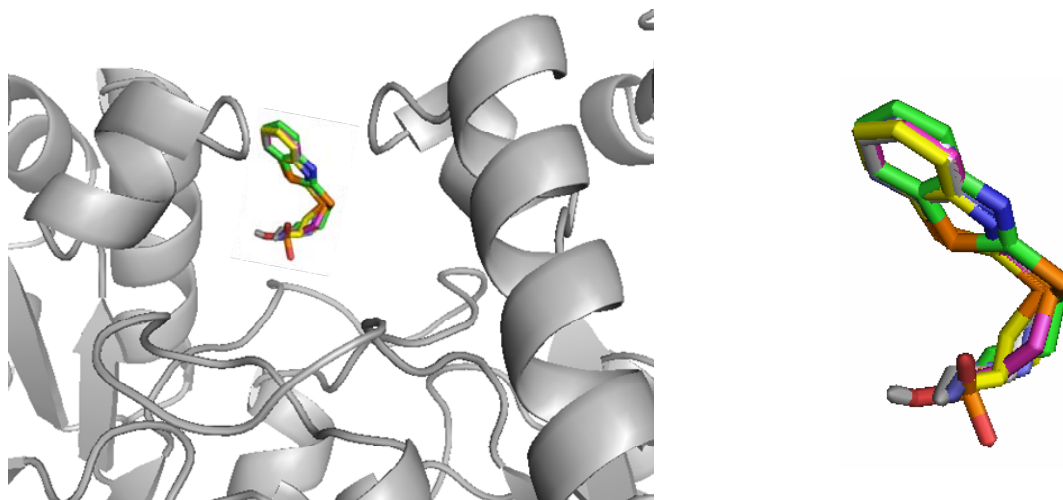


Figura 32. Localización espacial de las configuraciones de menor energía de los compuestos similares a C8 en HRI. Las imágenes fueron generadas empleando el visualizador de Pymol 0.9.7.

Nuevamente los compuestos con mejores energías de docking corresponden a ChemDB2 y ChemDB3, y en este caso la diferencia también radica en el tipo de interacciones establecidas mediante la cadena alifática. Se observan nuevamente al menos tres interacciones de puentes de hidrógeno con residuos de aminoácidos cargados; entre ellos la His48_A, Lys14_A, Arg99_A, además de Gly. Las interacciones del anillo aromático se establecen con residuos de características variadas; hidrofóbicos como la Val79_A, la Ile83_A y la Leu47_A, y polares sin carga como la Ser18_B.

Puede observarse que los compuestos con mayor porcentaje de similitud -tanto en HRI, como en HH- presentan menores energías de docking. Estas moléculas difieren estructuralmente de la molécula blanco en un grupo hidroxilo y en la presencia de una carga adicional (posibilidad de formar puentes de hidrógeno); además de conservar el núcleo de benzotiazol, que se creó, es el que permite el establecimiento de una interacción π entre anillos de residuos aromáticos en la región interfacial en el complejo 1SUX (Espinosa-Fonseca, L. y col., 2004). Los otros compuestos carecen del grupo sulfato y por lo que se observa en los ejercicios de docking, éste es un factor clave en el establecimiento de interacciones con la enzima. El grupo sulfato en el archivo 1SUX, queda suspendido en el espacio en la estructura cristalográfica resuelta mediante cristalografía de rayos-X por lo que se piensa que la posición reportada es un artificio generado por la presencia de otras unidades en el cristal.

4.1.2.2. Obtención de un farmacóforo a partir de complejos proteína/ligando.

A partir de los resultados obtenidos con los ejercicios de docking fue viable identificar, en base a la presencia de átomos y grupos funcionales, un farmacóforo. En éste, la importancia de cada uno de los grupos presentes en la molécula en el proceso de interacción proteína-ligando, da la pauta para la generación de una quimioteca que puede ser empleada en un proceso de cribado virtual y la posterior identificación de nuevas moléculas líderes. Por otro lado, dado que la contraparte de este farmacóforo está formada por los grupos del receptor que interaccionan con él, podemos analizar la distribución espacial de estos grupos y obtener una imagen esquemática del sitio de unión. La caracterización del farmacóforo se llevó a cabo mediante el análisis de los complejos del C8 y los ligandos seleccionados, empleando el programa LigandScout 1.0.2. En general, el comportamiento químico de los compuestos, en el ambiente de cada uno de los dos huecos (HRI y HH), proporcionó información que convergía en la identificación de grupos dentro de la molécula que le confería la capacidad de formar interacciones favorables. En el caso de C8, el farmacóforo obtenido reveló la necesidad de conservar dos aceptores de puente de hidrógeno y tres zonas que permitieran el establecimiento de interacciones hidrofóbicas, siendo los anillos del grupo de benzotiazol y la zona comprendida por los carbonos 1 y 2 de la cadena alifática (fig. 33).

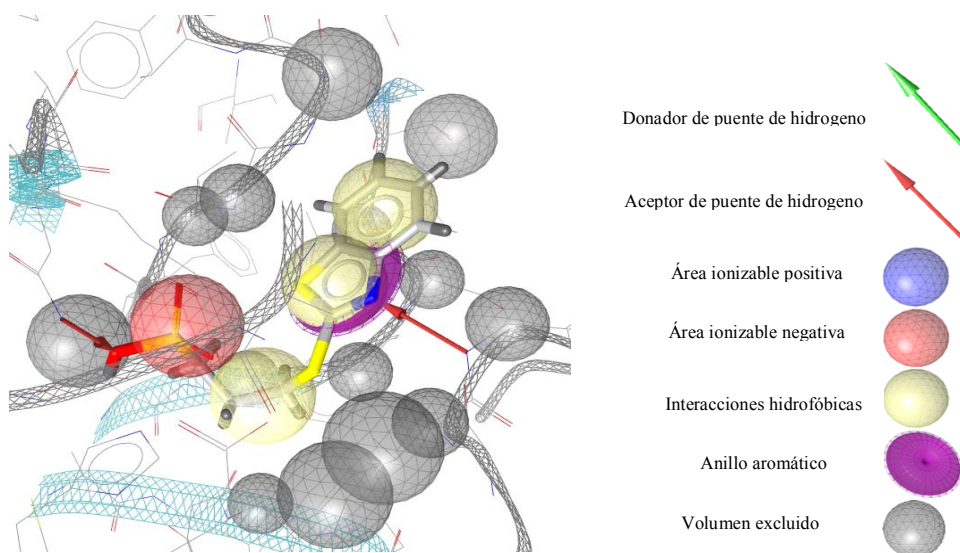


Figura 33. Identificación de los grupos necesarios, dentro de la molécula de C8, para lograr una buena interacción con la macromolécula. Las interacciones establecidas entre C8 y TcTIM estarán dictadas por la presencia de éstos. El sitio de unión corresponde a HRI. Se utilizó el programa LigandScout 1.0.2 para la visualización del complejo.

El caso de los compuestos similares a C8 no distó mucho de lo encontrado para C8. Los siguientes resultados corresponden al sitio que da acceso a las hélices que contienen residuos con tendencia a agregar (HH) (fig. 34).

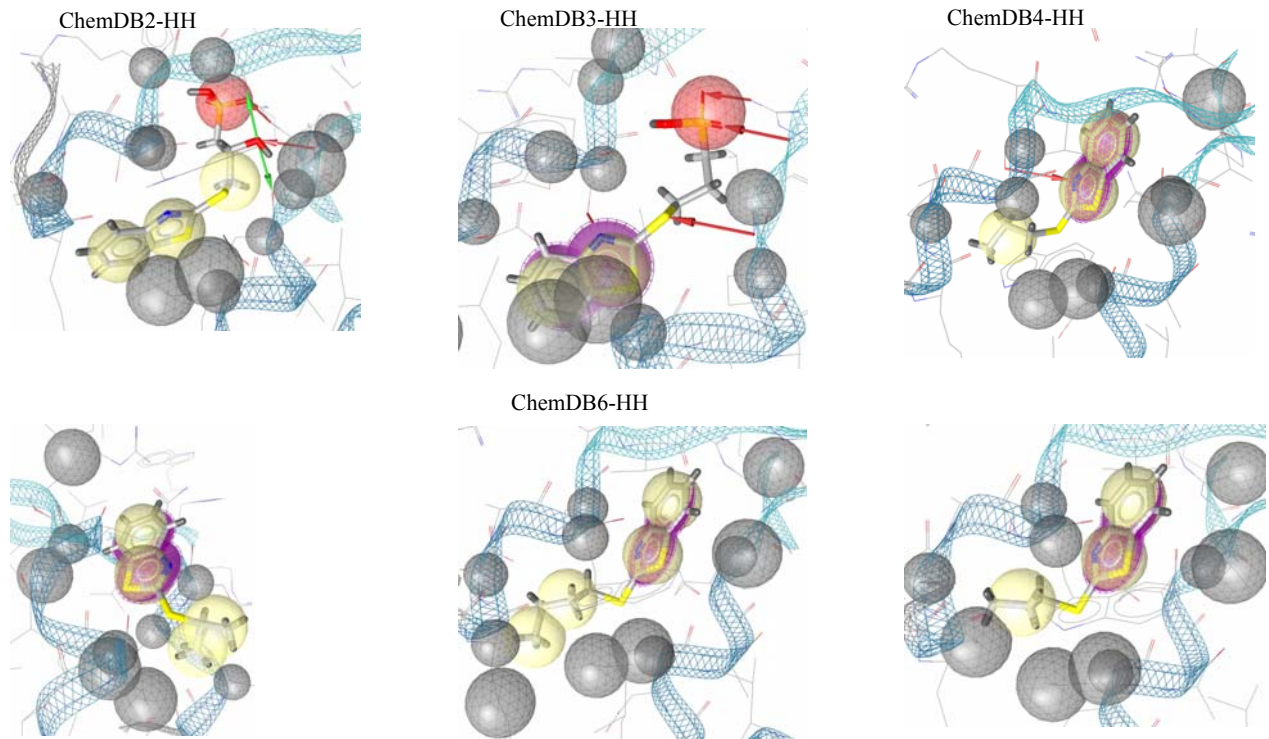


Figura 34. Identificación de los grupos presentes en los compuestos similares a C8 necesarios para lograr una buena interacción con TcTIM. Se utilizó el programa LigandScout 1.0.2 para la visualización de los complejos.

La alineación de los farmacóforos correspondientes a las moléculas obtenidas de ChemDB proporcionó una imagen global de las características que debíamos mantener al realizar búsquedas de compuestos para generar quimiotecas a partir del compuesto líder (C8) (fig. 35-A y B), este análisis nos permitió determinar que el farmacóforo debía conservar tres zonas capaces de establecer interacciones hidrofóbicas y dos zonas de interacciones mediadas por cargas (C).

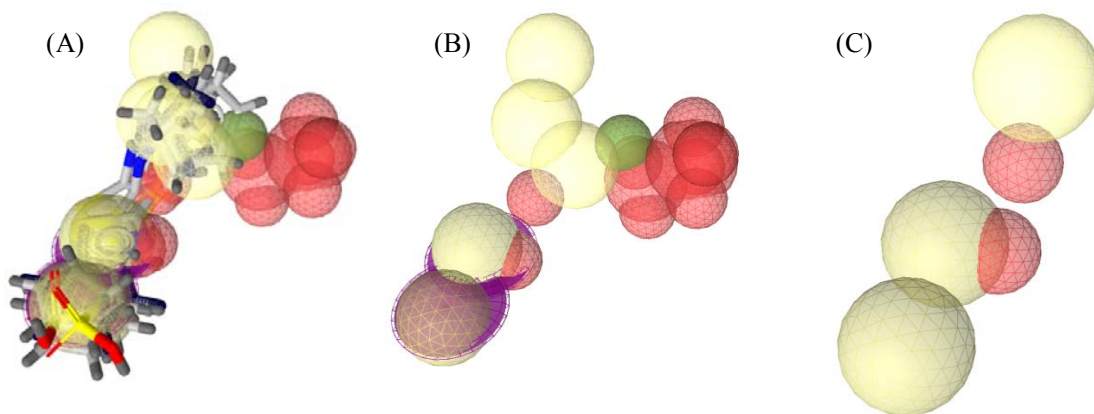


Figura 35. Identificación de los grupos presentes en los compuestos similares a C8 necesarios para lograr una buena interacción con TcTIM en la región que da acceso a las hélices constituidas por residuos con alta tendencia a agregar. Se utilizó el programa LigandScout 1.0.2 para la visualización del farmacóforo.

Cuando la generación del farmacóforo se realizó sobre el hueco que da acceso a la región interfacial se observó lo siguiente (fig. 36).

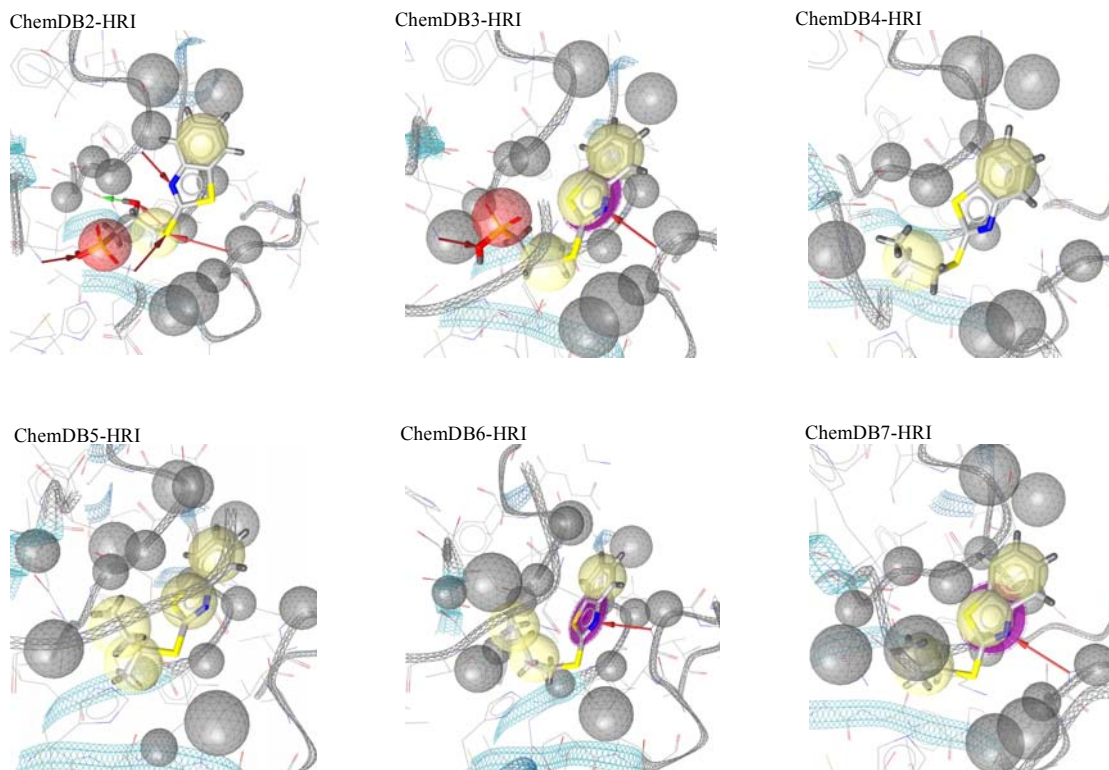


Figura 36. Identificación de los grupos presentes en los compuestos similares a C8 necesarios para lograr una buena interacción con TcTIM en la zona de la región interfacial. Se utilizó el programa LigandScout 1.0.2 para la visualización de los complejos.

Nuevamente, la alineación de los farmacóforos permitió tener una imagen global de las características que se debían conservar al realizar búsquedas de compuestos para generar quimiotecas a partir de C8 (fig. 37-A y B), este análisis nos permitió determinar que el farmacóforo debía conservar tres zonas capaces de establecer interacciones hidrofóbicas y una zona de interacción mediada por carga (C).

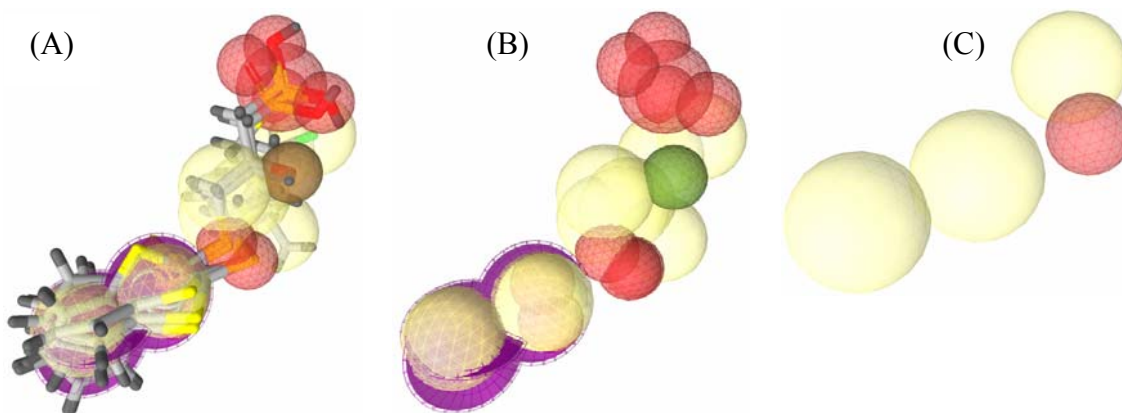


Figura 37. Identificación de los grupos presentes en los compuestos similares a C8 necesarios para lograr una buena interacción con TcTIM en el sitio activo. Se utilizó el programa LigandScout 1.0.2. para la visualización del farmacóforo.

Se logró obtener dos farmacóforos a partir del docking de distintos compuestos con características similares a C8. Estos sirvieron como base en la búsqueda o construcción de moléculas con capacidad de unirse selectivamente a la región interfacial o a la zona de acceso a hebras inestables. El farmacóforo obtenido a partir de la molécula líder también se empleó en la generación de quimiotecas para su posterior cribado virtual.

4.1.2.3. Generación de las quimiotecas empleadas en los ejercicios de cribado virtual.

El análisis de los dos farmacóforos, permitió determinar que en el proceso de generación de las quimiotecas, la distribución de las regiones debía ser: dos zonas con capacidad para establecer interacciones hidrofóbicas alejadas por una distancia de 3.85 Å, y una zona con capacidad para formar interacciones por carga alejada en el espacio de otra zona con capacidad de formar interacciones hidrofóbicas por una distancia de 2.75 Å. Con esta información y la proveniente del análisis de estructura química de C8 y su farmacóforo, se procedió a la construcción de una quimioteca para emplearla posteriormente en ejercicios de cribado virtual; se propuso introducir los siguientes parámetros en el proceso de búsqueda en distintas bases de compuestos químicos (sección 2.2.1.6) (tabla 14).

Tabla 14. Parámetros utilizados para realizar la búsqueda de los compuestos que constituirán la quimioteca empleada en los ejercicios de cribado virtual. Datos arrojados del alineamiento de los dos farmacóforos identificados.

Tamaño y flexibilidad	
Anillos	2
Enlaces rotables	6
Átomos aromáticos	9
Características químicas y polaridad	
CLogP	3.747
Aceptores de puente de hidrógeno	2
Donadores de puente de hidrógeno	0
Área ionizable negativa	1
Área ionizable positiva	0

Se obtuvieron así, dos de las tres quimiotecas empleadas en los ejercicios de cribado virtual. Éstas se construyeron a partir de los compuestos depositados en la base de datos denominada eMolecules (www.emolecules.com). Adicionalmente se trabajó con la quimioteca comercial de Maybridge, de la que se tienen los compuestos para ensayos *in vitro*.

En el siguiente capítulo se describe la estrategia seguida en la realización del cribado virtual de quimiotecas, el análisis de los resultados obtenidos y las propuestas de modificaciones químicas a realizarse sobre C8, para incrementar su capacidad para unirse de manera selectiva a TcTIM e inhibir su función.

5. Métodos computacionales empleados en el descubrimiento de fármacos potenciales. Cribado virtual de quimiotecas (Virtual Screening, VS).

Un paso crítico durante el proceso de descubrimiento de fármacos, es la identificación de un cabeza de serie o *lead*. Al compuesto que produce *in vitro* una inhibición del 50% de la actividad, a una concentración alrededor de 10 μM se le considera un buen *lead*. Una vez que se ha identificado dicho *lead*, tiene lugar la etapa de *lead optimization*, cuyo objetivo es mejorar la eficacia terapéutica, incluyendo el incremento de la potencia frente a una diana o *target*, selectividad frente a otras dianas relacionadas, farmacocinética, minimización de su toxicidad y efectos secundarios (Álvarez, J., 2005, Jorgensen, W. L., 2004).

En ensayos llevados a cabo *in vitro*, el proceso de descubrimiento de fármacos, requiere una quimioteca de cientos de miles de compuestos y un método de ensayo de actividad, estos ensayos son conocidos como HTS, de las siglas en inglés de *High-throughput Screening* (Böhm, H. J. y col., 2000). En un experimento de HTS, los compuestos que resultan positivos (HTS *hits*) son nuevamente probados para confirmar la actividad y estructura. Esta etapa de identificación de HTS *hits* tiene un éxito inferior al 0.1%. Aproximadamente el 60% de los HTS *hits*, se confirman como activos reales, ya que existe un gran número de falsos positivos que interfieren con los ensayos biológicos, de agregantes promiscuos y de interferencias causadas por los tintes y compuestos fluorescentes utilizados durante los ensayos. Cuando se identifica un gran número de HTS *actives* pertenecientes a una misma familia química, se considera que se ha identificado una serie de *leads*. Cuando es posible optimizar estos *leads*, se habla de *drug candidate*. Típicamente, solo el 0.1% de los HTS *actives* alcanza este nivel y únicamente 1 de cada 10 *drug candidates* supera las pruebas clínicas convirtiéndose en *drug* (Oprea, T. I., 2003). Esta baja tasa de éxito, junto con el costo de las técnicas, ha hecho que se replantee la aportación del HTS y las ventajas que ofrece el diseño de fármacos asistido por computadora, conocido generalmente como cribado virtual de quimiotecas (*Virtual Screening* (VS)).

Dado que las técnicas de VS requieren, inevitablemente, que se conozca la actividad de algunos compuestos o bien la estructura de la diana biológica, las aplicaciones a una amplia gama de padecimientos se ven acotados por el avance en las determinaciones de los factores bioquímicos involucrados en la generación de las enfermedades. Cabe mencionar que más que una alternativa, el VS supone un complemento al HTS y un criterio para establecer prioridades en la síntesis y la adquisición de quimiotecas; las técnicas de HTS y VS tienen la finalidad de facilitar y contribuir a la comprensión de los mecanismos bioquímicos de acción de los fármacos, así como de agilizar y reducir el coste del proceso.

Los posibles *hits* determinados por HTS son reales, aunque por si solos, no contribuyen a ampliar el conocimiento del modo de interacción con su diana farmacológica. Por otra parte, el VS propone potenciales *hits* que no tienen porqué ser accesibles sintéticamente; sin embargo, aporta información acerca del modo de interacción fármaco-diana. Estas técnicas son relativamente baratas, rápidas y permiten evaluar un número de compuestos *in silico* del orden de billones, cifra impensable experimentalmente. Las técnicas de selección de compuestos derivadas de VS se clasifican en dos grandes grupos, dependiendo de cómo se extrae la información que requieren. A aquellas que se basan en la estructura de inhibidores ya determinados, se les denomina métodos indirectos o métodos basados en la estructura del ligando (*Ligand-Based Virtual Screening*), mientras que los métodos que utilizan la estructura del receptor se denominan directos o basados en la estructura del receptor (*Structure Based o Receptor-Based Virtual Screening*). Dentro de las aproximaciones basadas en ligandos se encuentran las búsquedas de similitud a compuestos activos y la obtención de modelos farmacofóricos.

Por otra parte, el *docking*, que modela el acoplamiento entre proteína y ligando -desde el punto de vista estructural y energético-, y el diseño de novo (*de novo design*) corresponden a métodos directos.

Una vez establecida la localización del sitio de unión, y contando con una base de compuestos químicos se puede recurrir al cribado virtual de alta eficacia con el fin de optimizar los posibles candidatos a fármacos. El cribado virtual consiste en evaluar compuestos procedentes de quimiotecas frente a la molécula blanco. El programa seguido proporciona un índice de complementariedad en función de las interacciones favorables en el sitio de unión, evaluadas por la función de score elegida (Wang, R. y col., 2003). Una etapa final en los experimentos de los compuestos ensayados *in silico*, es identificar aquellos que mejor ajusten para sintetizarlos posteriormente en el laboratorio. Con el fin de reducir el número de compuestos a preparar, se aplican las reglas de Lipinski que permite filtrar los compuestos con máxima probabilidad de absorción por vía oral. Éstas se consideran como uno de los primeros pasos del VS para detectar moléculas con una pobre absorción, ya que filtra las moléculas en función de su peso molecular (≤ 500 g/mol), su lipofilia, medida en función de su coeficiente de partición octanol-agua (LogP, ≤ 5) y el número de donadores (≤ 5) y aceptores de puente de hidrógeno (≤ 10). Se considera que un compuesto que no satisfaga dos o más de estos criterios tiene una baja probabilidad de convertirse en un buen fármaco. Además, normalmente esta regla se extiende con la condición de que el número de enlaces rotables sea inferior a 10 (Lipinski, C. A. y col., 2001). Adicionalmente, se podrán considerar otros factores como la estabilidad química y metabólica y la viabilidad de sintetizar los compuestos seleccionados. Finalmente, estos compuestos deberán ser evaluados biológicamente. Si los resultados biológicos corresponden con las perspectivas teóricas, se llevarán a cabo estudios experimentales de determinación estructural de los complejos. Estos procesos se pueden repetir de forma cíclica hasta tener una molécula que pueda considerarse como fármaco.

5.1. Cribado virtual de quimiotecas empleando el conjunto de programas de FRED.

FRED, de las siglas en inglés de Fast Rigid Exhaustive Docking, es un programa utilizado para la realización de docking exhaustivo proteína-ligando, generalmente empleado en procesos de cribado virtual debido al tiempo reducido de docking (el tiempo típico de docking es de unos pocos segundos por ligando) y a las múltiples maneras de trabajar, éstas se enlistan a continuación:

Combinación de ligandos y diseño basado en estructura. FRED puede emplear un archivo conteniendo un ligando unido a un sitio activo y realizar un diseño basado en estructura.

Forma del sitio en el receptor. FRED puede emplear un método que le permite determinar la forma de un sitio activo, detectando acertadamente las posiciones incorrectas. Esta tecnología puede ser utilizada para detectar sitios activos sobre una proteína cuando estos no son conocidos *a priori*.

Estructura consenso. Este método selecciona correctamente una posición de un conjunto de candidatos similares, utilizando el consenso de múltiples funciones de puntaje. Este método compara diferentes posiciones del mismo ligando, y no tiene que ver con el “escore consenso”, el cual es utilizado en la comparación ligando-ligando. Las estructuras obtenidas después del docking exhaustivo, empleando una o más funciones de puntaje, son ordenadas según la energética asociada a la propia estructura.

De manera general, el método de docking que sigue FRED es el siguiente. Primero, lee un archivo de multi-conformeros de las moléculas que serán probadas. Se realiza entonces un docking exhaustivo, en el que FRED posiciona en una región de la proteína (previamente definida), el conformero de un ligando en todas las posiciones que puede adquirir como consecuencia de la rotación y traslación del conformero rígido. FRED elimina todas las conformaciones que chocan con la proteína y opcionalmente elimina todas las posiciones que no satisfacen las restricciones definidas por el usuario (por ejemplo, las restricciones de un farmacóforo). Una vez que se ha llevado a cabo lo anterior, FRED ordena las posiciones que sobrevivieron usando una función de puntaje. Selecciona las mejores soluciones para cada ligando, empleando un método de consenso.

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de salida son las que se unen más eficientemente al receptor. Si esto es considerado como criterio para la identificación de moléculas que pueden servir como fármacos potenciales, se puede decir que se ha logrado identificar una serie de *leads*. El cribado virtual permite identificar una serie de compuestos que pueden ser empleados como molde en el diseño de fármacos.

En una etapa previa del trabajo de investigación, se obtuvieron compuestos similares a nuestra molécula líder (C8), se generó un farmacóforo y a partir de éste se construyeron dos quimiotecas. Dichas quimiotecas se emplearon, en esta etapa del proyecto, para realizar un ejercicio de cribado virtual y finalmente identificar una serie de compuestos líderes que puedan ser considerados como guías en el diseño de fármacos contra la enfermedad de Chagas. Las quimiotecas generadas, denominadas eMolecules I (4363 compuestos) y eMolecules II (6899), se construyeron a partir de las especificaciones dictadas por el farmacóforo obtenido previamente. Se realizó una búsqueda de moléculas en distintas bases de compuestos químicos. Se determinó que la base de datos en la que se buscarían los compuestos sería la base de estructuras químicas conocida como eMolecules (www.emolecules.com). La información requerida para realizar la búsqueda involucró propiedades como peso molecular, valor del coeficiente de partición octanol-agua, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, además de número de enlaces rotables. Concluida la búsqueda, se obtuvieron dos listas de compuestos que en conjunto constituyeron una quimioteca de más de 11,000 compuestos. Adicionalmente, se trabajó con la quimioteca de Maybridge, de la que se tiene los compuestos para ensayos *in vitro*.

5.1.1. Validación del método y definición de parámetros. Cribado virtual de nueve complejos proteicos.

Como se mencionó en la metodología, se realizó el cribado virtual sobre nueve complejos proteicos. Los complejos de prueba (proteína con un ligando) fueron empleados para obtener los archivos en formato OpenEye Binary (.oeb), utilizando las herramientas de FRED receptor; con ellos se realizaron los cribados de las quimiotecas de ligandos.

Durante el proceso de docking, el número de conformaciones examinadas en el sitio de unión es restringido por la generación de mallas en las que deben colocarse (estrictamente) los átomos del ligando. Estas mallas se definen en función del tamaño del ligando y del sitio de unión, se consideran penalizaciones por posibles contactos del ligando con el receptor, que impliquen impedimentos estéricos por superposición de nubes electrónicas. Para examinar los resultados, se utilizó el visualizador VIDA2, puesto que éste fue elaborado para reconocer el formato de trabajo (.oeb). VIDA2 forma parte de los programas de FRED v2.1. y una vez preparados los receptores se realizó el cribado de las quimiotecas empleando el conjunto de programas de FRED v2.1.

FRED realiza el proceso del docking en una serie de pasos, en el que la salida de uno constituye la entrada del siguiente. Primeramente, lee el archivo de los multiconformeros de los ligandos que serán probados. Con éstos realiza un docking exhaustivo, posicionando por movimientos de rotación y translación a cada conformero de cada ligando rígido en el sitio de unión, descartando todas las posiciones que chocan con la proteína. Opcionalmente (como sucedió en el caso de TcTIM y las quimiotecas de interés), descarta todas las posiciones que no encajan en las restricciones definidas por el usuario, por ejemplo restricciones de farmacóforo. A continuación asigna puntuaciones a las posiciones empleando la función de puntuación elegida, en nuestro caso Chemgauss3, reteniendo las 100 mejores posiciones. De éstas, selecciona la mejor posición de cada ligando empleando un método consenso, para ejecutar el paso de optimización, en el que se realizan pequeñas variaciones a la estructura (de ángulos, por ejemplo), para explorar con más detalle las soluciones que ya se han obtenido. En este paso, se evalúan las posiciones con las distintas funciones de puntaje, reteniendo 1 de cada 100 y con estas se ejecuta un último ejercicio de docking en el que se emplean las distintas funciones de puntaje, para retener las mejores posiciones de los compuestos de las quimiotecas.

En nuestro caso, el último paso del ejercicio de docking se realizó empleando siete de las diez distintas funciones de puntaje disponibles en el conjunto de programas de FRED: Chemgauss2, Chemgauss3, Chemscore, OEChemscore, Plp, Screenscore, Shapegauss. Utilizar esta cantidad de funciones tuvo la finalidad de evaluar cual de ellas permitía recuperar con más eficacia los compuestos activos frente a los inactivos.

Los datos de salida se utilizaron para generar las gráficas “ROC” (de las siglas en inglés de Receiver Operating Characteristic). Estas gráficas permiten discriminar entre dos poblaciones en una prueba determinada (Triballeau, N., 2005), en nuestro caso, el área bajo la curva representa la posibilidad de recuperar un ligando activo antes que uno inactivo. Así, lo ideal es tener una pendiente muy pronunciada hacia el inicio, puesto que eso indicará que el método de docking predice y asigna correctamente las posiciones de los compuestos considerados como activos, posicionándolos como aquellos compuestos con una mejor fuerza estimada de unión con el receptor. Lo anterior es muy importante, puesto que la validación del método en nuestro estudio, estaría respaldado por datos experimentales que son correctamente predichos por métodos computacionales.

Los resultados para cada complejo, se muestran en la figura 38. En el eje de las x tenemos representados a cada uno de los receptores, en el eje de las y se muestran los valores del área bajo la curva, obtenidos de las graficas “ROC”.

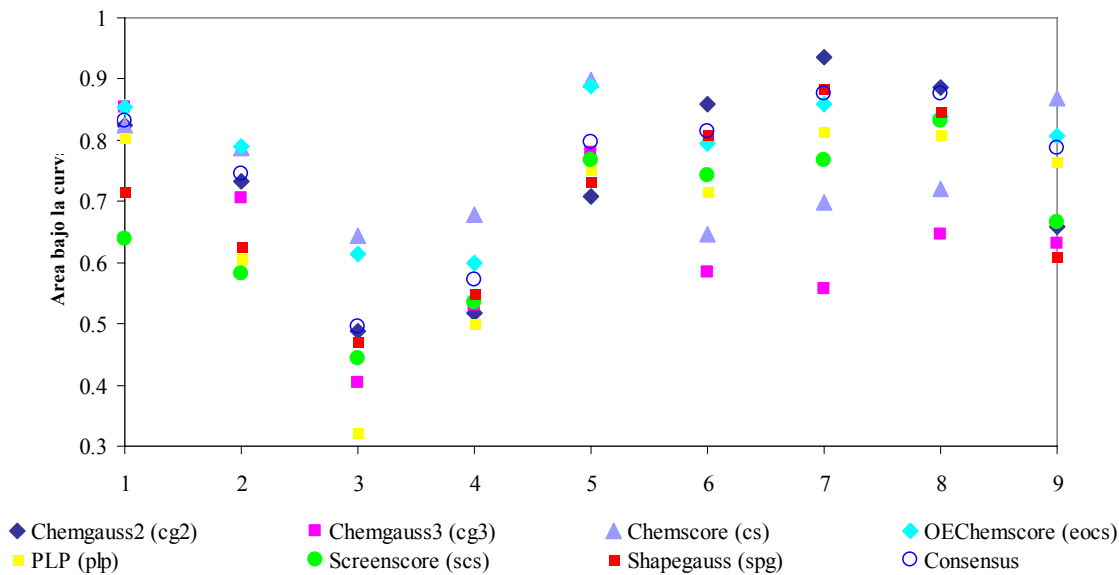


Fig. 38. Se muestra las moléculas de los complejos de prueba, (1) neuraminidasa, (2) CDK2, (3) p38MAP, (4) ERajac, (5) ERasta, (6) fXafon, (7) fXajac, (8) fXajor y (9) acetilcolinesterasa. El docking se realizó empleando las funciones de puntaje enlistadas en la figura. Se observa la tendencia en la capacidad de recuperar un ligando activo antes que uno inactivo en el proceso del cribado de las quimiotecas. Del análisis de las graficas ROC, puede determinarse que las funciones de evaluación que recuperan más eficientemente a los ligandos activos son OEChemscore (en cian) y Chemscore (en lila).

Al realizar el docking con FRED, por defecto la función de puntuación empleada es Chemgauss3 (en rosa), de la gráfica podemos observar que la eficiencia de esta función no es la mejor para trabajar con nuestros complejos. Por el contrario, OEChemscore (en cian) y Chemscore (en lila), parecen evaluar de manera más eficiente el conjunto de ligandos constituyentes de la mayoría de las quimiotecas.

La función de Chemscore, está constituida por la suma de las contribuciones lipofílicas (interacciones entre átomos lipofílicos), de las contribuciones de las interacciones de tipo puente de hidrógeno (entre donadores y aceptores de puentes de hidrógeno); además de las interacciones entre metales (cuando éstos existen) y el receptor. También considera las penalizaciones por el choque del ligando con el receptor y por la pérdida de entropía debida a la incapacidad de los enlaces rotables de rotar libremente en el sitio de unión. La función de OEChemscore es idéntica a Chemscore, excepto en que en el término correspondiente a los enlaces rotables incorpora reglas ligeramente distintas dependientes del tipo de átomos involucrados en el enlace.

Se puede concluir que ambas funciones permiten recuperar, eficientemente, un compuesto activo antes que un compuesto inactivo. Esto quiere decir que las primeras soluciones de cribado virtual, corresponderán a un ligando capaz de unirse al receptor con suficiente afinidad, como para considerarlo como molécula molde en el diseño racional de fármacos. Debido a lo anterior, en el cribado de las quimiotecas con el sistema de interés, se decidió dar mayor peso a los resultados obtenidos al trabajar con las funciones de puntaje de OEChemscore y Chemscore.

5.1.2. Cribado virtual sobre triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) de las tres quimiotecas de interés: Maybridge, eMolecules I y eMolecules II.

Al realizar el cribado de las quimiotecas, utilizando como receptor a TcTIM, se obtuvieron una serie de compuestos que muestran una alta afinidad por los sitios de unión seleccionados previamente. Como se mencionó, la preparación del receptor se realizó antes de la ejecución del docking empleando las herramientas de *FRED receptor*. Las figuras 39 y 40, corresponden a los receptores utilizados en el proceso del cribado virtual. En la forma azul debe alojarse, la molécula del ligando, y en la forma verde debe posicionarse, estrictamente, al menos un átomo de dicha molécula. Se ha determinado que el valor del volumen en el que debe oscilar el contorno interno, está en un intervalo entre los 50 y 100 Å³, y el del contorno externo se encuentra entre los 500 y 2000 Å³.

En el caso del receptor en el que el sitio de docking correspondía a la región interfacial (figura 39), el volumen de la caja de docking fue de 3420 Å³. Sobre este sitio se cribaron tanto las quimiotecas emolecules I y emolecules II, además de la quimioteca de Maybridge.

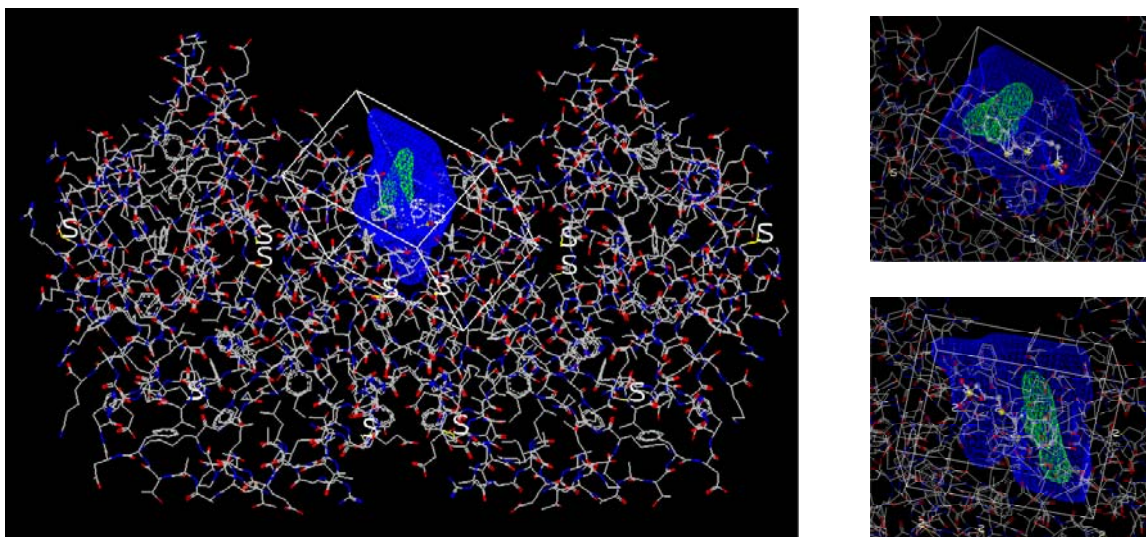


Fig. 39. Se muestra la molécula de TcTIM, utilizada para generar el cribado de las quimiotecas de interés. El archivo del receptor se preparó empleando las herramientas de *FRED receptor*, centrandó la caja de prueba en la región interfacial. La caja corresponde al espacio para llevar a cabo el docking de la quimioteca. Las formas verde y azul, corresponden a los volúmenes de los contornos interno y externo, respectivamente. En las imágenes de la derecha se muestra un acercamiento a la caja de docking.

Al definirse el sitio de docking en la región de las hélices que dan acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación (figura 40), el volumen de la caja de docking fue de 4290 Å³. Se utilizaron las mismas tres quimiotecas que en el caso anterior.

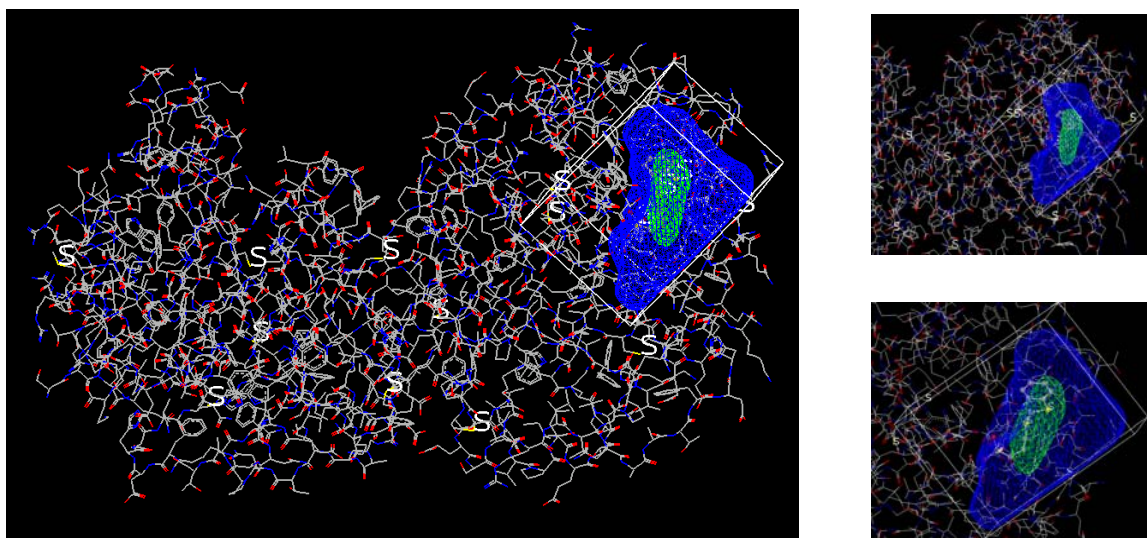


Fig. 40. Se muestra la molécula de TcTIM, utilizada para generar el cribado de las quimiotecas de interés. El archivo del receptor se preparó empleando las herramientas de FRED receptor, centrado la caja de prueba en la zona de las hélices constituidas por residuos con alta tendencia de agregación. La caja corresponde al espacio para llevar a cabo el docking de la quimioteca. Las formas verde y azul, corresponden a los volúmenes de los contornos interno y externo, respectivamente. En las imágenes de la derecha se muestra un acercamiento a la caja de docking.

Los valores de los volúmenes se resumen en la tabla 15. Puede observarse que los valores de los contornos interno y externo se encuentran en el intervalo definido por FRED. Las variaciones en el tamaño de la caja de docking se deben a las características del sitio de unión.

Tabla 15. Valores de los volúmenes de la caja de docking, de los contornos interno (intervalo permitido entre los 50 y los 100 Å³) y externo (intervalo permitido entre los 500 y los 2000 Å³), obtenidos para TcTIM.

Complejo	Volumen de la caja de docking (Å ³)	Volumen del contorno interno (Å ³)	Volumen del contorno externo (Å ³)
TcTIM-hélices	4249	92	1353
TcTIM-interface	3420	83	1005

Se muestran a continuación los resultados correspondientes a cada uno de los sitios explorados, probando las tres quimiotecas virtuales.

5.1.2.1. Cribado virtual de las quimiotecas Maybridge, eMolecules I y eMolecules II, en el sitio localizado en la zona de hélices.

Al realizar el cribado virtual de la quimioteca de Maybridge y eMolecules I y II en el sitio localizado en la zona de hélices que dan acceso a las hebras inestables, se lograron identificar, cerca de 15,986 compuestos. Cabe mencionar que el complejo del que se partió para obtener el archivo del receptor, correspondió a la mejor solución encontrada previamente utilizando el conjunto de programas de AutoDock 3.0.5.

La energética de unión asociada a la mejor solución del docking, al cribar la quimioteca de Maybridge, fue de -45.86 kcal/mol, empleando la función de puntaje OEChemScore. Es interesante resaltar que, en la mayoría de las mejores soluciones de docking (las primeras 100), el número de contactos establecidos con los residuos de aminoácidos que constituían el sitio de unión no fue extremadamente elevado (tres puentes de hidrógeno, en promedio).

Por otra parte, probablemente, la alta contribución de la parte lipofílica de la interacción sea la que promueve la formación de los complejos. Se tiene también una baja penalización por el contacto del ligando con el receptor, lo cual favorece la energética de unión. La inspección de las moléculas permitió especificar el número y tipo de interacciones que el ligando se encontraba estableciendo con los distintos residuos de aminoácido.

El procedimiento de cribado de las quimiotecas de eMoléculas I y eMoléculas II, fue el mismo que el empleado en el caso del cribado de la quimioteca de Maybridge. La mejor solución tuvo una energética de unión de -38.56 kcal/mol. Nuevamente se observó que la mayor contribución a la energética de la unión correspondió al término de lipofilicidad. La penalización, por contactos con el receptor fue baja y la contribución por la formación de puentes de hidrógeno no contribuyó en un porcentaje alto. En la figura 41 se muestran el conjunto de soluciones del cribado de la quimioteca de Maybridge y de eMoléculas I y II. En todas ellas se encuentran presentes los anillos aromáticos capaces de establecer interacciones con las cadenas cargadas de los residuos de aminoácido del sitio de unión.

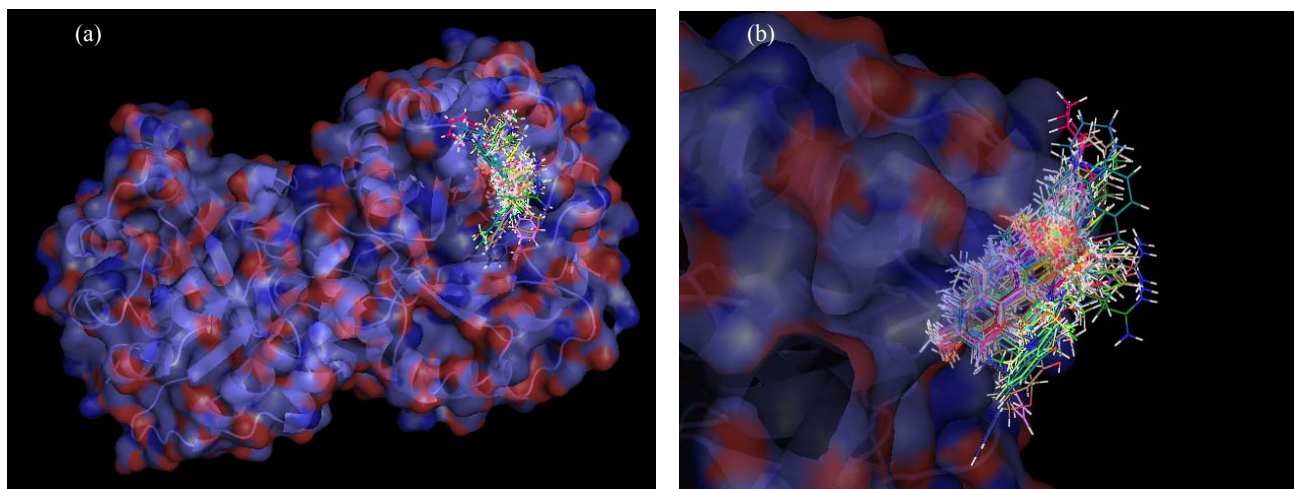


Fig. 41. Imagen en la que se aprecian las 200 mejores soluciones de docking, al realizar el cribado de la quimioteca de Maybridge y eMoléculas I y II, en la zona de las hélices que dan acceso a las hebras inestables de la molécula de TcTIM. En (a) una vista general de la localización de los compuestos, en (b) un acercamiento que permite apreciar detalles de las estructuras, la presencia de anillos aromáticos fue una constante. Imagen generada empleando Pymol v0.99.

En la siguiente tabla se muestran los residuos que constituyen el hueco que da acceso a la zona de hélices (tabla 16).

Tabla 16. Residuos que constituyen el hueco que da acceso a la zona de las hélices que contienen residuos con alta tendencia de agregación.

Hueco de Zona de hélices	Residuos	Cadena
	His123	A
	Lys157	A
	Trp160	A
	Ser161	A
	Arg162	A
	Val163	A
	Val164	A
	Ile203	A

En la mayoría de los compuestos se observó la interacción de los anillos aromáticos (sistema π), con residuos cargados como Lys, Arg e His. Como describiremos más adelante, este tipo de interacciones es muy importante en los estudios en los que se evalúan las interacciones establecidas entre proteínas y ligandos.

Los resultados del cribado virtual, mostraron una densidad alta de compuestos conteniendo anillos aromáticos. La siguiente imagen muestra las nueve mejores soluciones del cribado de las quimiotecas. Existe en todas ellas la presencia de anillos aromáticos. La estructura en verde es la solución con mejor energética del total de compuestos cribados; las estructuras en gris corresponden a los compuestos que le siguen en el puntaje (figura 42).

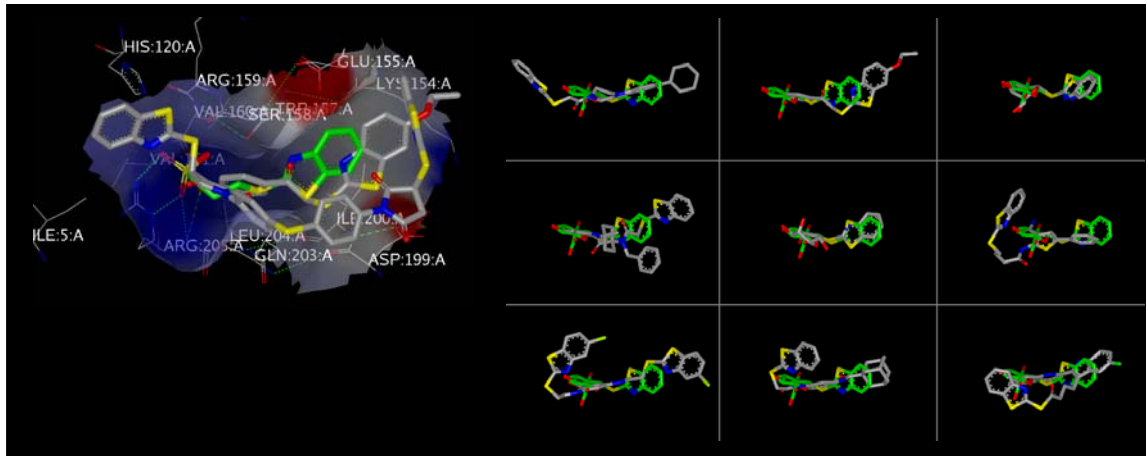


Fig. 42. Soluciones del cribado de las quimiotecas de prueba, en la zona de las hélices que dan acceso a las hebras inestables de la molécula de TcTIM. En la parte izquierda de la figura se muestra un acercamiento al sitio en el que se realizó el docking conteniendo el compuesto de referencia (C8), se aprecian las interacciones de los residuos de aminoácidos con los tres mejores compuestos. En la parte derecha de la imagen se muestran las nueve mejores soluciones, en verde la estructura con una energética de unión menor (-38.56 kcal/mol), y en gris aquellas que le siguen en el puntaje. Imagen generada con el visualizador VIDA2 v2.1.

5.1.2.2. Cribado virtual de las quimiotecas Maybridge, eMolecules I y eMolecules II, en el sitio localizado en la región interfacial.

El cribado virtual de las quimiotecas de Maybridge, eMolecules I y eMolecules II, permitió detectar 15,208 compuestos con capacidad para unirse a la superficie de la región interfacial de TcTIM. En la figura 43 podemos observar en gris la mejor solución obtenida con FRED al cribar la quimioteca de Maybridge, y en verde, el ligando de referencia (C8). La energética de unión asociada a esta conformación es de -43.75 kcal/mol, empleando la función de escore OEChemscore. Tres puentes de hidrógeno se establecen entre el ligando y los residuos de aminoácidos que constituyen el sitio de unión; nuevamente, la contribución de la parte lipofílica de la interacción es la que, aparentemente, promueve la formación del complejo. En este caso, la penalización por el contacto del ligando con el receptor es alta, lo cual tiene efectos sobre la energética de unión. Un acercamiento al sitio de unión, nos permite observar los residuos con los que se establece la interacción: ASN65, ARG97 y GLU75, todos de la cadena A (figura 43).

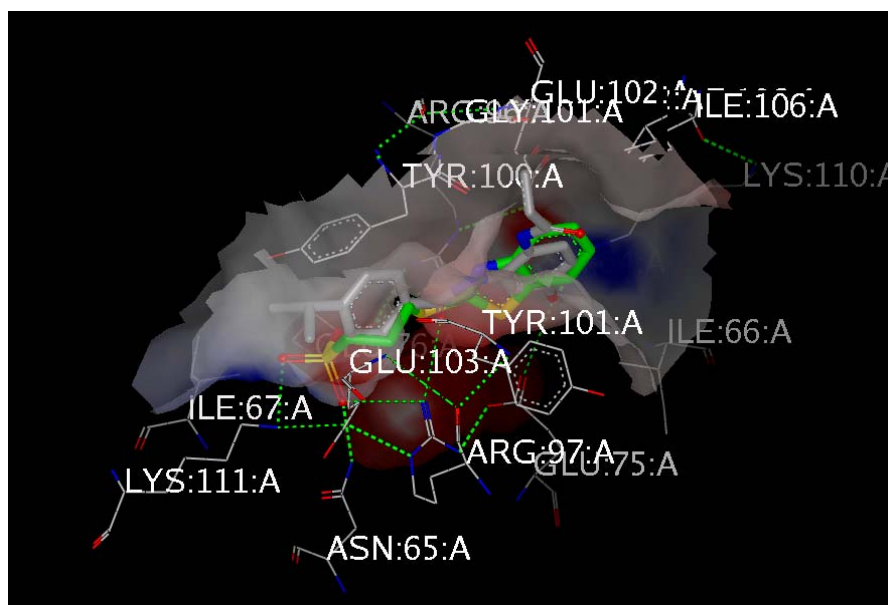


Fig. 43. Se muestra un acercamiento a la mejor solución de cribado virtual en el sitio de docking, pueden apreciarse los tres puentes de hidrógeno que forma el compuesto con los residuos de aminoácidos de ASN65, ARG97 y GLU75, todos de la cadena A. Para la visualización de los resultados se utilizó el programa VIDA2. v2.1.

Los resultados obtenidos para el caso del cribado de las quimiotecas de eMolecules, permitieron observar que la mejor solución obtenida tenía asociada una energética de unión -48.26 kcal/mol, empleando la función de puntaje OEChemscore. Es interesante resaltar que el número de contactos parece estar en función de la complejidad de la molécula, los contactos establecidos con los residuos de aminoácidos que constituyen el sitio de unión son elevados; probablemente, la alta contribución de la parte lipofílica de la interacción sea la que promueve la formación del complejo. Se tiene también una baja penalización por el contacto del ligando con el receptor, lo cual favorece la energética de unión. En la figura 44, se muestran las nueve mejores soluciones, utilizando la versión 2.1.2 de VIDA2.

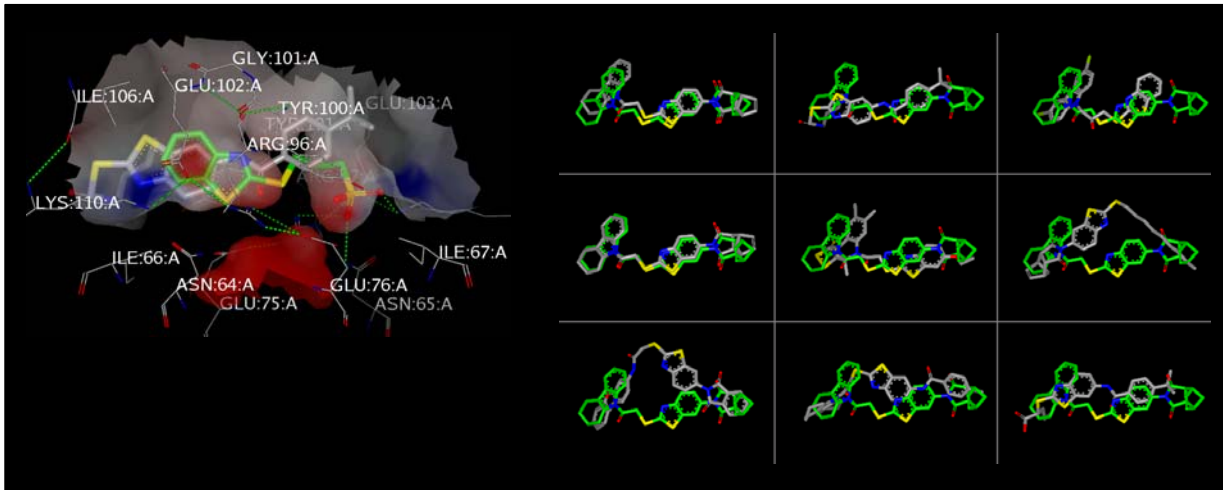


Fig. 44. Soluciones del cribado, de la quimioteca de emoléculas, en la zona de la región interfacial de la molécula de TcTIM (a) Acercamiento al sitio en el que se realizó el docking, se muestran los residuos de aminoácidos con los que los compuestos se encuentran estableciendo interacciones. (b) Se muestran las nueve mejores soluciones, en verde la estructura con una energética de unión menor (-48.26 kcal/mol), en gris aquellas que le siguen en puntaje. Imagen generada con el visualizador VIDA2 v2.1.

En todos los casos, la presencia de anillos aromáticos en las moléculas identificadas, permitió la interacción con residuos cargados (Lys y Arg) que se encontraban formando parte de los sitios de unión. Se establecieron en general, interacciones del tipo catión- π . Además se observó, en todos los casos, el establecimiento de al menos dos puentes de hidrógeno. Generalmente, existió complementariedad geométrica y un ocultamiento de área accesible al solvente en las regiones de establecimiento de contactos. Las configuraciones de las 200 mejores soluciones del cribado se visualizan simultáneamente, utilizando la versión 0.99 de Pymol (DeLano Scientific, 2006); puede apreciarse que al igual que en el caso de la zona de hélices, la presencia de anillos aromáticos en las estructuras de la mayoría de los compuestos identificados como buenos ligandos, se repite periódicamente (figura 45).

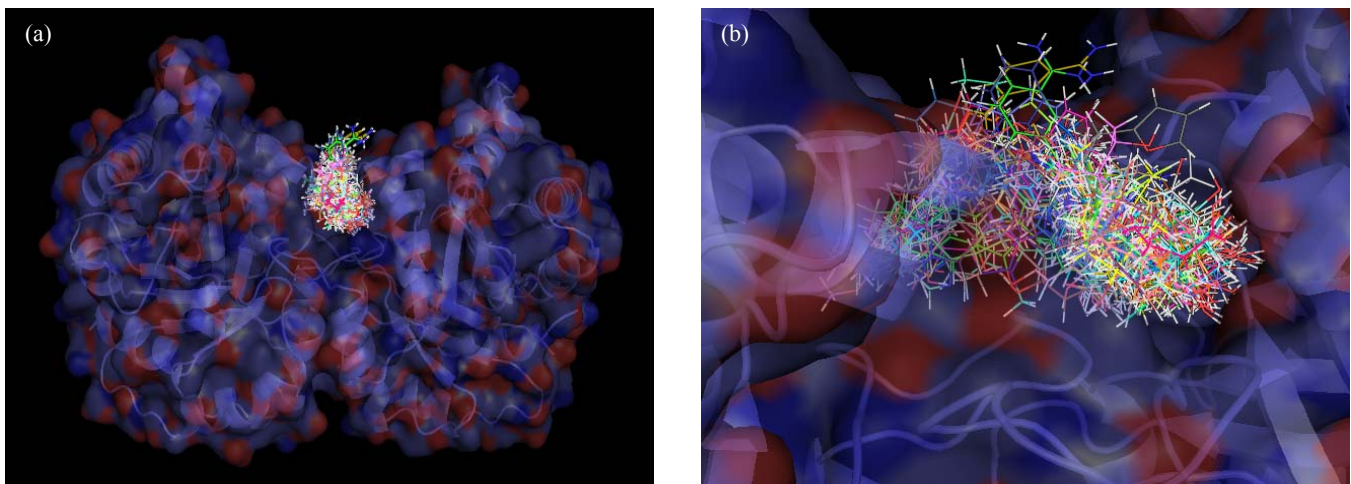


Fig. 45. Se muestran las 200 mejores soluciones de docking al realizar el cribado de la quimioteca de Maybridge, eMoléculas I y II, en la zona de la región interfacial de la molécula de TcTIM. En (a) una vista general de la localización de los compuestos, en (b) un acercamiento que permite apreciar detalles de las estructuras. Imagen generada empleando Pymol v0.99.

En este sentido, está ampliamente reportado que cuando una cadena lateral catiónica (en proteínas, Lys o Arg) se encuentra cercana a una cadena lateral aromática (Phe, Tyr o Trp, y dependiendo de su estado de protonación, His), la geometría favorece una interacción catión- π ; en las proteínas la cadena lateral de Arg es más propensa a formar este tipo de interacciones que la cadena lateral de Lys (Gallivan, J. P. y col., 1999).

Por otro lado, numerosos grupos de investigación han estudiado el papel que juegan las interacciones catión- π en el reconocimiento biológico (Kisselev, O. G., 1998, Li, H. L., 1999, Marshall, G. R., 1999, Okada, A., 2001, Zacharias, N. y col., 2002). Se ha observado que no todas las interacciones de este tipo son favorables, esta información se ha aprovechado en estudios de perturbación del reconocimiento molecular (Dougherty, D. A., 1996), como en el caso de la unión de acetilcolina y otros ligandos pequeños en la acetilcolinesterasa (Sussman, J. L. y col., 1991, Zhong, W. y col., 1998). De estos y otros estudios es claro que, además del efecto hidrofóbico, los puentes de hidrógeno y los puentes salinos, las interacciones catión- π deben ser consideradas al evaluar la fuerza con la que se unen las drogas en el receptor (Zacharias, N. y col., 2002). Energéticamente, una interacción catión- π es comparable, o más fuerte, que un puente de hidrógeno, éste contribuye a la interacción global de la unión con 2-4 kcal/mol (Zhong, W. y col., 1998). Un estudio computacional ha indicado que, en un ambiente de exposición al solvente, una interacción típica de catión- π es más fuerte que una interacción de puente salino (Gallivan, J. P. y col., 2000).

Como se mencionó anteriormente, en el reconocimiento biológico, el sistema π es provisto por las cadenas aromáticas de los residuos de Phe, Tyr y Trp, en el caso del reconocimiento molecular proteína-ligando estudiado en este trabajo el papel es a la inversa, ya que la proteína provee el catión (Arg, Lys o His) y el ligando el sistema π . Puesto que en la región interfacial de TcTIM están presentes cadenas laterales de residuos de aminoácidos como Lys, Arg, Tyr, Phe, e His, esto sugeriría que el principal tipo de interacciones que se establecerían entre los ligandos pequeños y la enzima serían las de tipo catión- π , además de los ya citados puentes de hidrógeno. En la siguiente tabla se muestran los residuos que constituyen el hueco de la región interfacial (tabla 17).

Tabla 17. Residuos que constituyen el sitio de unión de la región interfacial, en rojo residuos que proveen la forma catiónica y en azul los que aportan el sistema π para el establecimiento de posibles interacciones del tipo catión- π .

Hueco de región interfacial	Residuos	Cadena	Residuos	Cadena
	N67	A	N67	B
	I69	A	I69	B
	T70	A	E78	B
	R71	A	R99	B
	F75	A	Y102	B
	E78	A	Y103	B
	R99	A	G104	B
	Y102	A	E105	B
	Y103	A	I109	B
	G104	A	K113	B
	E105	A		
	I109	A		
	E112	A		
	K113	A		

El sitio de unión de la región interfacial es rico en residuos que pueden establecer interacciones del tipo catión- π , observamos cadenas de Phe y Tyr (residuos que proveen de los sistemas π) y de Lys y Arg (residuos que proveen la forma catiónica).

Estas características y los resultados obtenidos del cribado virtual de los casi 20,000 compuestos, nos permitieron realizar una serie de propuestas en cuanto a las posibles modificaciones químicas que podrían incrementar la probabilidad de unión de un compuesto, tanto en la zona de las hélices como en la región interfacial. La discusión de estas modificaciones se realiza en la siguiente sección.

5.1.2.3. Modificaciones químicas propuestas a la molécula líder para incrementar su afinidad de unión en los sitios seleccionados.

El diseño racional de drogas está basado en principios en los que los compuestos líderes, generalmente similares estructuralmente, son modificados hasta conseguir incrementar sus energías de unión, y con esto su potencial farmacológico (optimización de compuestos).

Sin embargo, aunque el diseño basado en la estructura del ligando se fundamenta en el principio de similitud de Maggiora, el cual postula que moléculas estructuralmente relacionadas podrían mostrar actividades biológicas similares (Johnson, M. A. y col., 1990), se ha observado que pequeños cambios estructurales conducen a un gran cambio en la actividad del compuesto, o que moléculas similares en ocasiones muestran modos de unión diferentes. Las modificaciones en la estructura alteran de modo inherente las características químicas de los ligandos, por lo que se piensa que puesto que los fragmentos subestructurales dictan actividades biológicas similares, éstas deben considerarse siempre en el diseño, además de las características del sitio específico donde va a actuar. En este contexto, las modificaciones propuestas basadas únicamente en experimentos computacionales, sin considerar los datos obtenidos de experimentos *in vitro*, tendrán una baja probabilidad de convertirse en moléculas molde en el diseño de fármacos.

En el caso de C8, las modificaciones estructurales propuestas, provienen del análisis de una serie de pasos que llevaron a la identificación de las características necesarias para establecer una interacción fuerte y selectiva en los sitios de unión detectados en la estructura de TcTIM. La molécula de C8 se muestra a continuación (fig. 46).

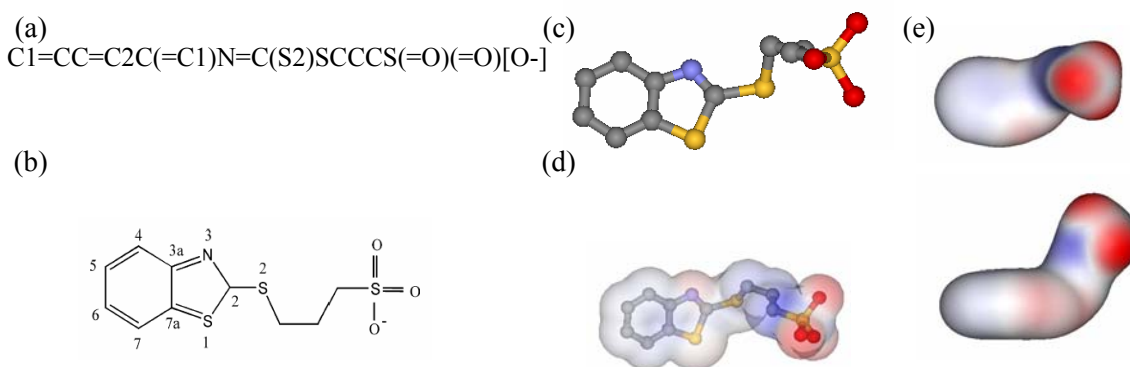


Fig. 46. Molécula de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8, C8). En (a) código SMILES (b) representación en 2D (c) representación en 3D (d) superficie de Van der Waals, (e) superficie de energía potencial. Imagen obtenida empleando el visualizador ViewerLite v5.0.

Dado que en todos los casos, los mejores resultados correspondieron a moléculas en donde se conservaba la estructura de la molécula líder (C8), con anillos aromáticos adicionales o grupos con capacidad para formar puentes de hidrógeno, estas fueron las dos características principales que deben considerarse al diseñar moléculas tomando como molécula molde a C8. Ya que la *adición de anillos aromáticos* a la estructura de C8, proveen un sistema π que permitiría la formación de interacciones de tipo catión- π o π - π , y por otro lado, la *adición de grupos con capacidad de establecer puentes de hidrógeno*, por ejemplo, grupos amina, grupo carboxamida, grupos hidroxilo, reforzaría la fuerza de unión del compuesto en el receptor.

Adicionalmente, de acuerdo a la información obtenida de los farmacóforos construidos, los derivados de C8 deben tener características que incluyan dos zonas con capacidad para establecer interacciones hidrofóbicas alejadas por una distancia de 3.85 Å, así como otra zona con capacidad para formar interacciones por carga, alejada en el espacio por una distancia de 2.75 Å, de una zona con capacidad de formar interacciones hidrofóbicas.

5.1.2.4. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en los sitios localizados en la región interfacial y la zona de hélices.

Si consideramos que en un ejercicio típico de cribado virtual -con quimiotecas que al inicio contienen unas 10^6 - 10^{12} estructuras, y que son sucesivamente filtradas y reducidas a una colección de unos 100-1000 candidatos-, la aplicación secuencial de una serie de técnicas (basadas en el nivel de requerimientos computacionales que utiliza cada uno de los pasos y en la complejidad de la información aportada como entrada para cada uno de ellos), permiten garantizar la identificación de *leads* (fig. 47), estamos en condiciones de decir que en nuestro caso, las moléculas identificadas corresponden no sólo a compuestos *activos*, sino a compuestos que pueden ser considerados como *leads* en el proceso del diseño de fármacos contra la enfermedad de Chagas.

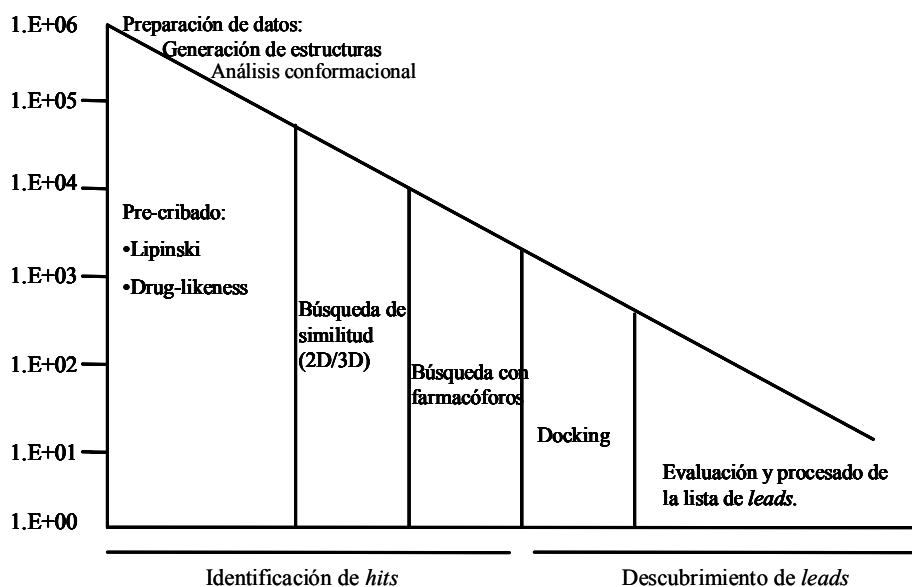


Figura 47. Se muestra la estructura de una cascada de cribado de quimiotecas *in silico* con los diferentes pasos de filtrado aplicados y la reducción de compuestos que conlleva cada uno de ellos. Modificado de Terfloth, L., 2003.

Como mencionamos en las secciones anteriores, a partir de una búsqueda por similitud de compuestos con características estructurales de C8, de su utilización para la realización de ejercicios de docking y de la construcción, a partir de esos datos, de un farmacóforo, se generaron dos quimiotecas que fueron empleadas en ejercicios de cribado virtual para lograr identificar moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM. El proceso seguido en la ejecución del cribado virtual, nos llevo a la identificación de compuestos que pueden ser considerados como *leads*.

En el anexo V, se enlistan las 100 mejores soluciones del cribado virtual. A continuación se muestran las diez mejores soluciones, cinco correspondientes a las encontradas en la región interfacial y cinco a las encontradas en el hueco que da acceso a las hebras que se encuentran constituidas por residuos con alta tendencia de agregación.

5.1.2.4.1. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en la región interfacial (HRI).

A continuación se enlistan las cinco mejores soluciones del cribado virtual, realizado en la región interfacial de TcTIM.

- **Compuesto I**

(Energía de unión: -12.034 kcal/mol)

Código SMILES: NC(c1cccc(c1)C(Nc1ccc(cc1)NC(c1ccc(C(C)C)cc1)=O)O)=O=[N+]

Puentes de hidrógeno establecidos:

3

- Glu78 (3.10 Å)
- Arg99 (2.98 Å)
- Gly104 (2.93Å)

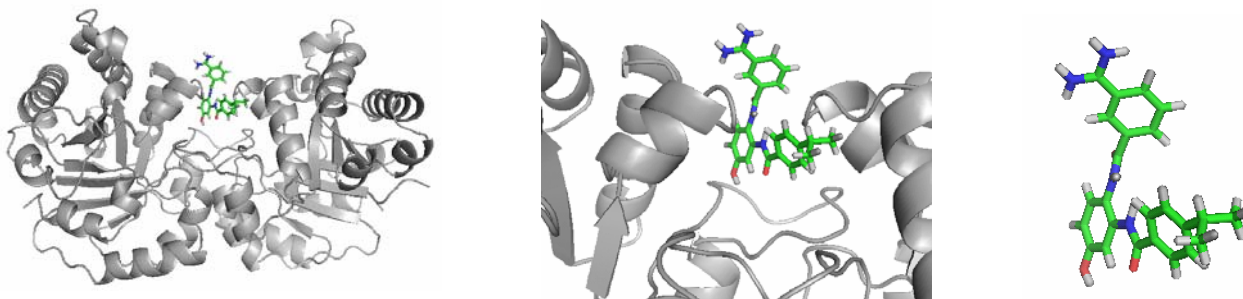


Figura 48. Compuesto I, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la región interfacial de TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la región interfacial y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto II**

(Energía de unión: -11.316 kcal/mol)

Código SMILES: s1cccc1c1[nHO]C(NC(C[N+](Cc2ccccc2)Cc2ccccc2)=O)s1

Puentes de hidrógeno establecidos

2

- Arg99 (2.54 Å)
- Arg99 (3.27 Å)

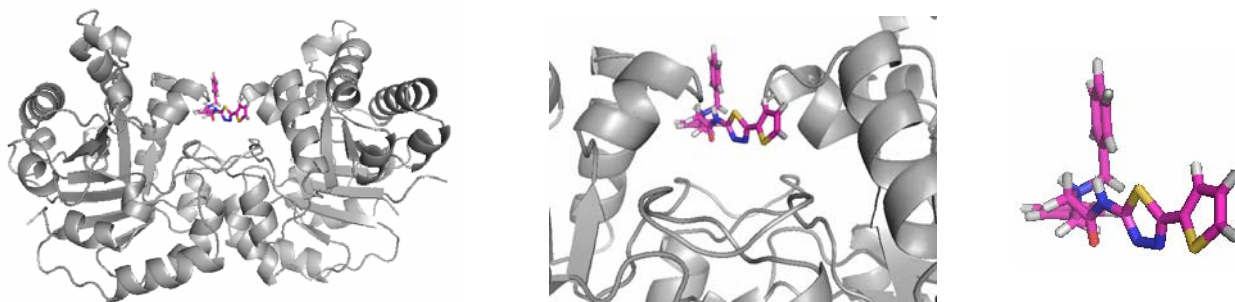


Figura 49. Compuesto II, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la región interfacial de TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la región interfacial y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto III**

(Energía de unión: -11.057 kcal/mol)

Código SMILES: c1cccc1C[N+](C)CCCNc1ccc(c2ccccc2)[Nho][nHO]1

Puentes de hidrógeno establecidos:

2

- Tyr103_A (2.98 Å)
- Tyr103_B (3.05 Å)

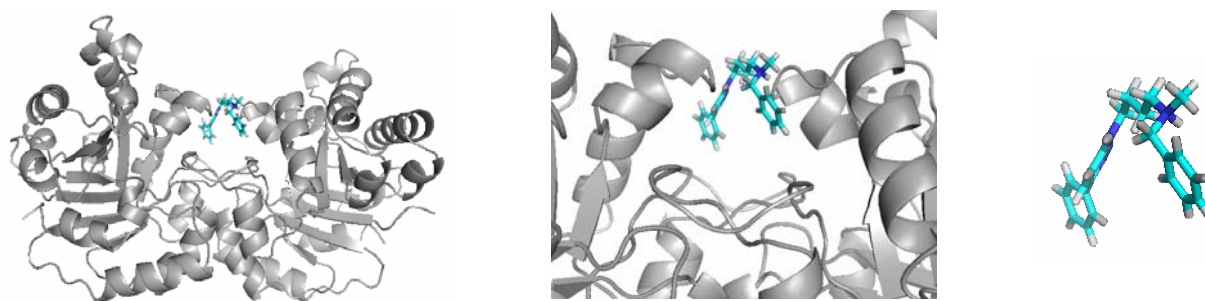


Figura 50. Compuesto III, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la región interfacial de TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la región interfacial y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

• **Compuesto IV**

(Energía de unión: -10.956 kcal/mol)

Código SMILES: Coc1ccc(cc1)NC(Nc1ccc(Cc2ccc(cc2)NC(Nc2ccc(cc2)OC)=O)cc1)=O

Puentes de hidrógeno establecidos: 0

Aunque existe una alta complementariedad geométrica.

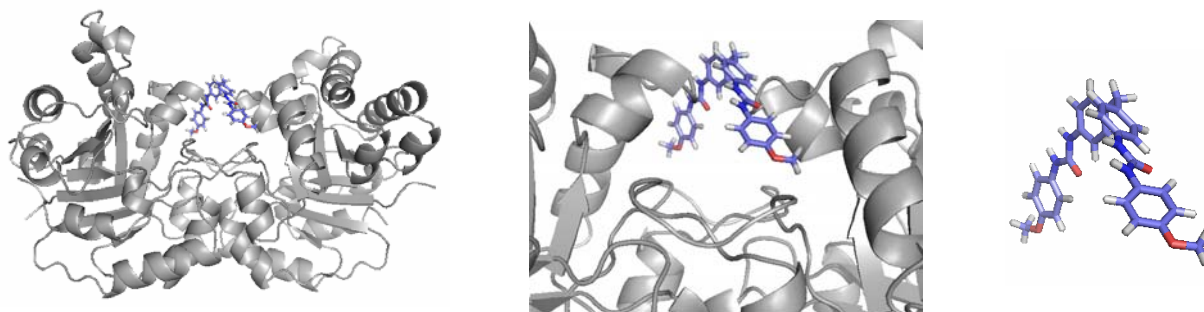


Figura 51. Compuesto IV, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la región interfacial de TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la región interfacial y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

• **Compuesto V**

(Energía de unión: -10.361 kcal/mol)

Código SMILES: O=C1c2ccc(c3cccc(c23)C(N1CCc1cccc[nHO]1)=O)SCCO

Puentes de hidrógeno establecidos: 3

- Arg99_A (2.10 Å)
- Thr70_A (3.14 Å)
- Arg99_B (2.96 Å)

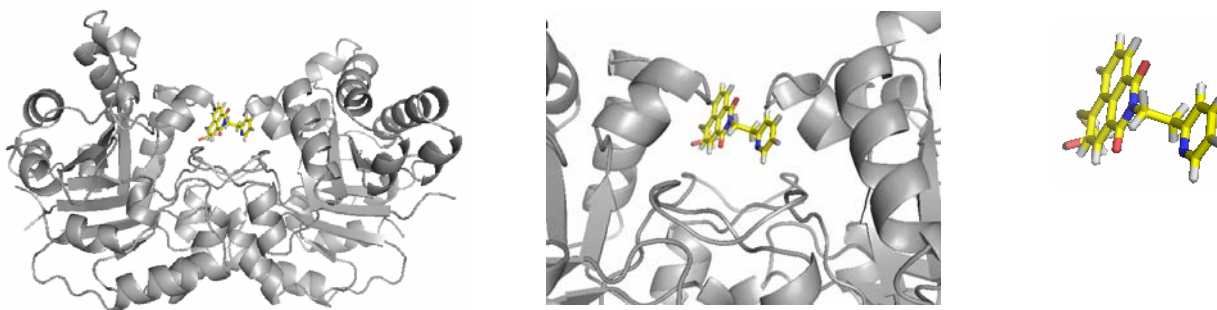


Figura 52. Compuesto V, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la región interfacial de TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la región interfacial y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

5.1.2.4.2. Identificación de moléculas con capacidad de unirse a la superficie de TcTIM en la zona de hélices (HH).

- **Compuesto VI**

(Energía de unión: -11.476 kcal/mol)

Código SMILES: O=C1c2ccccc2c2c1cccc2C(NC1(C(c2ccccc2C1=O)=O)O)=O

Puentes de hidrógeno establecidos: 1 • Ser161_A (2.82 Å)

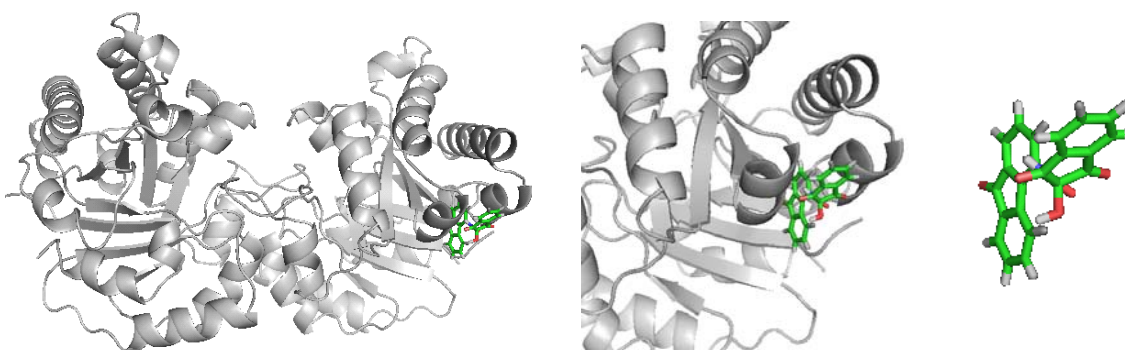


Figura 53. Compuesto VI, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación en TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la zona de hélices y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto VII**

(Energía de unión: -11.012 kcal/mol)

Código SMILES: OC(C[N+])Cc1ccc2c(c1)OCO2)Coc1cccc1

Puentes de hidrógeno establecidos: 1 • Trp160_A (2.96 Å)

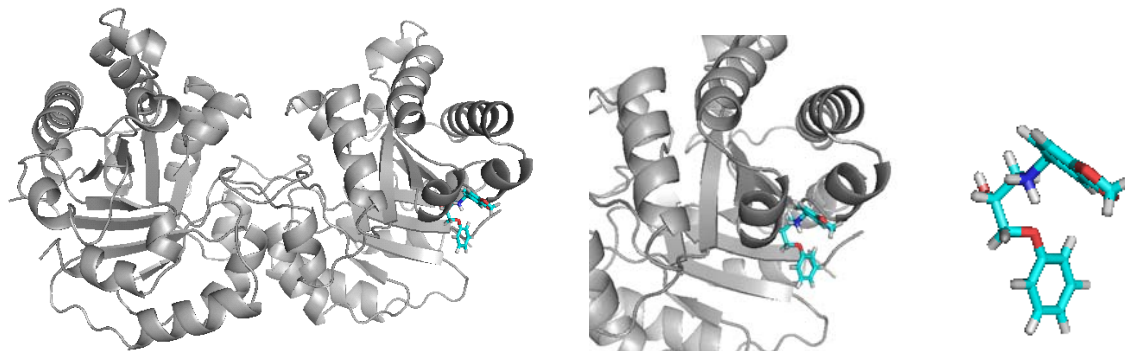


Figura 54. Compuesto VII, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación en TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la zona de hélices y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto VIII**

(Energía de unión: -10.472 kcal/mol)

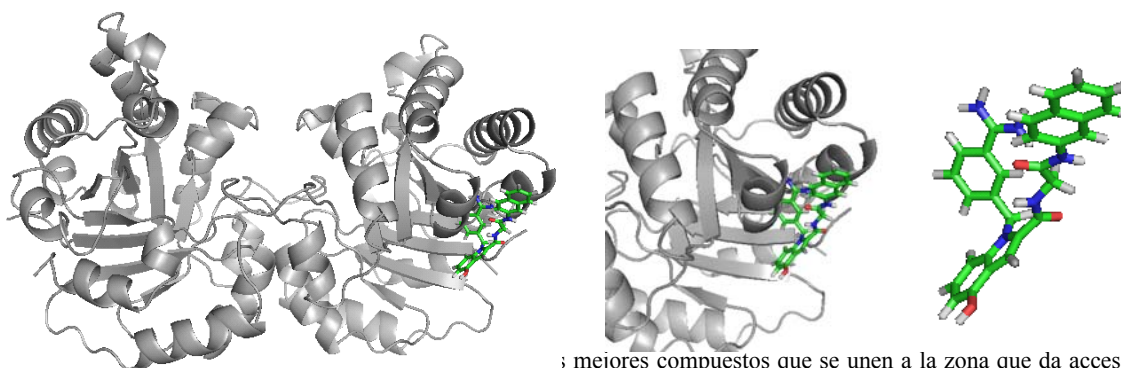
Código

SMILES: Oc1cccc2c1cc(C(NCC(Nc1ccc3ccccc3c1)=O)=O)[nHO]2Cc1cccc(c1)C(N)=[N+]

Puentes de hidrógeno establecidos:

2

- Ser161_A (2.45 Å)
- Ser161_A (2.12 Å)



; mejores compuestos que se unen a la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación en TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la zona de hélices y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto IX**

(Energía de unión: -9.725 kcal/mol)

Código SMILES: c1ccccc1c1c(c2ccccc2)[nHO]c(c2ccc(c2)OC)O[nH]1

Puentes de hidrógeno establecidos:

0

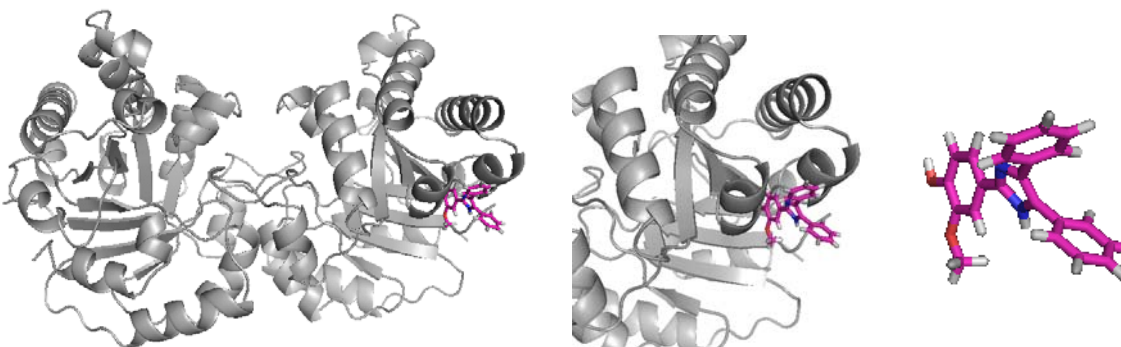


Figura 56. Compuesto IX, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación en TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la zona de hélices y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

- **Compuesto X**

(Energía de unión: -8.208 kcal/mol)

Código Cc1cccc2c1cc(C(NCc1cccc(c1)c1ccccc1)=O)[nHO]2Cc1cccc(c1)C(N)=[N+]
SMILES:

Puentes de hidrógeno establecidos:

1

- Ser161_A (1.75 Å)

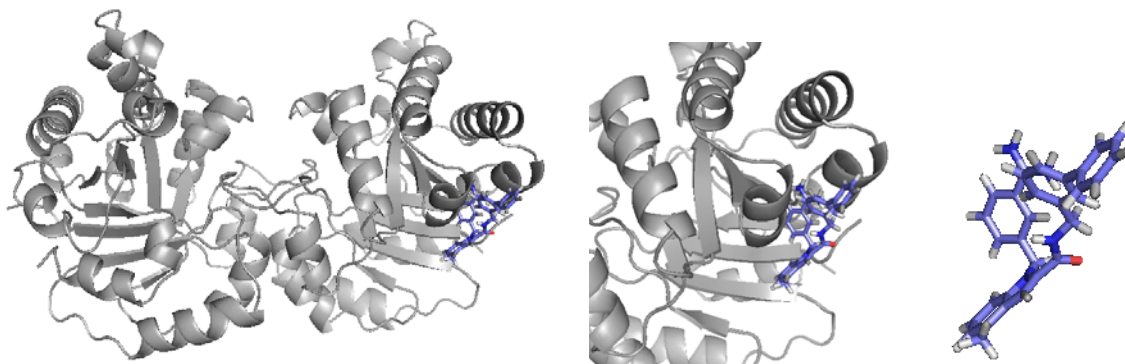


Figura 57. Compuesto X, identificado como uno de los mejores compuestos que se unen a la zona que da acceso a las hebras constituidas por residuos con alta tendencia de agregación en TcTIM. De izquierda a derecha, localización espacial del ligando en la superficie de TcTIM, acercamiento a la zona de hélices y visualización del compuesto sin acomplejar. Imágenes obtenidas empleando Pymol v0.99.

La síntesis de estos compuestos, y su ensayo *in vitro*, proporcionaría información sobre las características que deben guardar los compuestos, para ser considerados fármacos potenciales en el desarrollo de medicamentos contra la enfermedad de Chagas.

Puede observarse la existencia de anillos aromáticos que, al proporcionar un sistema π , podrían estar participando en la formación de interacciones del tipo catión- π , con residuos cargados positivamente como la Lys. En la mayoría de los casos anteriores se establece al menos un puente de hidrógeno. La complementariedad geométrica juega un papel central en el reconocimiento de la proteína y el ligando. Las energías de unión revelan, aunque de manera aproximada, la fuerza con la que el ligando se une al receptor. Observamos que las energías correspondientes a los ligandos que se unen en el sitio de la región interfacial son más altas, probablemente debido a la cantidad de puentes de hidrógeno que se establecen y a las características del sitio.

Si consideramos que los ensayos de cribado virtual se pueden realizar tanto de manera prospectiva como retrospectiva, entonces hemos cumplido objetivos en ambos sentidos. En el caso de los ensayos “retrospectivos”, construimos las bases de datos que contenían los compuestos activos, “diluyéndolos” en una base de datos con *presuntos* inactivos. Con este tipo de ensayo, se lograron ajustar los distintos parámetros requeridos en los estudios de validación y en los métodos seguidos posteriormente. Aunque no se debe ignorar que uno de los principales problemas es que la inactividad de los compuestos se presume, ya que normalmente, de la gran mayoría de éstos, no se tienen datos de actividad que confirmen la inactividad frente a la proteína blanco.

Por otra parte, el ensayo prospectivo está dirigido al descubrimiento real de nuevos *leads* a partir de bases de datos, cuya principal restricción es que no se cuenta con información previa acerca de la actividad o inactividad de las moléculas frente al blanco. Estos nuevos *leads* no tienen porque ser necesariamente accesibles sintéticamente, aunque lo ideal sería que se confirmara su actividad mediante la realización de experimentos *in vitro*. En nuestro caso, a partir de la construcción de dos quimiotecas, con información de farmacóforo, y del cribado adicional de una tercera (Maybridge), se lograron identificar una serie de compuestos con capacidad para unirse a TcTIM en dos sitios con muy baja conservación entre las enzimas de los organismos involucrados.

Adicionalmente, esta información permitió identificar que el establecimiento de interacciones tipo catión- π , en los dos sitios potenciales de unión de TcTIM elegidos en este trabajo, son fuerzas que asisten el proceso del reconocimiento molecular entre la proteína y los distintos ligandos.

Por último, cabe recalcar que los experimentos computacionales no pretenden reemplazar a los experimentos *in vitro*, por el contrario, éstos deben ser considerados como un complemento que asista el análisis de los resultados obtenidos en el laboratorio.

Conclusiones y perspectivas

Los estudios realizados permitieron identificar una serie de compuestos con capacidad para unirse a la superficie de TcTIM; específicamente en dos sitios, uno localizado en la región interfacial y otro en una zona que da acceso a tres hebras β que están constituidas por residuos que tienen una alta tendencia de agregación. Los compuestos identificados provinieron del cribado virtual de tres quimiotecas, dos de ellas generadas a partir de la información obtenida de un farmacóforo; farmacóforo que a su vez fue diseñado utilizando la información proveniente de los estudios de docking realizados con la molécula líder (C8) y compuestos similares a ella.

Los estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre C8 y TcTIM, aunados a los resultados obtenidos por diversas técnicas espectroscópicas, nos permitieron proponer un mecanismo molecular de la inhibición ejercida por el compuesto 8. Puesto que se realizó una caracterización exhaustiva de las condiciones experimentales, los cambios en las señales de las técnicas empleadas pudieron atribuirse a la presencia de C8 y no a una inestabilización de la enzima debido a las características del medio que la contenía.

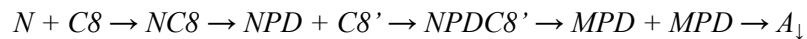
Las conclusiones del trabajo de investigación pueden resumirse en los siguientes párrafos.

- *Existe un efecto del solvente sobre la estabilidad de triosafosfato isomerasa de Trypanosoma cruzi*, puesto que se observó que al trabajar con soluciones amortiguadoras constituidas por EDTA, TEA y Tris-HCl, en distintas concentraciones (generalmente bajas), existía una pérdida de estructura y función de la enzima. Auxiliándonos de herramientas computacionales, se realizó la caracterización de los residuos de aminoácidos de TcTIM, lográndose identificar en la proteína regiones con baja estabilidad (COREX-Best), y con una alta tendencia a agregar (TANGO). Aunado a estas determinaciones, el estudio del reconocimiento entre las moléculas que constituían la solución amortiguadora y la enzima (docking), y la identificación de sitios potenciales de unión a éstas, nos permiten proponer que *la inestabilidad de TcTIM se debe probablemente a que a bajas concentraciones de estas moléculas en el medio, la región interfacial de TcTIM es más susceptible de ser ocupada por moléculas de agua. Puesto que esta zona es altamente hidrofóbica, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno que se encuentran estabilizándola, daría lugar a la exposición de zonas que originalmente se encuentran ocultas en la proteína y que al interactuar forman agregados*. En los casos en los que no se encontraban presentes moléculas de EDTA en la solución, la formación de agregados tuvo lugar rápidamente, así como la pérdida de la estructura terciaria y secundaria. Los resultados de docking permitieron visualizar que esta molécula se aloja principalmente en la zona de la interface, estableciendo interacciones carga-carga con residuos de aminoácidos polares. Probablemente el papel que juega esta molécula en la estabilización, *in vitro*, sea la de grapa molecular. Una alta densidad de moléculas de EDTA en la interface quizás obstruya la entrada de moléculas de solvente a la cavidad hidrofóbica, logrando conservar el ambiente necesario para mantener la integridad del dímero. En el caso de los experimentos realizados con solución amortiguadora de TEA, el efecto fue similar al encontrado al disminuir o suprimir la concentración de EDTA, salvo que en estos casos la pérdida de actividad enzimática fue más lenta; siempre y cuando estuvieran presentes en el medio, concentraciones de EDTA por arriba de los 3 mM.

TEA también se localizó en la región interfacial, aunque más al interior de la cavidad (a no más de 5 Å de los residuos de la región interfacial), por lo que nuevamente puede pensarse en la importancia de mantener las condiciones nativas en esta cavidad hidrofóbica de TcTIM.

En el caso de las moléculas de Tris-HCl, se encontraron alojadas a lo largo de la región interfacial hacia zonas muy internas de los residuos de interface, a no más de 4 Å de distancia en promedio. Quizás esta localización permita a la molécula de Tris formar una mayor cantidad de interacciones (puentes de hidrógeno que las otras moléculas no establecieron) que restrinjan los movimientos naturales de la enzima, evitando e inclusive suprimiendo la actividad enzimática y promoviendo la desestructuración de la enzima. Cuando se trabajaron con soluciones de Tris-HCl, la pérdida de actividad enzimática y de estructura secundaria y terciaria, con formación de agregados fue significativamente rápida (ANEXO I).

- *El efecto de la temperatura sobre TcTIM implica la formación de especies intermediarias, con modificación en su estructura secundaria y terciaria, y con alta tendencia a agregar.* Esta conclusión se desprende de estudios térmicos que nos permitieron caracterizar, no sólo la temperatura óptima de trabajo, sino también el patrón de desnaturalización térmico de la enzima, observando que *la transición de desplegamiento fue altamente irreversible* (ANEXO II).
- *Se lograron inferir detalles adicionales sobre la naturaleza del primer sitio de unión,* información que permitió proponer el siguiente mecanismo molecular de inhibición: puesto que TcTIM es inhibida por C8 mediante un proceso cooperativo, la unión de la primera molécula de C8 facilita la unión de una segunda, debido a la exposición de un sitio de unión; ésta, al unirse a la enzima, provoca un cambio en la estructura del homodímero (estado I) que desemboca en la inactivación de la especie activa, generándose posteriormente dos intermediarios monoméricos, por la modificación de los contactos de la región interfacial (estado II), y finalmente en la desnaturalización de éstos (estado III). Así, se propone el siguiente mecanismo,



La unión de la primera molécula de C8 al dímero nativo de TcTIM (NC8) provoca un efecto que genera un estado parcialmente desplegado (NPD), debido probablemente a la desestabilización de la región interfacial.

La perturbación en los movimientos naturales de la conformación de TcTIM, posiblemente expone un segundo sitio de unión en el que se aloja la otra molécula de C8 necesaria para concretar la inhibición (NPDC8'). La unión de esta molécula maximiza los efectos a nivel estructural y funcional de la enzima, de tal manera que el dímero parcialmente desplegado, con la región interfacial inestabilizada, se escinde en dos monómeros parcialmente desplegados (MPD), que debido a la exposición de zonas hidrofóbicas forman agregados (A) que tienden a precipitar.

La unión de la primera molécula de C8 a la región interfacial, tendría efectos que se propagarían a lo largo de la estructura.

- *El sitio más probable de unión de la segunda molécula de C8 es un sitio localizado en una zona que da acceso a tres hebras β altamente inestables.* Se tiene conocimiento de que son necesarias dos moléculas de C8 para inactivar a TcTIM y de la localización del primer sitio de unión del inhibidor. La identificación del segundo sitio se realizó mediante el empleo de algoritmos computacionales, revelándose que existen tres posibles sitios en la estructura de TcTIM que podrían alojar a C8. Por un lado, dos sitios correspondientes a cada uno de los sitios activos de la enzima, y por otro, un sitio localizado cerca de tres hebras altamente inestables. Considerando que C8 es un inhibidor no competitivo, en presencia de concentraciones de sustrato fisiológicas el sitio de unión favorecido resultaría la zona de las hélices.
- *Las características de los residuos de aminoácidos de la región interfacial de TcTIM, juegan un papel determinante en la estabilidad de la enzima y en el reconocimiento de ligandos pequeños; específicamente aquellos que pueden proporcionar un sistema π como Tyr102, Tyr103 y Phe75.* Se tiene conocimiento de que los residuos aromáticos desempeñan un papel esencial en el establecimiento de interacciones entre un ligando y una proteína, generalmente vía interacciones π - π (Muehldorf, A. V., 1988). Pensamos que mientras que los anillos aromáticos presentes en la región interfacial de TcTIM juegan un papel principal en la unión y orientación del ligando, el resto de los residuos no aromáticos, involucrados en el reconocimiento molecular, pueden estar contribuyendo con el establecimiento de fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, u obstruyendo la entrada de solvente al sitio de unión. En este sentido, la modificación de la distribución de los residuos de la región interfacial, por ejemplo mutaciones de los residuos aromáticos (F75, Y102 y Y103) o de residuos con carga (R71), contribuiría a la comprensión acerca de la selectividad de ciertos compuestos por TcTIM y no por hTIM, así como del papel que desempeñan en la unión de moléculas pequeñas.
- *Los estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre la proteína y el ligando, derivaron en la generación de un farmacóforo.* Éste se utilizó en la construcción de dos quimiotecas, lo que permitió identificar una serie de moléculas con capacidad de unirse a TcTIM. Las características del farmacóforo y el análisis de los compuestos activos seleccionados, permitieron determinar que *las moléculas con potencial para unirse a TcTIM deben presentar en su estructura dos zonas con capacidad para establecer interacciones hidrofóbicas alejadas por una distancia de aproximadamente 4 Å; y una zona con capacidad para formar interacciones por carga alejada por una distancia de 2.75 Å de otra zona con capacidad de formar interacciones hidrofóbicas.*

Por otro lado, con la finalidad de determinar si efectivamente los compuestos encontrados resultan ser inhibidores de la actividad de TcTIM se propone, como un trabajo a futuro, realizar la síntesis de éstos y llevar a cabo pruebas *in vitro*.

Adicionalmente, estudios *in vitro* de mutantes de algunos de los residuos de la región interfacial (Y102, Y103, F75, T76) y del segundo sitio de unión propuesto (zona de hélices, W160, R162, K157), podrían proporcionar información relacionada, por un lado con la contribución de dichos residuos a la estabilidad de la región interfacial; y por otro, con el mecanismo del reconocimiento molecular de ligandos pequeños. La mutación de residuos de aminoácidos identificados como inestables o que forman parte de zonas que sufren movimientos de gran amplitud (que no necesariamente forman parte de la región interfacial), proporcionaría información sobre otras zonas de la estructura de TcTIM que podrían ser consideradas como sitios de diseño racional de fármacos.

Bibliografía

1. Alfonso, P., Pampín, S., Estrada, J., Rodríguez-Rey, J. C., Giraldo, P., Sancho, J., Pocoví, M. (2005). *Blood Cells Mol. Dis.* **35**, 268-276.
2. Álvarez, J., Shoichet, B. (2005). *Virtual Screening in Drug Discovery*. Ed. Taylor & Francis Group, Florida.
3. Anfinsen, C. B. (1973). *Science* **181**, 223-230.
4. Aswad, D. W. (1995). *Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins*. CRC Press, Inc., United States of American.
5. Atilgan, A. R., Durell, S. R., Jernigan, R. L., Demirel, M. C., Keskin, O., Bahar, I. (2001). *Biophys. J.* **80**, 505-515.
6. Babe, L. M., Rose, J., Craik, C. S. (1992). *Protein Sci.* **1**, 1244-1253.
7. Bahar, I., Atilgan, A. R., Erman, B. (1997). *Fol. & Des.* **2**, 173-181.
8. Bahar, I., Atilgan, A. R. (1998). *J. Mol. Biol.* **281**, 871-884.
9. Bahar, I., Jeringan, R. L. (1999). *Biochemistry* **38**, 3478-3490.
10. Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L., Englander, S. W. (1995). *Science* **269**, 192-197.
11. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Willson, I. A., Conan, P. H., Furth, A. J., Milmar, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., Waley, S. G. (1975). *Nature* **255**, 609-614.
12. Bender, A., Glen, R. C. (2004). *Org. Biomol. Chem.* **2**, 3204-3218.
13. Benítez Cardoza, C. G. (2001). *Mecanismo del desplegamiento y replegamiento térmicos de la enzima dimérica triosafosfato isomerasa de levadura*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F.
14. Benítez-Cardoza, C. G., Rojo-Domínguez, A., Hernández-Arana, A. (2001). *Biochemistry* **40**, 9049-9058.
15. Bernal, J. D. (1939). *Nature* **143**, 663-667.
16. Blacklow, S. C., Raines, R. T., Lim, W. A., Zamore, P. D., Knowles, J. R. (1988). *Biochemistry* **27**, 1158-1167.
17. Bogan, A. A., Thorn, K. S. (1998). *J. Mol. Biol.* **280**, 1-9.
18. Bohinski, R. C. (1991). *Biochemistry*. 5^a ed. Addison-Wesley, Wilmington.

19. Böhm, H. J., Schneider, G., Kubinyi, H., Mannhold, R., Timmerman, H. (2000). *Virtual Screening for Bioactive Molecules (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)*. Ed. Wiley-VCH. Weinheim.
20. Boobis, A., Gunder-Remy, U., Kremers, P., Macheras, P., Pelkonen, O. (2004). *Eur. J. Pharm. Sci.* **17**, 183-193.
21. Borchert, T. V., Abagyan, R., Jaenicke, R., Wierenga, R. K. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1515-1518.
22. Borchert, T. V., Zeelen, J. P., Schliebs, W., Callens, M., Minke, W., Jaenicke, R., Wierenga, R. K. (1995). *FEBS Lett.* **367**, 315-318.
23. Broach, J. R., Thorner, J. (1996). *Nature* **384**, 14-16.
24. Bugrim, A., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y. (2004). *Drug Discov. Today* **9**, 127-135.
25. Cao, Z. W., Xue, Y., Han, L. Y., Xie, B., Zhou, H., Zheng, C. J., Lin, H. H., Chen, Y. Z. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, 679-685.
26. Cannata, J. B., Cataldi de Flonbaum, M. A., Cazzulo, J. J., Segura, E. L. (1977). *Comp. Biochem. Physiol.* **58B**, 67-69.
27. Cantor, C. R., Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry, part III*. W. H. Freeman, New York.
28. Cháñez-Cárdenas, M. E., Pérez-Hernández, G., Sánchez-Rebollar, B. G., Costas, M., Vázquez-Contreras, E. (2005). *Biochemistry* **44**, 10883-10892.
29. Chen, J., Swamidass, S. J., Dou, Y., Bruand, J., Baldi, P. (2005). *Bioinformatics* **20**, 1-7.
30. Chen, Y., Barkley, M. D. (1998). *Biochemistry* **37**, 9976-9982.
31. Chothia, C., Janin, J. (1975). *Nature* **256**, 705-708.
32. Cremades, N., Sancho, J., Freire, E. (2006). *TRENDS in Biochem. Sci.* **31**, 494-496.
33. Delarue, M., Sanejouand, Y. H. (2002). *J. Mol. Biol.* **320**, 1011-1024.
34. Demchenko, A. P. (1988). *Eur. Biophys. J.* **16**, 121-129.
35. Demchenko, A. P., Ladokhin, A. S. (1988). *Eur. Biophys. J.* **15**, 369-379.
36. Demirel, M. C., Atilgan, A. R., Jernigan, R. L., Erman, B., Bahar, I. (1998). *Protein Sci.* **7**, 2522-2532.
37. Dill, K. A. (1990). *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
38. Dobson, C. M. (2004). *Cell & Developmental Biology* **15**, 3-16.

39. Dougherty, D. A. (1996). *Science* **271**, 163-168.
40. Echols, N., Milburn, D., Gerstein, M. (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**, 478-482.
41. Erlandsen, H., Abola, E. E., Stevens, C. (2000). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 719-730.
42. Espinoza-Fonseca, L. M., Trujillo-Ferrara, J. G. (2004). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**, 3151-3154.
43. Espinoza-Fonseca, L. M., Trujillo-Ferrara, J. G. (2005). *BBRC.* **328**, 922-928.
44. Estrada, J. (2006). *Manual de Estancia de Investigación. Centro de Biología Molecular. Unidad de Bioinformática, Madrid, España. Universidad de Zaragoza, España.*
45. Fairlamb, A. H., Cerami, A. (1992). *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 695-729.
46. Fernández-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. (2004). *Nature Biotechnology* **22**, 1302-1306.
47. Fernández-Velasco, D. A. (1995). *Boletín de Educación Bioquímica* **14**, 5-10.
48. Fersht, A. (1988). *Structure and Mechanism in Protein Science.* W. H. Freeman, New York, United States of America.
49. Frauenfelder, H., McMahon, B. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4795-4797.
50. Freire, E. (1998). *Adv. Protein Chem.* **51**, 255-279.
51. Freire, E. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10118-10122.
52. Freire, E. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11680-11682.
53. Gallivan, J. P., Dougherty, D. A. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9459-9464.
54. Gallivan, J. P., Dougherty, D. A. (2000). *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 870-874.
55. Gao, X. G., Garza-Ramos, G., Saavedra-Lira, E., Cabrera, N., De Gómez-Puyou, M. T., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1998). *Biochem. J.* **332**, 91-96.
56. Gao, X. G., Maldonado, E., Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Rodríguez-Romero, A. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10062-10067.
57. García, A. E., Harman, J. G. (1996) *Protein Sci.* **5**, 62-71.
58. Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Rojo-Domínguez, A., De Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. (1996). *Eur. J. Biochem.* **241**, 114-120.

59. Garza-Ramos, G., Cabrera, N., Saavedra-Lira, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ostoa-Saloma, P., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1998). *Eur. J. Biochem.* **253**, 684-691.
60. Gasteiger, J., Marsili, M. (1980). *Tetrahedron* **36**, 3219-3228.
61. Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., Pérez-Montfort, R. (1995). *Chem. Biol.* **2**, 847-855.
62. González-Mondragón, E. G. (2004). Papel del residuo conservado Cys 126 en la catálisis y estabilidad de la triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F.
63. Goto, K. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 497-501.
64. Guallar, V., Jacobson, M., McDermott, A., Friesner, A. (2004). *J. Mol. Biol.* **337**, 227-239.
65. Gutiérrez de Terán Castañón, H. (2004). Modelización molecular de los receptores de adenosina y sus ligandos en el marco de diseño de fármacos asistido por ordenador. Tesis doctoral. Universitat Pompeu Fabra. España, Barcelona.
66. Haliloglu, T., Bahar, I. (1999). *Proteins* **37**, 654-667.
67. Haliloglu, T., Bahar, I., Erman, B. (1997). *Phys. Rev. Lett.* **79**, 3090-3093.
68. Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Mendoza-Hernández, G., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R. (2002). *Biochemistry* **41**, 4230-4238.
69. Hetényi, C., Van der Spoel, D. (2002). *Protein Sci.* **11**, 1729-1737.
70. Hetényi, C., Van der Spoel, D. (2006). *FEBS Lett.* **580**, 1447-1450.
71. Hilser, V. J., García-Moreno, E. B., Oas, T. G., Kapp, G., Whitten, S. T. (2006). *Chem. Rev.* **106**, 1545-1558.
72. Hilser, V. J., Freire, E. (1996). *J. Mol. Biol.* **262**, 756-772.
73. Hilser, V. J., Freire, E. (1997). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **27**, 171-183.
74. Hilser, V. J., Townsend, B. D., Freire, E. (1997). *Biophys. Chem.* **64**, 69-79.
75. Hinsen, K. (1998). *Proteins* **33**, 417-429.
76. Horn, J. R., Schoichet, B. K. (2003). *J. Mol. Biol.* **336**, 1283-1291.
77. Horiuchi, T., Go, N. (1991). *Proteins* **10**, 106-116.
78. Horton, N., Lewis, M. (1992). *Protein Sci.* **1**, 169-181.

79. Hu, Z., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2000). *Proteins* **39**, 331-342.
80. Janin, J. (1995). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **21**, 30-39.
81. Janin, J. (1997). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **28**, 153-161.
82. Janin, J., Miller, S., Chothia, C. (1988). *J. Mol. Biol.* **204**, 155-164.
83. Jaenicke, R. (1987). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237.
84. Jaenicke, R. (1996). *Current Topics in Cellular Recognition* **34**, 209-314.
85. Jaenicke, R., Lilie, H. (2000). *Adv. Protein Chem.* **53**, 329-397.
86. Jeng, M. F., Englander, S. W. (1991). *J. Mol. Biol.* **221**, 1045-1061.
87. Jogl, G., Rozovsky, S., McDermott, A. E., Tong, L. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 50-55.
88. Johnson, M. A., Maggiora, G. M. (1990). *Concepts and Application of Molecular Similarity*. Ed. Wiley. New York.
89. Jones, S., Thornton, J. M. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13-20.
90. Jorgensen, W. L. (2004). *Science* **303**, 1813-1818.
91. Kamtekar, S., Schiffer, J. M., Xiong, H., Babik, J. M., Hecht, M. H. (1993). *Science* **262**, 1680-1685.
92. Kauzmann, W. (1959). *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
93. Kellenberger, E., Rodrigo, J., Muller, P., Rognan, D. (2004). *Proteins* **54**, 225-242.
94. Kenny, B. A., Bushfield, M., Parry-Smith, D. J., Fogarty, S., Treherne, J. M. (1998). *Prog. Drug. Res.* **51**, 245-269.
95. Kim, D. E., Chivian, D., Baker, D. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, W526-W531.
96. Kim, K. S., Woodward, C. (1993). *Biochemistry* **32**, 9609-9613.
97. Kisselev, O. G. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4270-4275.
98. Knowles, J. R. (1991). *Nature* **350**, 121-124.
99. Knowles, J. R., Alberly, W. J. (1977). *Accounts of Chem. Res.* **10**, 105-111.
100. Kohlhoff, M., Dahm, A., Hensel, R. (1996). *FEBS Lett.* **383**, 245-250.
101. Kortemme, T., Baker, D. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14116-14121.

102. Kortemme, T., Kim, D. E., Baker, D. Computational Alanine Scanning of Protein-Protein Interfaces (2004). *Sci. STKE*.
103. Krovat, E. M., Fruhwirth, K. H., Langer, T. (2005). *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 146-159.
104. Kuntz, I. D. (1992). *Science* **257**, 1078-1082.
105. Langer, T., Wolber, G. (2004). *Drug Discovery Today Technologies* **1**, 203-207.
106. Lawrence, M. C., Colman, P. M. (1993). *J. Mol. Biol.* **234**, 946-950.
107. Leach, A. R. (2004). *Molecular modeling. Principles and applications*. AddisonWesley-Longman Ltd. Essex, Inglaterra.
108. Lesk, A. M. (2001). *Introduction to Protein Architecture*. 2^a ed. Oxford University Press, Oxford.
109. Li, H. L. (1999). *Mol. Pharmacol.* **55**, 134-141.
110. Liang, J., Edelsbrunner, H., Woodward, C. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1884-1897.
111. Liang, J., Edelsbrunner, H., Fu, P., Sudhakar, P. V., Subramaniam, S. (1998). *Proteins Struct. Funct. Genet.* **33**, 18-29.
112. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. (2001). *J. Mol. Mod.* **7**, 306-317.
113. Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., Serrano, L. (2004). *J. Mol. Biol.* **342**, 345-353.
114. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **46**, 3-26.
115. Liu, T., Whitten, S. T., Hilser, V. J. (2006). *Proteins* **62**, 728-738.
116. Lo Conte, L., Chothia, C., Janin, J. (1999). *J. Mol. Biol.* **285**, 2177-2198.
117. Loh, S. N., Prehoda, K. E., Wang, J., Markley, J. L. (1993). *Biochemistry* **32**, 11022-11028.
118. Lolis, E., Petsko, G.A. (1990). *Biochemistry* **29**, 6619-6625.
119. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Álvarez, M., Thí, M. H., Backmann, J., Martial, J. A., Wyns, L., Jaenicke, R., Wierenga, R. K. (1999). *Proteins* **37**, 441-453.
120. Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J. M., Mande, S. C., Hol, W. G., Martial, J. A., Goraj, K. (1996). *J. Mol. Biol.* **257**, 441-456.
121. Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P. (2002). *J. Biol. Chem.* **227**, 25106-25114.

122. Maldonado, A. G., Doucet, J. P., Petitjean, M., Fan, B. T. (2006). *Molecular Diversity* **10**, 39-79.
123. Maldonado, E., Soriano-García, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Purou, A., Pérez-Montfort, R. (1998). *J. Mol. Biol.* **283**, 193-203.
124. Marshall, G. R. (1999). *Lett. Pept. Sci.* **6**, 283-288.
125. Mattos C., Ringe D. (1996). *Nature Biotech.* **14**, 595-599.
126. McCoy, A. J., Epa, V. A., Colman, P. M. (1997). *J. Mol. Biol.* **268**, 570-584.
127. McMartin, C., Bohacek, R. S. (1997). *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **11**, 333-344.
128. Meyerhof, O., Beck, L. V. (1944). *J. Biol. Chem.* **156**, 109-120.
129. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. (1998). *J. Comput. Chem.* **19**, 1639-1662.
130. Muehldorf, A. V., Van Engen, D., Warner, J. C., Hamilton, A. D. (1988). *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6561-6568.
131. Némethy, G., Peer, W. J., Scheraga, H. A. (1981). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10**, 459-497.
132. Noguti, T., Go, N. (1982) *Nature* **296**, 776-778.
133. Okada, A. (2001). *Biochemistry* **40**, 6053-6060.
134. Olivares-Illana, V., Pérez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. (2006). *Biochemistry* **45**, 2556-2560.
135. Olivares-Illana, V., Rodríguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., García, J., Pérez-Montfort, R., Cabrera, N., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2007). *PLoS Negl Trop Dis* 1(1): e01.
136. Oprea, T. I. (2003). *Cheminformatics from Data to Knowledge*. Ed. Wiley-VCH. New York.
137. Ostoa-Saloma, P., Garza-Ramos, G., Ramírez, J., Becker, I., Berzunza, M., Landa, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R. (1997). *Eur. J. Biochem.* **244**, 700-705.
138. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.

139. Padilla-Zúñiga, J. A., Rojo-Domínguez, A. (2002). Mensaje Bioquímico. Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o Docking. Aplicación al diseño de fármacos. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
140. Pan, H., Lee, Ch., Hilser, V. J. (2000). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 12020-12025.
141. Parra, G., Blanco, E., Guigo, R. (2000). Genome Res. **10**, 511-515.
142. Pattanaik, P., Ravindra, G., Sengupta, C., Maithal, K., Balaram, P., Balaram, H. (2003). Eur. J. Biochem. **270**, 745-756.
143. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Gao, X., Maldonado, E., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (1999). Biochemistry **38**, 4114-4120.
144. Prada-Gracia, D. (2004) Memoria de la obtención del Diploma de Estudios Avanzados (DEA). Departamento de Física de la Materia Condensada de la Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza, España.
145. Privalov, P. L. (1979). Advan. Protein Chem. **33**, 167-241.
146. Putman, S. J., Coulson, A. F. W., Farley, I. R. T., Riddleston, B., Knowles, J. R. (1972). Biochem. J. **129**, 301-310.
147. Rarey M., Wefing S., Lengauer, T. (1996). J. Comp. Adv. Mol. Des. **10**, 41-54.
148. Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Mendoza-Hernández, G., López-Velásquez, G., Pérez-Montfort, R., Tuena De Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2002). Proteins Struct. Funct. Genet. **48**, 580-590.
149. Reyes-Vivas, H., Hernández-Alcántara, G., López-Velázquez, G., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2001). Biochemistry **40**, 3134-3140.
150. Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, D. A. (2002). J. Mol. Biol. **322**, 669-675.
151. Rosenfeld, R. J., Goodsell, D. S., Musah, R. A., Morris, G. M., Goodin, D. B., Olson, A. J. (2003). J. Comput. Aided Mol. Des. **17**, 525-536.
152. Rozacky. E. E., Sawyer, T. H., Barton, R. A., Gracy, R. W. (1971). Arch. Biochem. Biophys. **146**, 312-320.
153. Sadqi, M., Casares, S., Abril, M. A., López-Mayorga, O., Conejero-Lara, F. (1999). Biochemistry **38**, 8899-8906.
154. Sampson, N. S., Knowles, J. R. (1992). Biochemistry **31**, 8482-8487.
155. Schnackerz, K. D., Gracy, R. W. (1991). Eur. J. Biochem. **199**, 231-238.

156. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., Wierenga, R. K. (1996). *Protein Sci.* **5**, 229-239.
157. Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., Wierenga, R. K. (1997). *Biochemistry* **36**, 9655-9662.
158. Shön, A., Madani, N., Klein, J. C., Hubicki, A., Ng, D., Yang, X., Smith, A. B., Sodroski, J., Freire, E. (2006). *Biochemistry* **45**, 10973-10980.
159. Schulman, B. A., Redfield, C., Peng, Z., Dobson, C. M., Kim, P. S. (1995). *J. Mol. Biol.* **253**, 651-657.
160. Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., Serrano, L. (2005). *Nucleic Acids Res.* **33**, W382-W388.
161. Segel, I. (1982). *Biochemical calculations: how to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry*. 2^a ed. Wiley, New York.
162. Sousa, S. F., Fernández, P. A., Ramos, M. J. (2006). *Proteins* **65**, 15-26.
163. Suhre, K., Sanejouand, Y. H. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, W610-W614.
164. Sun, A. Q., Yüksel, Ü., Gracy, R. W. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 361-368.
165. Sun, J., Sampson, N. S. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1495-1505.
166. Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991). *Science* **253**, 872-879.
167. Swint-Kruse, L., Robertson, A. D. (1996). *Biochemistry* **35**, 171-180.
168. Tama, F., Gadea, F. X., Marques, O., Sanejouand, Y. H. (2000). *Proteins* **41**, 1-7.
169. Tama, F., Sanejouand, Y. H. (2001). *Protein Eng.* **14**, 1-6.
170. Tama, F. (2003). *Protein Pept. Lett.* **10**, 119-132.
171. Téllez-Valencia, A., Ávila-Ríos, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez Puyou, M., López-Calahorra, F., Gómez-Puyou, A. (2002). *BBRC* **295**, 958-963.
172. Téllez-Valencia, A., Olivares-Illiana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas-M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2004). *J. Mol. Biol.* **341**, 1355-1365.
173. Temiz, N. A., Bahar, I. (2002). *Proteins* **49**, 61-70.
174. Terfloth, L. (2003). *Chemoinformatics Ed.* Wiley-VCH, Weinheim.
175. Todd, M. J., Freire, E. (1999). *Proteins* **36**, 147-156.

176. Tsai, J. C., Liang-Ling, S. Wolfson, H. J., Nussinov, R. (1997). *Protein Sci.* **6**, 53-64.
177. Tsai, J. C., Nussinov, R. (1997). *Protein Sci.* **6**, 1426-1437.
178. Tsai, J. C., Xu, D., Nussinov, R. (1997). *Protein Sci.* **6**, 1793-1805.
179. Verlinde, C. L., Merritt, E. A., Van der Akker, F., Ki, H., Fiel, I., Delboni, L. F., Mande, S. C., Sarfaty, S., Petra, P. H., Hol, W. G. J. (1994). *Protein Sci.* **3**, 1670-1686.
180. Voet, D., Voet, J. G. (1992). *Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona, España.
181. Voguel, C., Bastón, M., Kerrison, N. D., Chothia, C., Teichmann, S. A. (2004). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 208-216.
182. Waco, H., Kato, M., Endo, S. (2003). *Genome Informatics* **13**, 519-520.
183. Waco, H., Kato, M., Endo, S. (2004). *Bioinformatics* **20**, 2035-2043.
184. Walden, H., Bell, G. B., Rusell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, G. L. (2001). *J. Mol. Biol.* **306**, 745-757.
185. Wallace, A. C., Laskowski, R. A., Thornton, J. M. (1995). *Protein Eng.* **8**, 127-134.
186. Wang, C. C. (1995). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 93-127.
187. Wang, R., Lu, Y., Wang, S. (2003). *J. Med. Chem.* **46**, 2287-2303.
188. Warshel, A. (1991). *Computer modelling of chemical reactions in enzymes and solutions*. Ed. Wiley VCH. New York, U. S. A.
189. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T., Case, D. A. (1986). *J. Comp. Chem.* **7**, 230-230.
190. Weininger, D. (1998). *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **28**, 31-36.
191. Whitten, S. T., Kurtz, A. J., Pometun, M. S., Wand, A. J., Hilser, V. J. (2006). *Biochemistry* **45**, 10163-10169.
192. Wierenga, R. K., Noble, M. E., Vriend, G., Nauche, S., Hol, W. G. J. (1991). *J. Mol. Biol.* **220**, 995-1015.
193. Wierenga, R. K., Noble, M. E., Davenport, R. C. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 1115-1126.
194. Willett, P. (1998). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38**, 983-996.
195. Willett, P. (2005). *FIS2005*, 1-15.
196. Williams, J. C., McDermott, A. E. (1995). *Biochemistry* **34**, 8309-8319.

197. Wilson, M., Lauth, N., Perie, J., Callens, M., Opperdoes, F. R. (1994). *Biochemistry* **33**, 214-220.
198. Winzor, D. J., Sawyer, W. H. (1995). *Quantitative Characterization of Ligand Binding*. Ed. Wiley-Liss, New York.
199. Wolber, G., Langer, T. (2005). *J. Chem. Inf. Mod.* **45**, 160-169.
200. Xue, L., Godde, J. W., Stahura, F. L., Bajorath, J. (2004). *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**, 1275-1281.
201. Yang, L. W., Liu, X., Jursa, C. J., Holliman, M., Rader, A. J., Karimi, H. A., Bahar, I. (2005). *Bioinformatics* **21**, 2978-2987.
202. Zacharias, N., Dougherty, D. A. (2002). *TRENDS in Pharmacol. Sci.* **23**, 281-287.
203. Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, J., Petsko, G. A. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7406-7411.
204. Zhang, Y., Yüksel, Ü., Gracy, R. W. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **317**, 112-120.
205. Zhong, W., Gallivan, J. P., Zhang, Y., Li, L., Lester, H. A., Dougherty, D. A. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12088-12093.
206. Zomosa-Signoret, V., Hernández-Alcántara, G., Reyes-Vivas, H., Martínez-Martínez, E., Garza-Ramos, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (2003). *Biochemistry* **42**, 3311-3318.
207. Zubillaga, R. A., Pérez-Montfort, R., Gómez-Puyou, A. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 328-336.

Direcciones electrónicas

- Protein Data Bank
<http://www.rcsb.org/pdb/>
Base de datos conteniendo las coordenadas 3D de estructuras de proteínas determinadas experimentalmente.
- GETAREA
http://www.scsb.utmb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl
Servidor para calcular el área expuesta al solvente en una biomolécula.
- ROBETTA
<http://rosetta.bakerlab.org>
Servidor para calcular la contribución, en la estabilidad de una biomolécula, de cada uno de los residuos de aminoácido de una región interfacial.
- ExPASy Proteomics Server
<http://www.expasy.org/>
Servidor dedicado al análisis de secuencias y estructuras de proteínas.

- Elnémo
<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/elnemo/index.html>
Servidor para calcular los modos normales de vibración de una biomolécula.
- TANGO
<http://tango.embl.de/>
Servidor para calcular los residuos con tendencia a agregar.
- CASTp
<http://cast.engr.uic.edu/cast/>
Servidor para calcular las cavidades presentes en una biomolécula.
- COREX-Best
<http://www.hbcg.utmb.edu/hilser/corexbest.htm>
Servidor para identificar zonas poco estables en una biomolécula, en función del cálculo de las constantes de estabilidad por residuo.
- UCI ChemDB Featured Sections
ChemDB (<http://cdb.ics.uci.edu/CHEM/Web/>)
Base de datos de compuestos químicos que contiene casi 5 millones de moléculas pequeñas, disponibles comercialmente; éstas cumplen con las reglas de Lipinski. Los datos químicos disponibles incluyen propiedades fisicoquímicas determinadas experimentalmente, tales como la estructura 3D, la temperatura de fusión y solubilidad, entre otras. Pueden realizarse búsquedas químicas (por similitud o por estructura) empleando diversos criterios, por ejemplo: número de enlaces rotables, donadores de puentes de hidrógeno y coeficientes de partición octanol/agua.
Universidad de California en Irving (UCI).
- ZINC
<http://blaster.docking.org/zinc/>
Base de datos de compuestos químicos que contiene cerca de 4.6 millones de compuestos listos para utilizarse en procesos de cribado virtual. Pueden realizarse búsquedas químicas empleando criterios químicos como carga neta, número de enlaces rotables, donadores y aceptores de puentes de hidrógeno y coeficientes de partición octanol/agua.
Universidad de California, San Francisco (UCSF).
- eMolecules
<http://www.emolecules.com/>
Base de datos de compuestos químicos conteniendo más de 7 millones de compuestos, disponibles comercialmente. La búsqueda de compuestos se puede realizar por subestructura o por similitud, empleando coeficientes como el de Tanimoto o Tversky.
- The CADD Group's Chemoinformatics Tools and User Services
Chemical Structure Lookup Service (CSLS)
<http://cactus.nci.nih.gov/>
Base de datos de compuestos químicos que contiene cerca de 27 millones de estructuras únicas. La búsqueda puede realizarse por subestructura, formulas moleculares, por identificador InChI™ (The IUPAC Internacional Chemical Identifier) o por identificadores FICus.

ANEXO I.

AI. Estabilidad de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* en distintas soluciones amortiguadoras.

Se sabe que el solvente más importante para las proteínas es el agua -ésta constituye el ambiente nativo de la mayoría de las proteínas solubles- y que la estructura nativa está determinada en gran medida por el balance de una enorme cantidad de interacciones de los residuos de aminoácidos con la solución acuosa que la rodea, es decir, la estructura compacta de proteínas globulares se deriva de la optimización de todas las interacciones de los átomos de la molécula y de las interacciones con el solvente que la envuelve (Némethy, G., 1981). La conformación de una proteína nativa corresponde a un sistema dinámico, que fluctúa entre un número determinado de conformaciones, y no a una estructura única, siendo este sistema el que determina que se lleve a cabo el proceso catalítico (Jaenicke, R., 1987, Jaenicke, R., 1996).

Existen distintas técnicas que pueden ser empleadas para caracterizar la conformación de las proteínas; éstas también pueden ser utilizadas para evaluar los cambios en la estructura nativa debidos a condiciones estresantes que inducen un proceso de desnaturalización (cambios de pH, temperatura, presión, concentraciones de agentes desnaturalizantes, composición de las soluciones amortiguadoras); entendiéndose por desnaturalización el cambio en la conformación activa debido a efectos en las interacciones no covalentes, sin cambio alguno en las interacciones covalentes (lo anterior no debe confundirse con el proceso de desplegamiento, en el que los cambios en las interacciones covalentes originan estados parcialmente plegados con muy poca estructura o carentes de ella). Cabe mencionarse que los cambios moderados en las condiciones ambientales pueden no tener un gran efecto sobre la estructura nativa de las proteínas; sin embargo, si el cambio en alguna variable excede un valor crítico la proteína se desnaturaliza cooperativamente (Fernández-Velasco, D. A., 1995).

Con respecto a lo mencionado anteriormente, mediciones de espectroscopía de fluorescencia (intrínseca o extrínseca) permiten apreciar si existe un proceso de pérdida de estructura terciaria. Mediciones de espectroscopía de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano (190-260 nm), permiten evaluar los cambios en la estructura secundaria de la enzima. Finalmente, la determinación de la actividad enzimática nos permite evaluar la integridad estructural y funcional de la enzima, ya que está ampliamente reportado que, para que la macromolécula lleve a cabo la catálisis debe encontrarse en su estado nativo.

En nuestro caso, se evaluó la integridad estructural y la actividad enzimática de TcTIM en función de la solución amortiguadora empleada. Observamos que cuando se varía la composición de las soluciones, existe un proceso de pérdida de estructura terciaria, secundaria y una disminución dramática en la capacidad catalítica de la enzima. Estos eventos implican un proceso de una sola etapa. Es posible que el efecto de la composición de la solución amortiguadora sobre el dímero activo sea la desestabilización de los contactos no covalentes, teniendo como resultado la exposición de zonas hidrofóbicas de la molécula; esto quizás provoque la interacción de los triptófanos con el solvente, por lo que se registra una disminución de la intensidad de fluorescencia intrínseca, un aumento en la intensidad de fluorescencia extrínseca y una disminución de la elipticidad molar por residuo promedio, así como de la actividad enzimática.

AI.1. Fluorescencia intrínseca.

Al hacer un seguimiento del desplazamiento del centro de masa espectral (CME), excitando los grupos indol de residuos de triptófano, logramos apreciar un desplazamiento de la señal con el tiempo hacia longitudes de onda más altas (aprox. 350 nm), en cualquiera de las soluciones amortiguadoras empleadas, lo que indica la exposición gradual de triptófanos (W) (fig. 58).

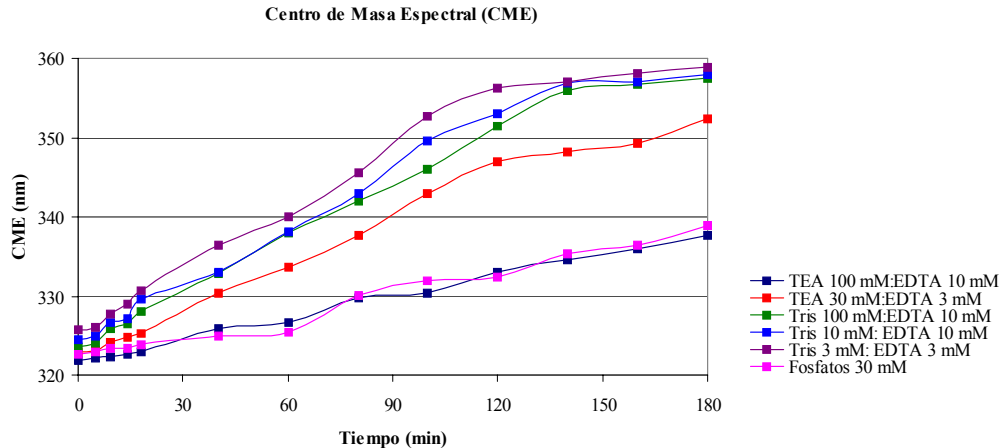


Fig. 58. Centros de masa espectral calculados a partir de los espectros de emisión de fluorescencia de TcTIM. Éstos se obtuvieron en distintas soluciones amortiguadoras a pH 7.4 y 36 °C, excitando a 295 nm y registrando el intervalo de emisión entre los 310 y 410 nm.

Puesto que se encuentra reportado que en un medio hidrofóbico, como el interior de una proteína plegada, la emisión de los W se lleva a cabo a longitudes de onda menores (320 nm) que la que ocurre cuando estos residuos se exponen al solvente (350 nm), es posible seguir los cambios en la intensidad de fluorescencia y el cambio de la longitud de onda de máxima emisión y obtener información del ambiente en el que se encuentran los W. Como se mencionó anteriormente, cuando registramos los cambios en el CME de TcTIM, pudimos observar desplazamientos que indican que estos fluoróforos están sufriendo cambios en la exposición al solvente, los cuales pueden estar asociados con la inestabilidad de la enzima en las distintas soluciones amortiguadoras. Podemos apreciar que TcTIM se mantiene estable, o que se registra una pérdida mínima de estructura terciaria, cuando la solución amortiguadora está constituida por TEA (en una concentración de 100 mM) y EDTA (en concentraciones de 10 mM), así como por fosfatos en una concentración de 30 mM. Lo anterior podría relacionarse con el tipo de interacciones que establecen las moléculas que constituyen el medio que circunda a la macromolécula, quizás de tipo electrostáticas y mediadas por puentes de hidrógeno. Con la finalidad de determinar el papel que estas interacciones juegan en la estabilidad de TcTIM, se realizaron ejercicios de docking, en los que se determinaron los sitios de unión a estas moléculas en la superficie de TIM, así como la descripción geométrica y química de los sitios de anclaje (datos mostrados más adelante).

Cuando realizamos el seguimiento de la disminución de la intensidad de fluorescencia a través del tiempo, pudimos determinar que en todos los casos se observaba un proceso de pérdida de la integridad de la estructura terciaria. Los trazos experimentales se ajustaron a un modelo de una exponencial, lo cual se relaciona con un proceso que ocurre en una sola etapa. En la tabla 18 se muestran los valores de las constantes de velocidad calculadas.

Tabla 18. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura terciaria de TcTIM determinadas en distintos reguladores manteniendo el pH en un valor de 7.4 a 36 °C. Se registró la emisión de fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos W, Y, F. Se ajustó el trazo experimental a un modelo de una exponencial, $y = C0 + A*((exp(-k*t))-1)$; donde C0 es el valor inicial de la señal, A es la amplitud del cambio en la señal, y k es la constante de velocidad en min^{-1} .

Solución amortiguadora	Fosfatos 30 mM	TEA 100 mM EDTA 10 mM	TRIS 10 mM EDTA 10 mM	TRIS 3 mM EDTA 3 mM
k (min^{-1})	0,0008	0,0014	0,0026	0,0114

La pérdida de estructura terciaria es más rápida cuando la solución amortiguadora está compuesta por TRIS 3 mM: EDTA 3 mM; cuando se emplea TEA 100 mM:EDTA 10 mM el proceso no es tan rápido aunque sigue existiendo una disminución en la intensidad de fluorescencia. Es importante para la discusión de nuestros resultados, resaltar que el área expuesta al solvente por los cinco W presentes en TcTIM no es la misma (tabla 19).

Tabla 19. Áreas expuestas del grupo indol de los W de TcTIM obtenidas empleando el servidor GETAREA 1.1 (http://www.scsb.utmb.edu/getarea/area_form.html) con un radio de prueba de 1.4 Å. El porcentaje de exposición fue calculado con respecto al área del grupo indol aislado del resto de la estructura de TcTIM, es decir, como si se encontrara expuesto en su totalidad.

	CG	CD1	CD2	NE1	CE2	CE3	CZ2	CZ3	CH2	Suma área _{indol}	% exposición _{indol}
W13	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.24	0.50	0.00	0.27	1.13	0.55
W91	0.00	0.31	0.00	1.53	0.00	0.01	5.38	0.00	0.00	7.23	3.55
W160	0.00	0.03	0.00	1.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.79	0.88
W171	0.23	0.00	1.58	0.00	0.00	0.68	0.23	4.87	0.61	8.2	4.02
W194	0.00	14.01	0.00	12.70	0.00	0.00	9.21	0.00	4.19	40.11	19.67

Podemos apreciar que sólo algunos átomos de W se encuentran expuestos. Posiblemente, la exposición de estos átomos y su interacción con el solvente provocan la disminución de la intensidad de fluorescencia debido probablemente a la transferencia de energía entre ellos; reflejando las interacciones del fluoróforo con las moléculas de solvente circundantes. En la siguiente figura se muestra la disposición de cada triptófano (fig. 59). La localización espacial nos da idea de las zonas que pueden estar siendo expuestas o inestabilizadas.

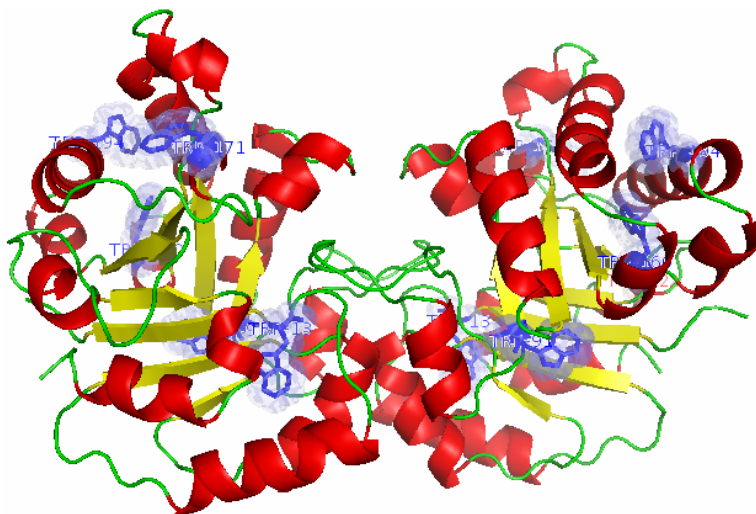


Fig. 59. Localización espacial de los cinco residuos de triptófano (W) de TcTIM (W13, W91, W160, W171, W194) empleando el visualizador Pymol v0.99. La exposición de los W y su localización espacial nos da idea de las zonas que están siendo afectadas.

Las hélices que contienen a los triptófanos 171 y 194 podrían sufrir una relajación en su estructura que permite la interacción del grupo indol con el solvente que rodea la proteína. En la figura 59 podemos visualizar que estos dos residuos poseen átomos que se encuentran relativamente expuestos al solvente. Por ejemplo, la movilidad del asa 6 (conocida también como asa catalítica y la cual contiene el residuo W171), facilitaría la desestabilización, ya que se sabe que esta asa sufre movimientos de apertura y cierre que no necesariamente responden a la presencia de sustrato (Williams, J. C., 1995), además de estar constituida por residuos de aminoácidos con alta tendencia de agregación. Mediante estudios de mutaciones puntuales en ScTIM, se ha podido demostrar que aquellos cambios que desestabilizan la conformación cerrada de la enzima, también alteran significativamente las propiedades catalíticas y conformacionales de ésta (Sampson, N. S, 1992; Sun, J., 1998).

AI.2. Fluorescencia extrínseca.

En lo que se refiere al aumento en la intensidad de fluorescencia extrínseca, y recordando que el fluoróforo extrínseco ANS presenta una dependencia con la polaridad del ambiente incrementándose conforme ésta disminuye, podemos decir que dicho aumento en la intensidad se debe a la unión del ANS a regiones hidrofóbicas de TcTIM; debido a la expansión de la estructura causada por la perturbación de las interacciones entre residuos de la proteína que se encuentran estabilizando la estructura terciaria. Generalmente, la pérdida de la estructura terciaria está asociada al rompimiento de algunas o todas las interacciones que la estabilizan, generándose proteínas con una conformación muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente. Cuando este relajamiento da lugar a la exposición de zonas hidrofóbicas, éstas pueden interactuar formándose agregados que tienden a precipitar. Al igual que en el caso de la fluorescencia intrínseca, se observó un proceso de pérdida de estructura terciaria, ya que, en todos los casos existió un incremento en la intensidad de fluorescencia del fluoróforo extrínseco ANS conforme transcurría el tiempo de registro. Las constantes de velocidad se obtuvieron nuevamente mediante el ajuste del trazo experimental a un modelo de una exponencial (tabla 20).

Tabla 20. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura terciaria de TcTIM determinadas en distintos reguladores manteniendo el pH en un valor de 7.4 a 36 °C. Se registró la emisión de fluorescencia del fluoróforo extrínseco ANS excitando a 380 nm y midiendo la emisión a 407 nm. El ajuste del trazo experimental fue a un modelo de una exponencial, $y = C0 + A*((exp(-k*t))-1)$; donde C0 es el valor inicial de la señal, A es la amplitud del cambio en la señal, y k es la constante de velocidad en min^{-1} .

Solución amortiguadora	Fosfatos 30 mM	TEA 100 mM EDTA 10 mM	TRIS 10 mM EDTA 10 mM	TRIS 3 Mm EDTA 3 mM
k (min^{-1})	0,0059	0.01	0,054*	0,072*

* datos del promedio de dos experimentos.

AI.3. Dicroísmo circular.

Tomando en cuenta las limitaciones que presenta la técnica de dicroísmo circular respecto al uso de amortiguadores, se determinó que el sistema regulador que sería empleado en el desarrollo de nuestra investigación sería el amortiguador de fosfatos; ya que al emplear otras soluciones amortiguadoras se observó tanto una pérdida de estructura secundaria, como efectos de absorción excesiva por parte del amortiguador. En el caso de los amortiguadores conteniendo Tris-HCl en bajas concentraciones, aunque se tenía un valor que no excedía el valor límite del equipo de voltaje (HT) de 700 V, TcTIM no se encontraba estabilizada dado que el trazo aún indicaba pérdida de estructura secundaria conforme transcurría el tiempo de registro.

Cuando se redujo el recorrido óptico, se observó un valor que no excedía el valor de HT, aunque el trazo aún mostraba una mínima pérdida de estructura secundaria conforme transcurría el experimento. Para disminuir la absorción de los amortiguadores, se probó la disminución de la concentración de EDTA en el medio, observándose que la inestabilización de la enzima era mayor conforme se disminuía dicha concentración. Se descartó el uso de amortiguadores de Tris-HCl y se procedió a caracterizar la estabilidad de TcTIM en soluciones amortiguadoras de trietanolamina (TEA).

Se estudió la estabilidad de TcTIM en distintas concentraciones de TEA, con y sin EDTA. Se obtuvieron cinéticas de dicroísmo circular para observar los cambios sobre la estructura secundaria durante un periodo de registro de hasta 4 horas. El recorrido óptico se redujo a 0.5 cm, con la finalidad de disminuir la absorción por la muestra. Aunque ha sido extensamente reportado que TIM de distintas especies es estable en solución amortiguadora de TEA 100 mM : EDTA 10 mM, en estudios de dicroísmo circular se presentó un problema relacionado con una absorción excesiva del regulador. Debido a que esta solución amortiguadora tiene una gran absorción de radiación en la región del UV-lejano, se decidió trabajar con concentraciones molares menores. En todos los casos se observó la pérdida de estructura secundaria. Al explorar la disminución de la concentración de EDTA, nuevamente se observó una dependencia de la pérdida de estructura con la presencia o ausencia de EDTA, aunque en este caso de estructura secundaria, lo que habla de condiciones donde la estructura secundaria de TcTIM no es estable. Los trazos de todos los experimentos se ajustaron a un modelo descrito por una exponencial.

Puesto que está reportado que los fosfatos se unen al sitio activo de TIM, y que este evento a la vez que inhibe, estabiliza la estructura, se decidió probar esta solución amortiguadora en los ensayos de nuestra investigación. En contraste con los resultados anteriores, se observaron condiciones bajo las cuales se logró estabilizar a la enzima; no se observaba pérdida de estructura secundaria, sino que ésta se mantenía constante durante un periodo largo del registro (fig. 60).

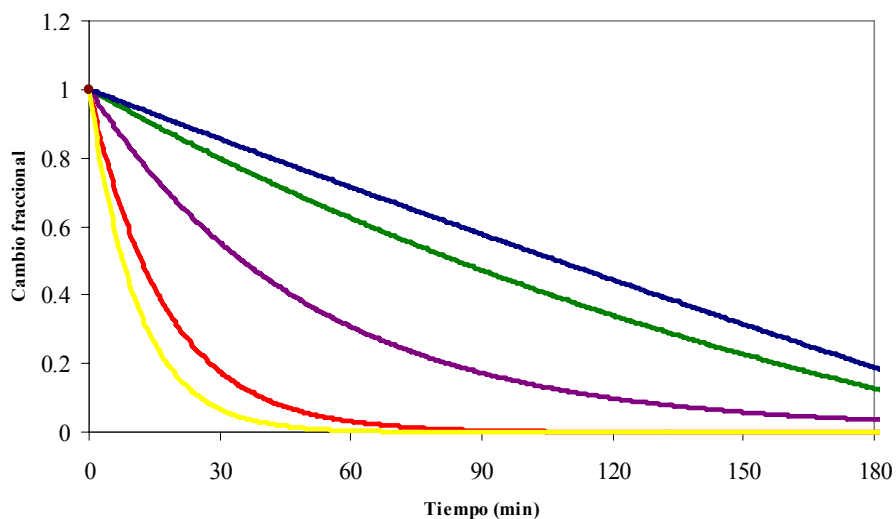


Fig. 60. Comparación de las cinéticas de dicroísmo circular para TcTIM obtenidas en distintas soluciones amortiguadoras a pH 7.4 y 36°C. Fosfatos 30 mM (azul), TEA 30 mM: EDTA 3 mM (verde), TEA 30 mM (morado), Tris-HCl 10 mM: EDTA 10 mM (rojo) y Tris-HCl 10 mM (amarillo). Los trazos cinéticos se muestran normalizados para apreciar mejor el efecto sobre la estructura secundaria de la enzima.

A partir de los resultados mostrados anteriormente se puede decir que la naturaleza de la solución amortiguadora influye en la estabilidad de la enzima a juzgar de los resultados obtenidos por dicroísmo circular y de fluorescencia.

Éstos indican que aparentemente es recomendable utilizar TEA: EDTA hasta un valor mínimo de concentración de 30 mM y 3 mM respectivamente, ya que por debajo de esta concentración se observa inestabilidad de la enzima y por arriba de ellos, en el caso de dicroísmo circular, se presenta una alta absorción y valores de HT tan altos que se “enceguece” el detector del equipo, teniendo como consecuencia la poca confiabilidad en los datos arrojados por éste. Cabe mencionar que para poder utilizar las concentraciones mínimas de TEA y EDTA se requiere el uso de celdas de 0.5 cm de recorrido óptico. Por otro lado, el empleo de una solución amortiguadora de fosfatos con una concentración mínima de 30 mM, permite realizar estudios de dicroísmo circular y garantizar la estabilidad de la enzima (datos mostrados en la tabla 21).

Tablas 21. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura secundaria de TcTIM determinadas en distintas soluciones amortiguadoras, manteniendo el pH en un valor de 7.4 a distintas temperaturas.

Amortiguador	k (min⁻¹)	Amortiguador	k (min⁻¹)
Tris 1.5 mM : EDTA 1.5 mM	0.017	Tris 1.5 mM	0.035
Tris 3 mM : EDTA 3 mM	0.016	Tris 3 mM	0.022
TEA 30 mM : EDTA 3 mM	0.014	TEA 30 mM	0.020
		Fosfatos 30 mM	0.003

AI.4. Actividad enzimática.

De manera paralela a todos los estudios de dicroísmo, se realizaron pruebas de actividad enzimática y se determinaron los parámetros cinéticos de TcTIM a partir de los datos obtenidos. Puesto que el uso de amortiguadores en las investigaciones bioquímicas tiene una enorme importancia, la elección del sistema regulador debe estar en función de la estabilidad que presenta la enzima (Bohinski, R. C., 1991). Como mencionamos anteriormente, en el caso de TcTIM hemos observado, mediante el empleo de técnicas de fluorescencia y de dicroísmo circular, que cambios en el sistema regulador comúnmente utilizado, TEA 100 mM: EDTA 10 mM, traen como consecuencia una disminución en la integridad estructural de la macromolécula, y por lo tanto en la capacidad catalítica de la enzima, además de que el empleo de otros amortiguadores con carga negativa como los fosfatos inhiben la actividad de ésta (ver tabla 22).

Tabla 22. Valores de actividad específica (AE) de TcTIM obtenidos en distintas soluciones amortiguadoras a pH 7.4 y 36 °C. La concentración de G3P fue de 1 mM.

Amortiguador	AE (µmol/min mg)
TEA 100 mM : EDTA 10 mM	4562.7
TEA 30 mM : EDTA 3 mM	4056.9
TRIS 100 mM : EDTA 10 mM	1028.3
TRIS 10 mM : EDTA 10 mM	871.4
TRIS 3 mM : EDTA 3 Mm	376.2
Fosfatos 30 mM	2305.4

Las curvas de las respectivas cinéticas enzimáticas se muestran en la figura 61 (a-f) (pagina siguiente). Sabemos que cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su estabilidad en disolución y provocará la pérdida de la estabilidad molecular; reflejándose en la capacidad de la proteína para llevar a cabo el proceso catalítico en el que se encuentra implicada.

Puede apreciarse que la actividad enzimática depende enormemente del tipo de amortiguador utilizado. En el caso del amortiguador de HCl-Tris, en cualquiera de las tres concentraciones empleadas, es evidente la pérdida de actividad enzimática conforme se incrementa la concentración de sustrato. Una explicación pudiera ser la posible desamidación de las asparaginas (Asn) que se encuentran en la secuencia de TcTIM. Se ha informado que la desamidación provoca cambios drásticos en la estructura de TIM, sabiéndose que la unión del sustrato facilita dicho proceso en forma dependiente del nivel de saturación. Conforme aumenta el número de ciclos catalíticos, aumenta la probabilidad de desamidación dando como resultado una molécula más susceptible de ser degradada. Cuando la desamidación es inducida, ésta depende del tiempo de residencia de Asn en condiciones que la favorecen, la fuente de triosafosfato isomerasa, concentración de sustrato y tipo de solvente (Aswad, D. W., 1995; Sun, A. Q., 1995). Se encuentra reportado en la literatura que los cambios conformacionales debido a la unión del ligando al centro catalítico (tales como la apertura y cierre del asa catalítica) aumentan la desestabilización de la estructura nativa cuando ésta ha sufrido modificaciones químicas tanto en la región interfacial como en otras zonas de la enzima o cuando se encuentra en medios que favorecen la inestabilidad.

Puesto que la pérdida de actividad de TcTIM en los reguladores constituidos por HCl-Tris fue considerable, resultó imposible determinar los parámetros cinéticos de la enzima. Por el contrario, al evaluarse la actividad de TcTIM en los sistemas reguladores constituidos por TEA 100 mM: EDTA 10 mM y fosfatos 30 mM, se obtuvieron los valores de dichos parámetros. La siguiente figura permite apreciar las diferencias en actividad cuando se trabaja con estas soluciones amortiguadoras (fig. 62). La actividad enzimática presentada por TcTIM en la solución reguladora de fosfatos es menor, debido a que los grupos fosfato interactúan con los residuos catalíticos del sitio activo en TcTIM (Jogl, G., 2003; Guallar, V., 2004), impidiendo la fijación del sustrato.

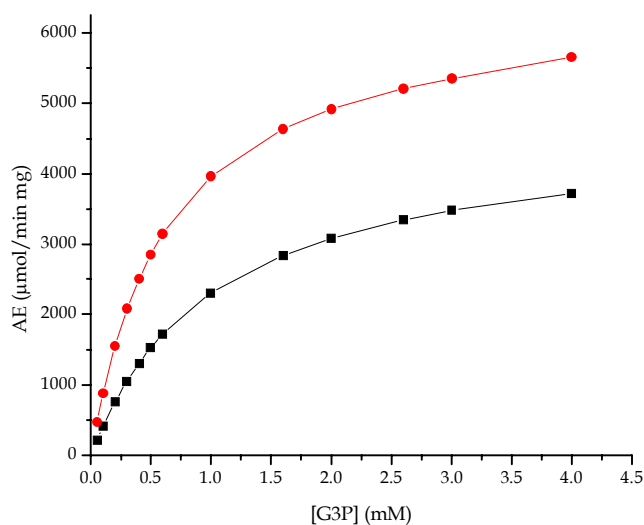


Fig. 62. Comparación de las cinéticas enzimáticas de TcTIM obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM (-■-) y TEA 100 mM:EDTA 10 mM (-●-) pH 7.4 mantenida a 36 °C.

Los parámetros cinéticos se resumen en la tabla 23. Se observa que la frecuencia con la que una enzima -en condiciones de realizar el proceso catalítico- y el sustrato se encuentran uno con otro en la solución decrece, interpretándose como la disminución de enzima nativa que puede recibir y transformar una molécula de sustrato, debido a la ocupación del sitio por los fosfatos.

Tabla 23. Parámetros cinéticos de TcTIM determinados en los reguladores de TEA 100 mM, EDTA 10 mM y fosfatos 30 mM manteniendo el pH en un valor de 7.4 a 36 °C. La concentración del sustrato varió entre 0.05 y 4.0 mM.

Amortiguador	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
TEA 100 mM : EDTA 10 mM	0.53	2331	8.7×10^6
Fosfatos 30 mM	1.0	4267	4.1×10^6

Además, se aprecia un efecto sobre la K_M , ésta aumenta cuando se emplea la solución amortiguadora constituida por fosfatos 30 mM, debido a que éstos inhiben a TcTIM haciéndola menos afín por el sustrato (gliceraldehído-3-fosfato, G3P). Probablemente, los grupos fosfato se encuentran ocupando los sitios de unión, lo que genera una modificación estructural que evita que se lleve de manera adecuada la interacción enzima-sustrato.

Dado que la actividad de una enzima depende en gran parte de la disposición o arreglo espacial adecuado de los grupos funcionales, y de las moléculas de los sustratos que se les unirán y permitirán que se lleve a cabo la reacción química, cualquier cambio en la estructura que evite este proceso repercutirá sobre la capacidad de la enzima para llevar a cabo su función.

De la sobreposición de las estructuras cristalográficas de ScTIM, en presencia del sustrato DHAP (ID PDB: 1NEY (Jogl, G., 2003)), y de TIM de *Trypanosoma cruzi* (ID PDB: 1TDC (Gao, X. G., 1999)) (valor de RMSD de 0.986), pudo determinarse, aunque de manera aproximada, la localización espacial del sustrato en la entrada del sitio activo. Se observa una interacción del grupo fosfato con los residuos de G₁₇₄, S₂₁₄, G₂₃₅ y G₂₃₆, y localizado a menos de 8 Å de los residuos catalíticos. Probablemente esta distribución de interacciones sea la misma en el caso del G3P, puesto que en la estructura química de éste el grupo fosfato se encuentra en la misma posición que en la molécula de DHAP.

Debido a que generalmente se ha empleado el sistema regulador de TEA 100 mM: EDTA 10 mM en los estudios de actividad enzimática para TIM, los efectos de otros sistemas reguladores sobre la actividad catalítica no se encuentran reportados. El efecto del EDTA tampoco ha sido lo suficientemente estudiado. En nuestro caso, evaluamos el papel que podía estar jugando el EDTA en la estabilidad de la enzima. Observamos lo siguiente (fig. 63 (a-e), página siguiente).

Puede observarse que la presencia del EDTA es fundamental para que se lleve a cabo la catálisis. La actividad enzimática disminuye dramáticamente cuando no se encuentran presentes las moléculas de EDTA en la solución. Creemos que las cargas de las moléculas de EDTA funcionan como “grapas” moleculares que estabilizan la estructura de la enzima. Debido a lo anterior, en nuestro trabajo se planteó, además de caracterizar experimentalmente el efecto de la composición de la solución amortiguadora sobre TcTIM, realizar un modelado molecular *in silico* de la interacción con el objetivo de comprender molecularmente este proceso y contribuir en el conocimiento de los procesos que gobiernan la estabilidad de una enzima.

AI.1.5. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y EDTA, TEA y Tris-HCl.

Al realizar un estudio de docking, entre TcTIM y las moléculas de ácido etilendiamintetracético (EDTA), trietanolamina (TEA) y Tris (hidroximetil)aminoetano (Tris-HCl), se obtuvieron los siguientes resultados (fig. 64).

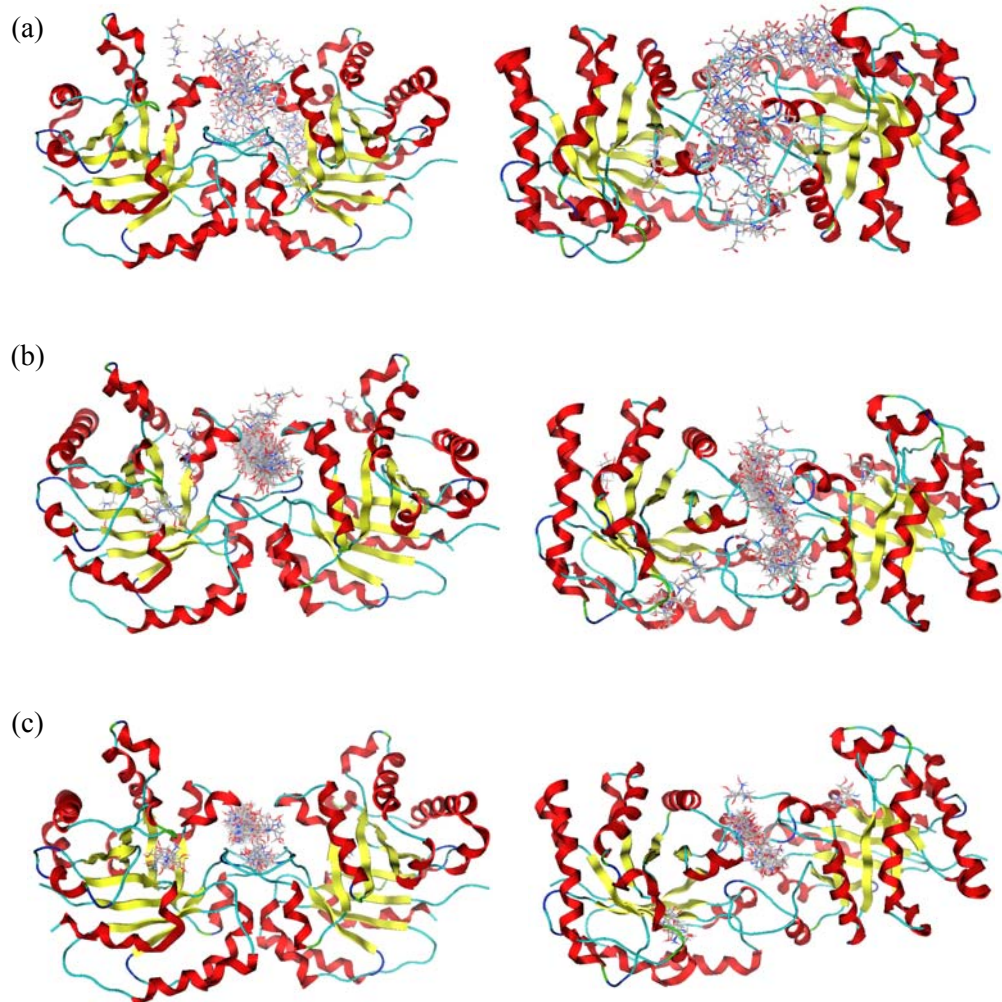


Fig. 64. Localización espacial de los mejores resultados del docking de las moléculas de (a) ácido etilendiamintetracético (EDTA), (b) trietanolamina (TEA) y (c) Tris-(hidroximetil)-aminoetano (Tris-HCl), empleando el programa MOE 2005.06, la cual proporciona una idea de las zonas que están alojando dichas moléculas y que podrían estar jugando un papel importante en la estabilidad de TcTIM.

En todos los casos, las moléculas se alojan en una cavidad que se encuentra localizada en la región interfacial, región que se cree, es esencial para mantener la conformación funcional de TcTIM. Posiblemente, la importancia de la dimerización de la enzima radique en el mantenimiento de una geometría óptima de los residuos catalíticos en el sitio activo. Bajo este contexto, cualquier factor que modifique la interacción de las cadenas que forman la región interfacial, tendrá un efecto sobre la estabilidad y sobre la capacidad catalítica de la enzima.

En general, la región interfacial de una proteína está constituida de dos o más superficies de cadenas proteicas, que exhiben una buena complementariedad electrostática y geométrica (Lawrence, M. C., 1993, Janin, J., 1995, Jones, S., 1996, Janin, J., 1997, McCoy, A. J., 1997). La gran mayoría de estas regiones, ocultan más de 600 \AA^2 del total del área de la superficie de la proteína; asumiéndose que la energía de la unión de las regiones interfaciales se encuentra directamente relacionada con el área de superficie hidrofóbica oculta (Chotia, C., 1975, Privalov, P. L., 1979, Horton, N., 1992, Jones, S., 1996). Otros autores han determinado, a partir del análisis de 2325 interfaces proteicas, la contribución de los distintos residuos de aminoácidos en la unión proteína-proteína. Sus resultados muestran que a nivel de cadenas laterales, existe una muy pequeña correlación entre el área superficial oculta y la energía libre de unión. El principal resultado se refiere a que dicha energía no está uniformemente distribuida en la región interfacial, y que en cambio existen “puntos calientes”, constituidos por un pequeño subconjunto de los residuos de la región interfacial, con energías de unión por arriba del promedio. Estos sitios son ricos en residuos de triptófano, tirosinas y argininas, rodeados de residuos energéticamente menos importantes que sirven para obstruir la entrada de solvente a dichos puntos, ya que esta obstrucción es una condición necesaria de interacciones energéticamente altas. Por otra parte, se ha observado que la interacción de ligandos pequeños con los residuos de estos puntos calientes, influye en el mantenimiento del complejo proteína-proteína (Bogan, A, 1998).

En nuestro caso, el área de la región interfacial es de aproximadamente 1470 \AA^2 , ocultando un área apolar de 992 \AA^2 , y está constituida por 57 residuos de aminoácidos; contiene una de las cavidades más grandes presentes en la estructura de TcTIM, ésta presenta un área de 457 \AA^2 y un volumen de 638 \AA^3 . Es en esta cavidad en la que se encuentran localizadas la mayoría de las soluciones de docking de las tres moléculas de prueba (EDTA, TEA y Tris-HCl), y a juzgar de los resultados del ejercicio de reconocimiento molecular, el sitio en el que aparentemente se unirían para conferir una mayor estabilidad a la estructura de la proteína, actuando como grapas moleculares.

En esta cavidad están presentes una gran cantidad de residuos que se han reportado como residuos importantes en el reconocimiento en interfaces de proteínas, entre ellos de tirosina (6) y de arginina (2), de histidina (4), isoleucina (5) y asparagina (2).

AI.5.1. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y EDTA.

Los ejercicios de docking muestran la unión de la molécula de EDTA predominantemente en la región interfacial de TcTIM. La distribución de la polaridad en el sitio revela que ésta es en su mayoría una cavidad hidrofóbica. La alta densidad de moléculas de EDTA, posiblemente estén obstruyendo la entrada de solvente a la cavidad, ya que como mencionamos anteriormente, esta obstrucción es una condición necesaria para mantener las interacciones que estabilizan a las regiones interfaciales de muchas proteínas. Los átomos de EDTA más cercanos a la región interfacial de TcTIM, se encuentran a 3.42, 3.43 y 3.8 \AA de distancia de los residuos de Y102_A, Y103_A, y de F75_B, respectivamente, otros residuos cercanos a EDTA por menos de 4 \AA , son I109_B, y T70_B (fig. 65).

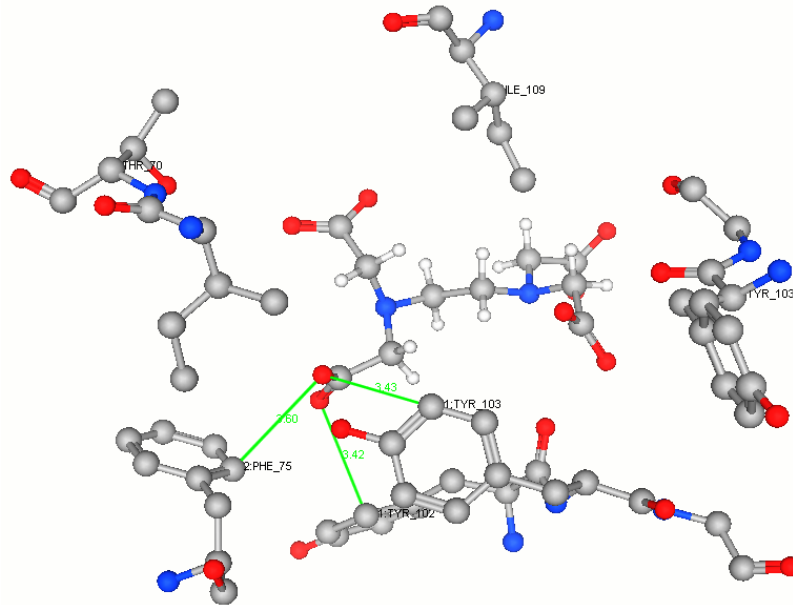


Fig. 65. Acercamiento al sitio de la región interfacial, se muestra uno de los mejores resultados de docking de las moléculas de ácido etilendiamintetracético (EDTA). Puede apreciarse la interacción de EDTA con residuos de Y102_A, Y103_A, F75_B, T70_B y I109_B. La imagen fue generada empleando el programa MOE 2005.06.

Como puede observarse, existen al menos cuatro residuos de aminoácido que han sido reportados previamente como residuos estabilizadores en interfaces proteicas (Bogan, A., 1998). Quizás la interacción de EDTA con éstos, permita el mantenimiento de la estabilidad al actuar como grapas moleculares. Aunque, por otro lado, si observamos la figura 64a, puede apreciarse una distribución de moléculas de EDTA a todo lo largo de la región interfacial.

AI.5.2. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y TEA.

Nuevamente se aprecia que hay una distribución de las moléculas de TEA a lo largo de la región interfacial (fig. 64 b). En este caso, existe un mayor número de residuos de aminoácido cercanos a la molécula de TEA, debido a la penetración de la molécula hacia zonas más internas de la cavidad (fig. 66). Los átomos de la molécula de TEA están a menos de 4 Å de una gran cantidad de residuos de aminoácido. La siguiente tabla (tabla 24) enlista los residuos con los que, predominantemente, establecen contacto las distintas soluciones de docking para la molécula de TEA.

Tabla 24. Residuos con los que, en promedio, establecen contacto a menos de 4 Å, las distintas soluciones de docking para la molécula de TEA.

Cadena A	Cadena B	Cadena B	Cadena B
C15	N67	S80	V110
E98	A68	L81	A111
R99	I69	L94	E112
L101	T70	E105	K113
Y102	R71	T106	V114
Y103	F75	N107	A115
G104	E78	E108	Q116
E105	V79	I109	A117

El análisis de la mayoría de las soluciones de docking encontradas muestra un patrón similar. En casi todas ellas, se aprecia una interacción muy cerrada y con un gran número de residuos de aminoácidos en contacto con las moléculas de TEA. Si se observara la figura 64 b, puede visualizarse el papel de las moléculas de TEA en cuanto a la accesibilidad a la cavidad. Aparentemente, la distribución de éstas evita el acceso del solvente al interior de la cavidad de la región interfacial, teniendo un efecto estabilizante de la estructura dimérica de TcTIM.

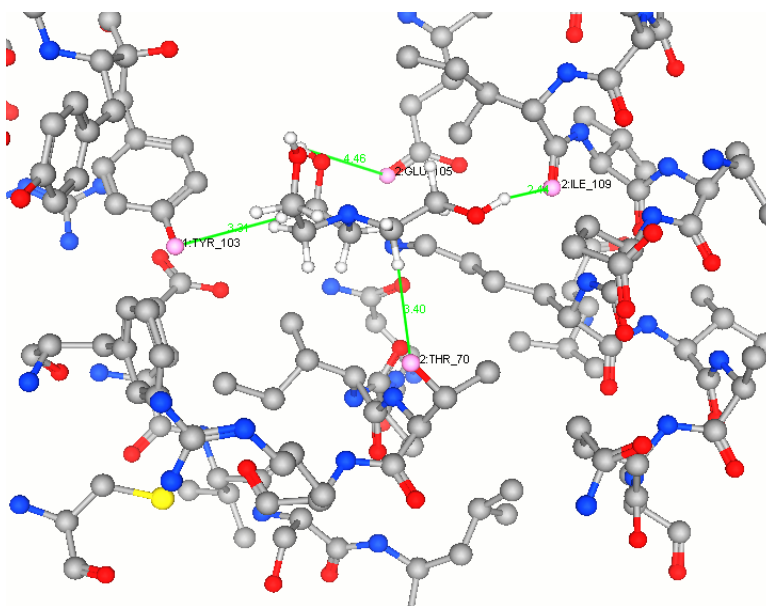


Fig. 66. Acercamiento al sitio de la región interfacial, se muestra uno de los mejores resultados de docking de las moléculas de trietanolamina (TEA). Puede apreciarse un mayor empaquetamiento alrededor de la molécula de TEA, y una mayor densidad de residuos de aminoácidos en contacto. Se encuentran distancia tan cortas como 2.44 Å (con L109_B). La imagen fue generada empleando el programa MOE 2005.06.

Algunos de los residuos enlistados en la tabla 23, corresponden a residuos que se encuentran frecuentemente en las regiones interfaciales de moléculas, y que se saben participan de la estabilización de las proteínas multiméricas.

AI.5.3. Estudios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y Tris-HCl.

En la figura 64 c, se aprecia la localización de todas las soluciones de docking para la molécula de Tris-HCl, la distribución a lo largo de la región interfacial es mucho menor que en el caso de las moléculas de EDTA y TEA, y muy pocas en la superficie restante de la superficie de TcTIM. Muchas de las conformaciones de la molécula de Tris-HCl se alojaron muy al interior de la cavidad de la región interfacial, interactuando con una gran cantidad de residuos. Esta interacción quizás represente un impedimento para la buena complementariedad de muchos de ellos, repercutiendo en el arreglo geométrico necesario para mantener la actividad de la enzima. En la tabla 25 se enlistan los residuos de aminoácidos con los que, predominantemente, se encontraron interactuando las moléculas de Tris-HCl.

Tabla 25. Residuos con los que, en promedio, establecen contacto a menos de 4 Å las distintas soluciones de docking para la molécula de Tris-HCl.

Cadena A	Cadena A	Cadena B	Cadena B	Cadena B	Cadena B
C15	T76	C15	Q66	V93	G104
F46	G77	P44	N67	H96	E105
L47	E78	T45	A68	S97	K113
A65	V79	F46	I69	E98	
Q66	V93	L47	F75	R99	
N67	R99	H48	T76	R100	
A68	Y103	I49	G77	L101	
I69	E105	P50	E78	Y102	
F75	K113	A65	V79	Y103	

La figura 67 permite visualizar el empaquetamiento del sitio alrededor de una de las soluciones de docking para Tris-HCl.

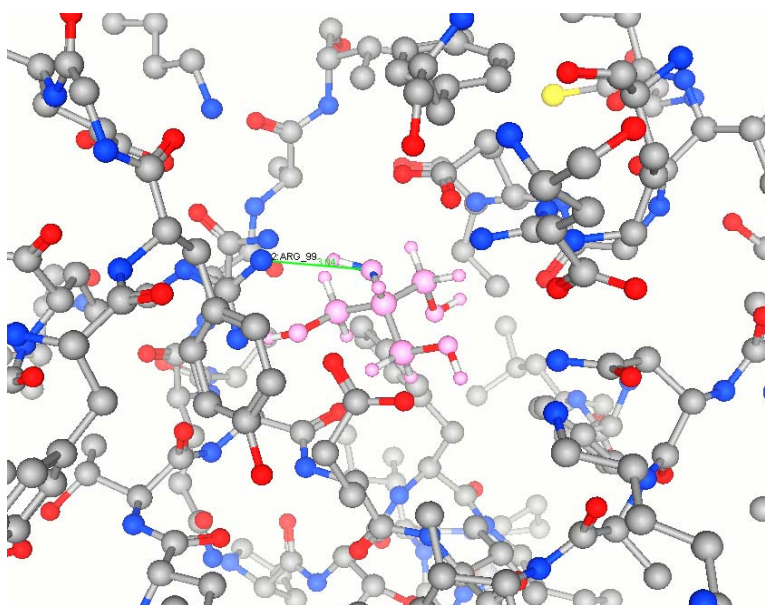


Fig. 67. Acercamiento al sitio de la región interfacial, se muestra una de las soluciones de docking encontradas para las moléculas de Tris-(hidroximetil)-aminoetano (Tris-HCl). Puede apreciarse un mayor empaquetamiento alrededor de la molécula de Tris, y una mayor densidad de residuos de aminoácidos en contacto. El residuo de R99_B, se encontró estableciendo un puente de hidrógeno en la mayoría de las soluciones, a 3.04 Å de distancia en promedio de la molécula de Tris-HCl. La imagen fue generada empleando el programa MOE 2005.06.

Se tiene conocimiento de que, en disolución, para mantener su conformación nativa,

- Los residuos hidrofóbicos de las proteínas se acumulan, generalmente, en el interior de la estructura.

- Que en la superficie diversos grupos adquieren carga eléctrica, en función del pH del medio.
- Que en torno a los grupos cargados, los dipolos del agua se orientan conforme a la carga eléctrica de cada grupo.
- Que la proteína presenta una capa de solvatación formada por el agua de hidratación, que a su vez es el agua retenida por las cargas eléctricas de la superficie de las proteínas.
- Y que los aminoácidos polares sin carga también se disponen en la superficie, donde interaccionaran con el agua mediante puentes de hidrógeno.

de tal manera que cualquier factor que modifique alguna de estas características, tendrá un efecto que se reflejara directamente sobre la capacidad catalítica y sobre la integridad estructural de la biomolécula, debido a la disminución de la estabilidad. Es de esperarse que cambios en el solvente generen, por ejemplo, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno, facilitando la agregación intermolecular, provocando la precipitación.

En los experimentos *in vitro* realizados en esta parte del trabajo de investigación, la formación de agregados y su precipitación fue una constante en las soluciones amortiguadoras que contenían Tris-HCl, y en aquellas en las que la concentración de EDTA disminuyó por debajo de 3 mM.

Los ejercicios de la simulación del reconocimiento molecular entre TcTIM y las moléculas de EDTA, TEA y Tris-HCl, permiten tener una idea de lo que está sucediendo a nivel de la interacción proteína-ligando. La región interfacial es crucial para mantener la integridad estructural y funcional de TcTIM, es en esta zona en donde posiblemente las moléculas presentes en las distintas soluciones amortiguadoras se alojen y ejerzan un papel de grapas moleculares, manteniendo obstruida la entrada de solvente hacia zonas que estabilicen al dímero.

Por otro lado, una molécula tan pequeña como la de Tris, al localizarse hacia zonas más internas de la región interfacial, podría interferir con el establecimiento de la geometría necesaria para mantener un sitio activo, catalíticamente funcional (observándose, experimentalmente, una pérdida de actividad enzimática).

Puede pensarse que, puesto que las fuerzas no covalentes mediante las que los sustratos se unen a las enzimas son de carácter idéntico a las fuerzas que dictan las conformaciones de las proteínas, la influencia que puede tener la constitución del medio circundante afectará en el mismo sentido tanto a la funcionalidad de la macromolécula como a la conformación de la misma.

ANEXO II.

III. Estabilidad térmica de triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*.

Se sabe que cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas. Lo anterior provoca que la envoltura acuosa que rodea a las proteínas se desorganice y se desencadene el rompimiento de contactos terciarios e inicie el proceso de desnaturalización. Un aumento en la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce, en muchos casos, la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada. Antes de que se presenten estos procesos, la estructura se expande permitiéndose el acceso del solvente al interior de la proteína. La relajación de la estructura puede provocar la exposición de los fluoróforos constitutivos de las proteínas, además de alojar otras moléculas en el interior que pueden servir como moléculas reporteras, lo que puede ser monitoreado mediante la realización de estudios de fluorescencia intrínseca y extrínseca.

III.1. Fluorescencia intrínseca.

En nuestro caso, se evaluó el efecto de la temperatura sobre el contenido de estructura terciaria trabajando únicamente en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, es decir, en la solución amortiguadora donde TcTIM presenta mayor estabilidad. Se observó pérdida de estructura terciaria en las tres temperaturas exploradas, 36 °C, 40 °C, y 50 °C, aunque como es de esperarse, este proceso fue mucho más rápido al incrementar la temperatura. Se realizó el cálculo de las constantes de velocidad y pudo determinarse que existe, en todos los casos, pérdida de estructura terciaria. Las constantes de velocidad se muestran a continuación (tabla 26).

Tabla 26. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura terciaria de TcTIM determinadas en regulador de fosfatos 30 mM manteniendo el pH en un valor de 7.4 a distintas temperaturas.

	36 °C	40 °C	50 °C
k_1 (min ⁻¹)	0.008	0.012	0.021
k_2 (min ⁻¹)	-	-	0.003

Los trazos cinéticos se muestran en la figura 68.

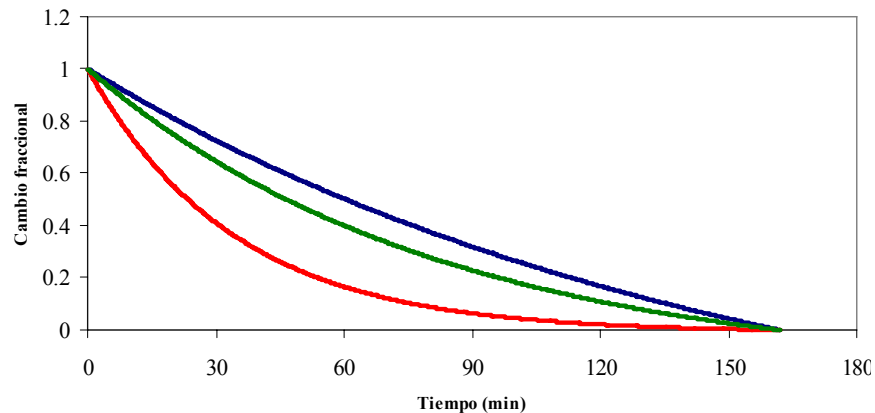


Fig. 68. Comparación de las cinéticas de emisión de fluorescencia de TcTIM obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM a pH 7.4 a distintas temperaturas: 36°C (azul), 40 °C (verde) y 50 °C (rojo). Los trazos cinéticos se muestran normalizados para apreciar mejor el efecto de la temperatura sobre la estructura terciaria.

Se puede apreciar que a 50 °C se tiene una pérdida marcada de estructura terciaria, descrito por un modelo que involucra dos etapas; por el contrario, a 36 y 40 °C el proceso existe aunque, el trazo experimental puede ajustarse a un modelo de una sola etapa. Posiblemente a temperaturas altas, exista un primer proceso que involucra la desestabilización de las interacciones energéticamente más bajas (electrostáticas, van der Waals, hidrofóbicas), provocando un relajamiento de la estructura que da lugar a la exposición de los fluoróforos intrínsecos. La desestabilización de los contactos intramoleculares y los existentes entre el solvente y la macromolécula provocan que ciertas zonas susceptibles de ser desnaturalizadas y con tendencia a agregar se expongan, debido al rompimiento de los contactos no-covalentes por efecto de la temperatura. Este proceso puede estar seguido de una etapa en la que el rompimiento de enlaces covalentes y de tipo puente de hidrógeno, den lugar a la exposición de regiones hidrofóbicas, las cuales al interactuar promuevan la formación de agregados. Cabe mencionar que en todos los experimentos, al final del tiempo de registro se observó agregación.

III.2. Fluorescencia extrínseca.

La relajación de la estructura de TcTIM, causada por el efecto de la temperatura, provoca el acceso a regiones hidrofóbicas que pueden alojar moléculas de solvente. Cuando las moléculas de agua penetran, el efecto hidrofóbico que mantiene plegada a la proteína se minimiza, teniendo como consecuencia la expansión de la estructura. Es posible monitorear esta expansión con ayuda de moléculas que al alojarse en zonas de baja polaridad cambian sus propiedades espectroscópicas, tal es el caso del fluoróforo extrínseco ANS. Podemos apreciar, tanto a 36 °C como a 40 °C, la presencia de un proceso de relajamiento de la estructura de TcTIM de una etapa; se observa además la dependencia del valor de la constante de velocidad con la temperatura. A 50 °C, se observa un proceso de al menos dos etapas siendo la primera la más rápida con una constante de velocidad de 0.016 min^{-1} . La segunda etapa presenta una constante de velocidad de 0.008 min^{-1} , y representa la disminución de la intensidad de fluorescencia del ANS debido al incremento en la polaridad del ambiente en el que se encuentra dicho fluoróforo, es decir, a una pérdida de empaquetamiento debido al desplegamiento de la proteína (fig. 69).

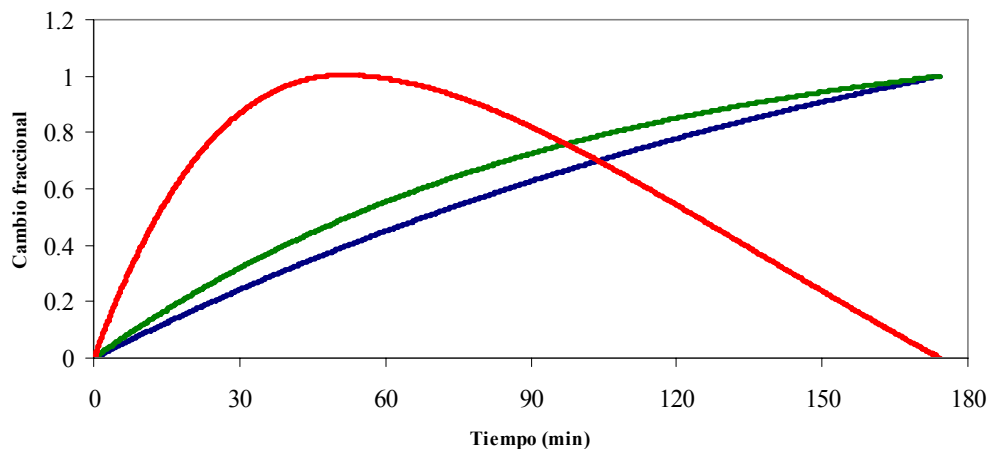


Fig. 69. Comparación de las cinéticas de emisión de fluorescencia extrínseca para TcTIM obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM a pH 7.4 a distintas temperaturas: 36°C (azul), 40 °C (verde) y 50 °C (rojo). Los trazos cinéticos se muestran normalizados para apreciar mejor el efecto sobre el empaquetamiento de la enzima.

En la tabla 27 se muestran los valores de las constantes de velocidad calculadas mediante el ajuste del trazo experimental a un modelo de una y dos exponenciales ($y = C_0 + A*((\exp(-k_1*t))-1) + B*((\exp(-k_2*t))-1)$); donde C_0 es el valor inicial de la señal, A y B son las amplitudes del cambio en la señal, y k_1 y k_2 son las constantes de velocidad en min^{-1}).

Tabla 27. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura terciaria de TcTIM determinadas en regulador de fosfatos 30 mM manteniendo el pH en un valor de 7.4 a distintas temperaturas. Midiendo la emisión del fluoróforo extrínseco ANS excitando a 380 nm y midiendo la emisión a 407 nm.

	36 °C	40 °C	50 °C
k_1 (min^{-1})	0,005	0,010	0,016
k_2 (min^{-1})	-	-	0,008

Quizás a 50 °C, además del relajamiento de la estructura y la exposición de zonas hidrofóbicas, se presente también la desnaturalización de la enzima y finalmente el desplegamiento. La exposición de zonas con tendencia a agregar probablemente genere dichos eventos en el dímero de TcTIM.

III.3. Dicroísmo circular.

Es sabido que las bandas de dicroísmo circular de las proteínas ocurren en dos regiones: en la región amida o región de UV-lejano y en la región del UV-cercano. La primera está dominada por contribuciones de los enlaces peptídicos por lo que las bandas de dicroísmo circular contienen información de la estructura secundaria de las proteínas. En la segunda, se aprecia la presencia de aminoácidos aromáticos, enlaces disulfuro y grupos prostéticos, lo que proporciona información de la estructura terciaria de la proteína. Las dos regiones espectrales muestran información distinta acerca de la estructura de la proteína. Entre otras cosas, la técnica de dicroísmo nos permite estudiar cambios en la conformación de una proteína bajo condiciones de estrés; por ejemplo, si la estabilidad es alterada por la composición del amortiguador o la adición a éste de inhibidores, o por cambios en la temperatura. Generalmente, la región amida es empleada para monitorear cambios en la estructura secundaria en el curso de una transición estructural de la proteína.

En nuestros experimentos, la pérdida de estructura secundaria fue evaluada realizando cinéticas de dicroísmo circular bajo las mismas condiciones que las empleadas con la técnica de espectroscopía de fluorescencia. Se determinó que, simultáneamente al proceso de pérdida de estructura terciaria, existe un proceso de pérdida de estructura secundaria. En la tabla 28 se muestran los valores de las constantes de velocidad calculadas mediante el ajuste del trazo experimental a un modelo de una exponencial ($y = C_0 + A*((\exp(-k*t))-1)$); donde C_0 es el valor inicial de la señal, A es la amplitud del cambio en la señal, y k es la constante de velocidad en min^{-1}).

Tabla 28. Constantes de velocidad del proceso de pérdida de estructura secundaria de TcTIM determinadas en regulador de fosfatos 30 mM manteniendo el pH en un valor de 7.4 a distintas temperaturas.

	36 °C	40 °C	50 °C
k_1 (min^{-1})	0,0025	0,0025	0,10

Se observa un efecto de la temperatura sobre el contenido de estructura secundaria. Puede apreciarse que conforme se incrementa la temperatura, el proceso de pérdida de estructura se agudiza (fig. 70).

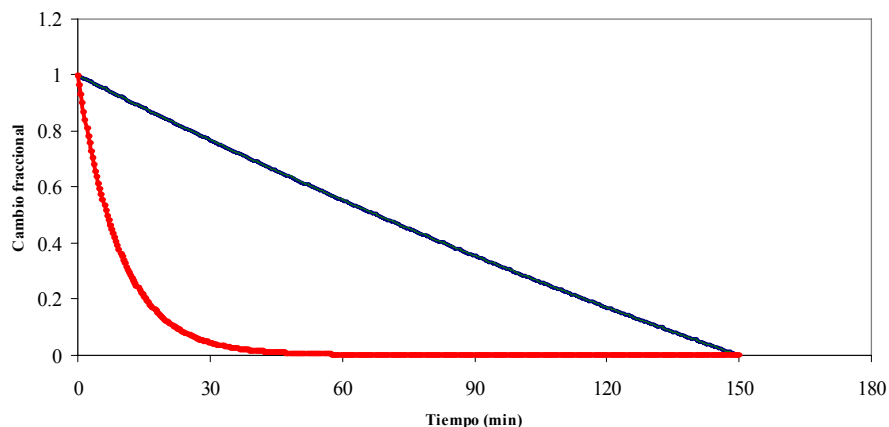


Fig. 70. Comparación de las cinéticas de diroísmo circular para TcTIM obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM a pH 7.4 a distintas temperaturas: 36°C (azul), 40 °C (verde) y 50 °C (rojo). Los trazos cinéticos se muestran normalizados para apreciar mejor el efecto sobre la estructura secundaria de la enzima.

La pérdida es más marcada cuando se trabaja a una temperatura de 50 °C. Aparentemente, la estructura secundaria se conserva relativamente estable cuando se trabaja a 36 y 40 °C. Aunque a 40 °C ya existe una pérdida de estructura terciaria, probablemente los enlaces que estabilizan la estructura secundaria aún permanecen intactos o con perturbaciones mínimas. La pérdida de estructura secundaria se atribuye a un relajamiento de la estructura debido al rompimiento de algunos de los puentes que se encuentran estabilizándola. Una exposición de zonas más profundas de la proteína, que presentan fluctuaciones conformacionales locales, pueden dar lugar a la pérdida completa del empaquetamiento provocando un desplegamiento significativo e inclusive la desnaturalización de la enzima. En nuestro caso, al trabajar a 50 °C, pudimos observar agregación aún a simple vista, lo que habla de un proceso de exposición de zonas hidrofóbicas que al interactuar dan lugar a la formación de agregados.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado en la literatura por diversos grupos de investigación. Por ejemplo, en estudio con ScTIM realizados por Benítez-Cardoza y colaboradores, se observó que el desplegamiento de la TIM consiste inicialmente en una reacción de primer orden, que conlleva a la formación de un estado térmicamente desplegado que contiene estructura secundaria residual pero que carece de la mayoría de las interacciones terciarias presentes en la proteína nativa; éste puede formar un estado irreversiblemente desplegado si permanece expuesto durante periodos prolongados a temperaturas altas (Benítez-Cardoza, C. G., 2001).

III.4. Actividad enzimática.

Es sabido que la actividad de una enzima está en función de la integridad de su conformación, y que ésta dependerá del correcto plegamiento de la macromolécula. Al medir la actividad enzimática de TcTIM a distintas temperaturas pudimos apreciar que por arriba de los 38 °C ésta disminuye dramáticamente (datos no mostrados).

En la figura 71 puede apreciarse la existencia de una dependencia de la actividad de la enzima con la temperatura, aunque únicamente se muestran dos temperaturas, 36 y 40 °C, con la finalidad de compararlas con los datos obtenidos con las técnicas descritas anteriormente.

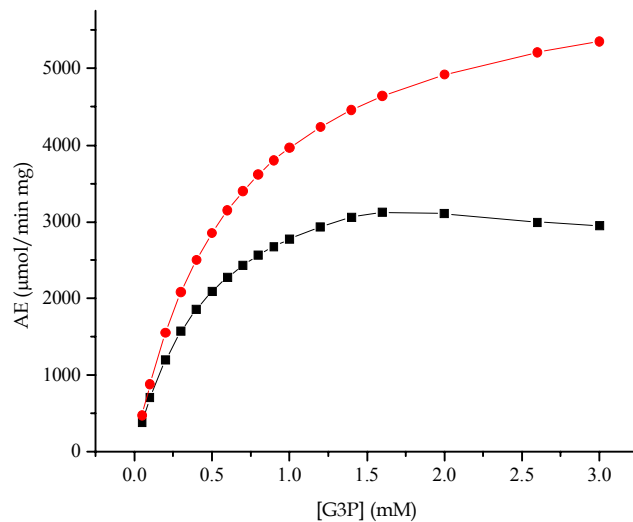


Fig. 71. Comparación de las cinéticas enzimáticas de TcTIM obtenidas en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM a pH 7.4, manteniendo la celda de reacción en 36 °C (-●-) y 40 °C. (-■-).

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se conoce como temperatura óptima. Por encima de ésta, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse. En el caso de TcTIM, la actividad enzimática disminuyó notablemente a partir de los 42 °C (fig. 71); observándose en el espectro de ultravioleta visible, una absorción significativa a 320 nm (datos no mostrados), atribuible a la exposición e interacción de zonas hidrofóbicas que formaron agregados.

Puesto que el cambio en la temperatura puede originar la pérdida de la estructura nativa o desnaturalización, la cual implica la desactivación de la proteína (acompañada inclusive de disociación), a partir de los datos de actividad enzimática, dicroísmo circular y de fluorescencia intrínseca y extrínseca, se decidió trabajar a 36 °C, ya que, aunque existe un proceso de pérdida de estructura secundaria y terciaria, ésta se acompaña de una pérdida ligera de actividad enzimática.

ANEXO III.

AIII. Caracterización del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propanolsulfónico (C8)

AIII.1. Absorción de C8 en el ultravioleta y visible.

Dado que se pretendía determinar el mecanismo molecular de inhibición de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM) por la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (C8), se hizo necesario determinar sus características espectroscópicas, en particular sus máximos de absorción -por tanto de excitación- y de emisión, con el objetivo de utilizar estos datos en el planteamiento de experimentos de actividad enzimática, dicroísmo circular y fluorescencia.

Primeramente, se obtuvieron espectros de absorción en la región de ultravioleta y visible para determinar el máximo de absorción del compuesto, se obtuvieron espectros a concentraciones de 250, 125, 62.5, 50 y 25 μM , obteniéndose máximos de absorción entre los 280 y 320 nm para todas las concentraciones (Fig. 72).

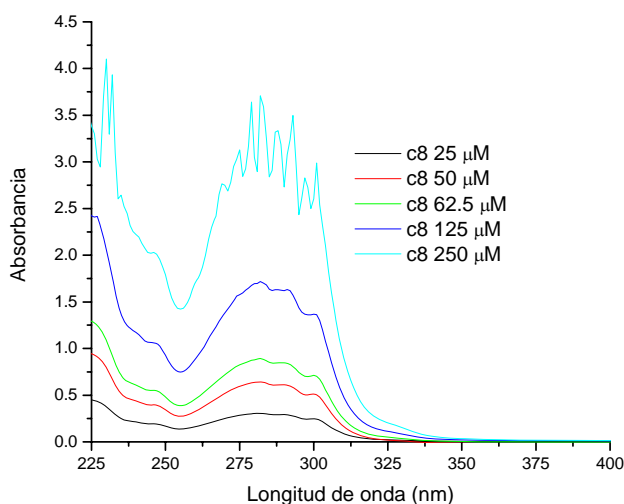


Fig. 72. Espectros de absorción ultravioleta de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8) realizados en una solución amortiguadora de fosfatos 30 mM (pH 7.4) a 25 °C. Se ensayaron concentraciones de 250, 125, 62.5, 50 y 25 μM . Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución stock 0.075 M el día de la medición.

AIII.2. Fluorescencia intrínseca.

Una vez que se contó con los datos de máximos de absorción se obtuvieron espectros de fluorescencia del compuesto a concentraciones de 250, 125, 62.5, 50 y 25 μM , excitando en un intervalo entre 350 y 370 nm, y registrando la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm. Lo anterior con la finalidad de alejarnos de las zonas de absorción de la proteína y visualizar únicamente el comportamiento de C8. Del conjunto de los espectros de fluorescencia se pudo determinar que la longitud de onda óptima de excitación era de 357 nm (se encontró el mejor compromiso entre absorción y excitación, ya que a longitudes de onda menores la fluorescencia disminuía apreciablemente y a longitudes de onda mayores se presentaba efecto de filtro interno, datos mostrados más adelante) y que el máximo de emisión correspondía a 407.2 nm (\approx 407 nm).

Con esta información, se procedió a realizar el mismo tipo de espectros para un intervalo de concentración más amplio (entre 10 y 400 μM), empleándose las condiciones citadas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 73.

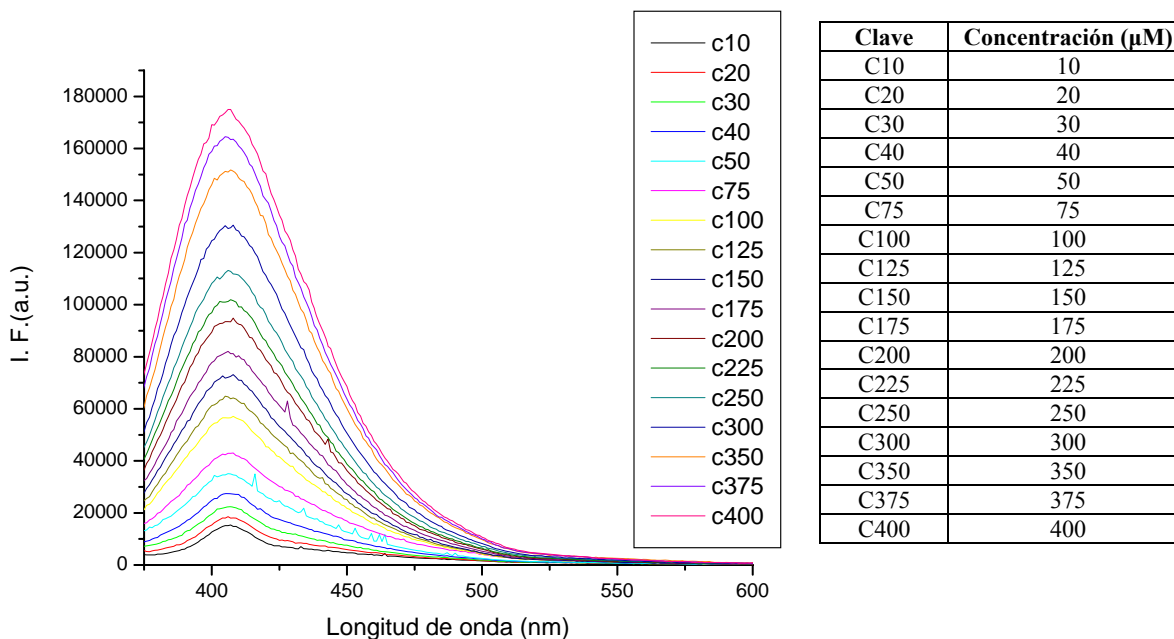


Fig. 73. Espectros de emisión de fluorescencia de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazolil)propano sulfónico (compuesto 8) realizados en solución amortiguadora de fosfatos 30 mM (pH 7.4) a 25 °C, excitando a una longitud de onda de 357 nm y registrando la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm. Se trabajó en un intervalo de concentración entre 10 y los 400 μM .

Se realizó además el cálculo del centro de masa espectral (CME) de cada espectro de fluorescencia, considerando un intervalo de longitudes de onda entre los 350 y 525 nm, sin observarse cambio en el valor registrado (416.08 en promedio). Puede apreciarse que se conserva la forma del espectro y que existe una aparente dependencia lineal entre la concentración y la intensidad de fluorescencia.

Para determinar que no se estuviera trabajando en regiones en las que no se observara esta correspondencia, se realizaron cinéticas de fluorescencia en el mismo intervalo de concentración, excitando a 357 nm y midiendo la emisión a 407 nm, con un tiempo de registro de treinta minutos; con la finalidad de construir una curva de intensidad de fluorescencia (IF) contra concentración del compuesto 8, a partir de los datos promediados de tres registros de dichas cinéticas. Los resultados se muestran a continuación (fig. 74).

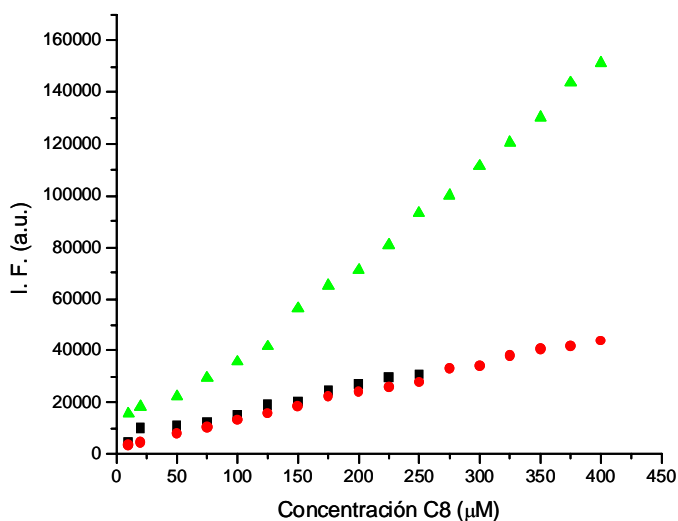


Fig. 74. Curva de concentración de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltilio)-1-propano sulfónico contra intensidad de fluorescencia. En el intervalo de concentración entre 10 y 400 μM (●) no se observó efecto notable de filtro interno. Una segunda serie de experimentos se realizaron para corroborar las observaciones y determinar si se estaba fuera de la región de filtro interno e inclusive de autoapagamiento, esto permitió observar la existencia de un comportamiento lineal entre concentración de fluoróforo e intensidad de fluorescencia (▲). La curva en verde muestra intensidades más altas debido al cambio de lámpara en el equipo. En un estudio preliminar (■), a más bajas concentraciones, se observó un comportamiento similar.

En el intervalo de 10 a 400 μM no se observa efecto de filtro interno, es decir no existe una disminución de la intensidad de fluorescencia a concentraciones relativamente altas del fluoróforo (C8) por impedimento de la llegada del haz de luz a las moléculas que están localizadas en la dirección del detector de emisión. Por otra parte, tampoco se observa que la curva comience a doblarse hacia abajo a concentraciones altas debido a la autoabsorción, es decir que la radiación emitida sea reabsorbida por otras moléculas de la muestra antes que emerja de la disolución. Es importante mencionar que el aumento en intensidad de fluorescencia no es proporcional a la variación de la concentración.

Se exploró también el efecto del almacenamiento en la fluorescencia del compuesto 8, realizándose espectros de emisión de fluorescencia en los que la longitud de onda de excitación fue de 357 nm y la longitud de onda de emisión se registro entre los 370-600 nm. La concentración utilizada fue de 250 μM , observándose el siguiente comportamiento (fig. 75).

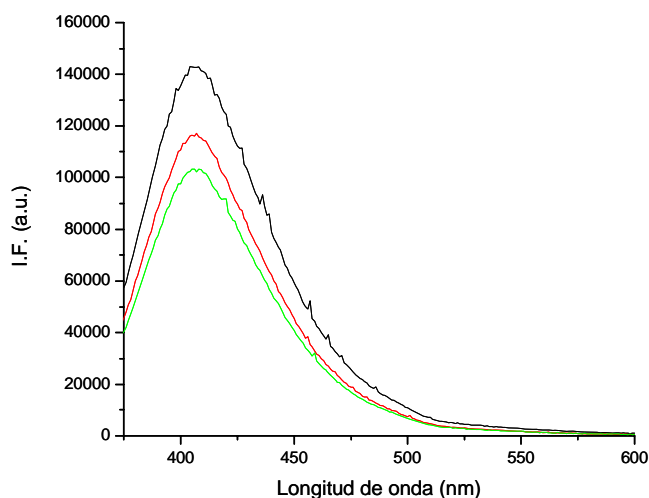


Fig. 75. Espectros de emisión de fluorescencia de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltilio)-1-propano sulfónico (compuesto 8) realizados en TRIS-HCl 10 mM (pH 7.4) a 25 °C, excitando a una longitud de onda de 357 nm y registrando la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm. Las soluciones fueron preparadas el día del experimento a partir de una solución stock (0.075 M) almacenada por 0 (trazo negro), 15 (trazo rojo) y 30 días (trazo verde). En el caso de la solución en "fresco", ésta se preparó el mismo día que se realizó el experimento.

De los espectros de fluorescencia se aprecia que conforme aumentó el tiempo de almacenamiento del compuesto, la intensidad de fluorescencia disminuyó. Esto puede deberse a alguna

modificación en la estructura del compuesto derivada de su inestabilidad al permanecer en disolución. Para descartar que esta disminución se atribuyera a efectos de la radiación sobre el compuesto, se realizaron espectros con radiaciones sucesivas, obteniéndose el siguiente patrón (fig. 76).

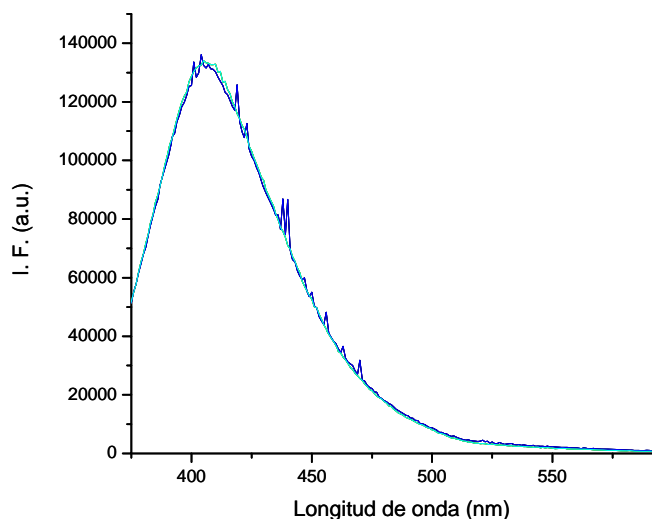


Fig. 76. Espectros de emisión de fluorescencia de la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazolilto)-1-propano sulfónico (compuesto 8) realizados en TRIS-HCl 10 mM (pH 7.4) a 25 °C, excitando a una longitud de onda de 357 nm y registrando la emisión en un intervalo entre los 370 y 600 nm. Se realizaron cinco radiaciones sucesivas, a intervalos de dos minutos, registrándose en todos los casos los espectros de emisión. Se observa la conservación de la forma del espectro y del máximo de emisión.

De los resultados anteriores, se puede concluir que la disminución en la intensidad de fluorescencia que exhibe el compuesto 8, es resultado de modificaciones químicas debidas al periodo de tiempo en que se encuentra en disolución y no del efecto que sobre él tiene la radiación del haz incidente. A partir de estos resultados decidimos utilizar el compuesto 8 disuelto el día de los experimentos en todos los estudios sucesivos.

AIII.3. Calorimetría diferencial de barrido.

Para evaluar la pureza de la sal de sodio del compuesto 8 utilizada en estos estudios, se realizó una prueba de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La curva térmica registrada por DSC para la sal de sodio de C8 se observa en la figura 77. Como resultado de este análisis, realizado a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, se registró cada una de las reacciones endotérmicas del compuesto, incluyendo la de fusión.

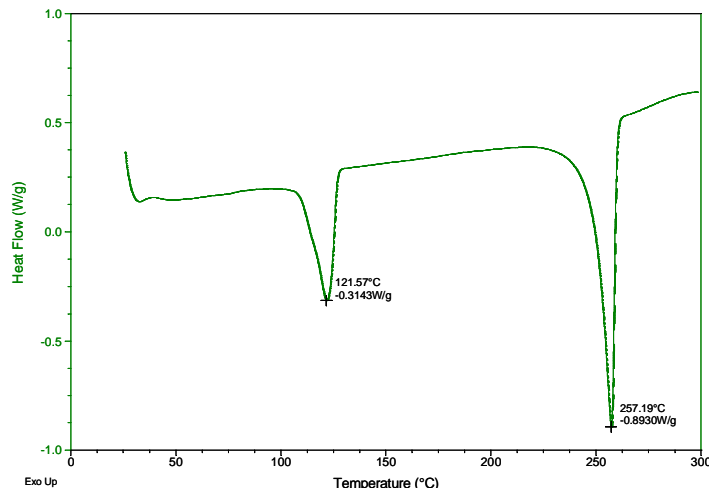


Fig 77. Termograma para la sal de sodio del ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propano sulfónico (compuesto 8) obtenido mediante un estudio de DSC (calorimetría diferencial de barrido) realizado en un DSC 2920 de TA Instruments. El peso de la muestra fue de 2.80 mg. La temperatura inicial fue de 25 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura final de 300 °C.

Teniendo en cuenta el valor del rango de fusión reportado en la literatura para el compuesto puro (259-264 °C), se observa que además del pico de fusión, aparece una segunda endoterma, a 121.57 °C, que puede ser atribuida a alguna impureza. Cabe destacarse que cuando se realizaron experimentos con TcTIM, en los que se utilizaron las soluciones empleadas anteriormente, la enzima no distinguió entre soluciones de compuesto 8 recién preparadas y las almacenadas hasta por un mes, así como entre soluciones con varias radiaciones recibidas.

AIII.4. Definición de condiciones experimentales.

Puesto que observamos *in vitro* que el cambio en las propiedades del solvente puede originar la pérdida de la estructura nativa, a partir de los datos de actividad enzimática, dicroísmo circular y de fluorescencia intrínseca y extrínseca, se decidió trabajar con una solución amortiguadora de fosfatos en una concentración de 30 mM. En esta solución amortiguadora TcTIM lleva a cabo la reacción catalítica en la que se encuentra involucrada de manera eficiente, no hay pérdida considerable de estructura secundaria y terciaria, y en el caso de dicroísmo circular, es una solución transparente en la región de interés. Se decidió trabajar manteniendo el valor de pH en 7.4 y la temperatura en 36 °C.

La concentración de proteína utilizada, en los experimentos de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca y extrínseca, fue de 10 µg/mL. En el caso de las mediciones de actividad, la concentración final en la celda de reacción fue de 5 ng/mL. Cabe mencionar que todas las alícuotas se tomaron de soluciones de proteína recién dializada, ésta se mantuvo todo el tiempo a 4 °C, hasta el inicio del experimento.

La concentración de C8 empleada en los estudios de inhibición fue de 100 µM. Las alícuotas se tomaron de una solución de C8 concentrada (solución stock) que se preparó el mismo día de las mediciones.

Glosario

Activadores. Cualquier sustancia que permita por una parte atraer al sustrato a su centro activo, o que permita la rápida salida de los productos.

Agonistas. (farmacología). 1. Fármacos que se unen a los receptores y hacen que estos realicen sus funciones biológicas normales, produciendo una respuesta bioquímica. 2. Sustancia que se une a los receptores biológicos, que normalmente responden a las sustancias fisiológicas, y origina la respuesta que les es propia.

Antagonistas. (farmacología). 1. Sustancia que disminuye o invierte el efecto inducido por un agonista. 2. Sustancia que se une y bloquea los receptores celulares que normalmente se enlazan a sustancias naturales en su acción fisiológica. 3. Fármacos que se oponen, bloquean o neutralizan la respuesta biológica mediada por un receptor.

Coefficientes de distancia. Son medidas de distancia o disimilaridad entre objetos y tienen un valor de cero cuando estos objetos son idénticos. Los coeficientes de distancia son análogos a la distancia en espacios geométricos multidimensionales, aunque no son necesariamente equivalentes a la distancia física. Un coeficiente de distancia tiene las siguientes propiedades:

- I) Los valores de distancia deben ser cero o positivos, y el valor de distancia del objeto con si mismo debe ser cero:

$$D_{A,B} \geq 0, D_{A,A} = D_{B,B} = 0$$

- II) Los valores de distancia deben ser simétricos:

$$D_{A,B} = D_{B,A}$$

- III) Los valores de distancia deben obedecer la desigualdad triangular:

$$D_{A,B} \leq D_{A,C} + D_{C,B}$$

- IV) La distancia entre objetos no idénticos debe ser mayor que cero:

$$A \neq B \Leftrightarrow D_{A,B} > 0$$

El intervalo entre cero y la unidad proporciona una medida simple para convertir un coeficiente de similaridad en un coeficiente de distancia complementario. En muchos casos un coeficiente de similaridad y su complementario han sido desarrollados de manera independiente y son conocidos con nombres diferentes; por ejemplo, el coeficiente de distancia de Soergel está ligado al coeficiente de similitud de Tanimoto (Willett, P., 1998).

Coefficiente de partición octanol-agua. (Pow, Kow). Medida de la lipofilia, mediante la determinación del equilibrio de la distribución entre el octanol-1-ol (n-octanol) y el agua, que se utiliza en farmacología y en la estimación del destino y transporte de sustancias químicas en el medio fisiológico. Se utiliza para estimar diferentes comportamientos de una molécula como la bioacumulación, la absorción y penetración a través de membranas, entre otros.

Coefficientes de similaridad. Son funciones que transforman pares de representaciones moleculares a números reales, usualmente en un intervalo entre cero y la unidad. Éstos proveen una medida cuantitativa del grado de relación estructural entre un par de representaciones estructurales o, en otro contexto, del grado de similitud química. Los coeficientes de similitud pueden ser clasificados por correlación, probabilísticos, asociativos y correlacionados con coeficientes de distancia (Maldonado, A., 2006).

Coefficiente de Tanimoto. Coeficiente que ha sido ampliamente utilizado como medida de similitud química o estructural entre dos moléculas. Éste está descrito por la siguiente ecuación:

$$S_T = \frac{a}{a + b - c}$$

Donde a representa las propiedades de la primera molécula y b las de la segunda; c es el número de propiedades en común.

Coefficiente de Tversky. Coeficiente para evaluar la similaridad, considerado un coeficiente asimétrico ($S_{A,B} \neq S_{B,A}$). La forma general está descrita por:

$$S_{A,B} = \frac{c}{\alpha(a - c) + \beta(b - c) + c}$$

Donde α y β son constantes definidas por el usuario y a , b y c , están definidas en el coeficiente de Tanimoto. Si α y β son iguales, el resultado es un coeficiente de similaridad simétrico. En el caso de ciertos valores la expresión se reduce a uno de los coeficientes comúnmente conocidos. Cuando:

$\alpha = \beta = 1$, tenemos el coeficiente de Tanimoto

$\alpha = \beta = \frac{1}{2}$, tenemos el coeficiente de Dice

si α y β son diferentes el coeficiente es asimétrico, de tal modo que si $\alpha = 1$ y $\beta = 0$ tenemos que:

$$S_{A,B} = \frac{c}{a}$$

Pudiéndose interpretar como la fracción de A que es común a B (Willett, P., 1998).

Concentración efectiva media (I_{50}). Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos o moléculas de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas.

Confórmeros. Son estereoisómeros que se caracterizan por poder modificar su orientación espacial, convirtiéndose en otro isómero de la misma molécula, a temperatura ambiente; por rotación en torno a enlaces simples anti, eclipsada o alternada. Son compuestos que, generalmente, no pueden aislarse físicamente, debido a su facilidad de interconversión.

Descriptorios moleculares. Son empleados para caracterizar las moléculas que serán comparadas. Pueden ser determinados de la estructura (constitución, configuración y

conformación) o de las propiedades (físicas, químicas o biológicas) de la molécula. Los descriptores constitucionales incluyen información concerniente al arreglo de los átomos y los enlaces, presencia o ausencia de fragmentos y otras características 2D.

Los descriptores de configuración caracterizan el arreglo 3D de los átomos. Finalmente, los descriptores conformacionales representan el arreglo espacial más estable termodinámicamente. Los descriptores pueden ser obtenidos de definiciones específicas, de las combinaciones de otros descriptores o de valores numéricos de propiedades fisicoquímicas.

Diálisis. Proceso mediante el cual se añaden o se eliminan solutos de bajo peso molecular de una disolución mediante la difusión a través de una membrana semipermeable.

Droga. 1. Cualquier sustancia que cuando es absorbida por organismos puede modificarles una o más de sus funciones (sin. **fármaco**). 2. Término usado para designar medicamentos (América) y sustancias de uso abusivo (drogas de abuso).

Ecuación de Michaelis-Menten. Ecuación que proporciona la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente en función de las concentraciones de sustrato y enzima, así como de dos constantes que son específicas para una determinada combinación de enzima y sustrato: una constante de velocidad, k_{cat} , para la producción catalítica del producto cuando la enzima está saturada (definida como $V_{máx}/[E]_{total}$), y la constante de Michaelis (K_m).

Eficacia. (farmacología). Aptitud de un medicamento, determinada por métodos científicos, para producir los efectos propuestos. La eficacia del medicamento se determina generalmente a partir de la fase II de los estudios clínicos, mediante la comparación de los tratamientos que emplean el medicamento-problema versus un grupo control (que no recibe tratamiento o recibe un placebo).

Enlace de hidrógeno. Interacción de atracción entre el átomo de hidrógeno de un grupo donador, como -OH o =NH, y un par de electrones no enlazantes de un grupo aceptor, como O=C. El átomo del grupo donador, que incluye el hidrógeno, debe ser claramente electronegativo para que la atracción sea importante.

Enlace peptídico. Enlace que liga sucesivos aminoácidos para formar un péptido. Consiste en un enlace amida entre el grupo alfa-carboxilo de un aminoácido y el grupo alfa-amino del siguiente.

Entropía conformacional del plegado. Disminución de la aleatoriedad, durante el paso desde una multitud de conformaciones de ovillo aleatorio hasta una única estructura plegada. La energía libre, representada en la ecuación $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$, demuestra que el ΔS negativo realiza una contribución positiva a ΔG . Es decir, el cambio de entropía conformacional se opone al plegado. Por ello, el ΔG global, que debe ser negativo, se debe a que o bien ΔH es negativo y grande o a algún otro aumento de la entropía con el plegado. En la práctica se dan ambas cosas. La fuente de ΔH negativo es el cúmulo de interacciones favorables energéticamente que se dan en el interior del glóbulo proteico, interacciones que suelen ser no covalentes.

Enzimas glicolíticas. La secuencia metabólica en la que se oxida la glucosa (glucólisis), consiste de nueve reacciones enzimáticas que producen dos moléculas de piruvato y dos equivalentes reducidos de NADH, los que, al introducirse en la cadena respiratoria, producirán cuatro moléculas de ATP. Las enzimas que catalizan tales reacciones se denominan enzimas glicolíticas y son 10: Hexoquinasa, Fosfoglucoasa isomerasa, Fosfofructo quinasa, Aldolasa, Triosafofato isomerasa, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Fosfoglicerato quinasa, Fosfoglicerato mutasa, Enolasa y Piruvato quinasa.

Epítoto. Parte de una molécula que actúa como determinante antigénico; una macromolécula puede contener diferentes epítotoes, cada uno de ellos capaz de estimular la producción de un anticuerpo específico.

Esquema de pesado. Son criterios que son empleados para asignar diferentes grados de importancia a los componentes de las representaciones. Los criterios adoptados son exclusivamente químicos y pueden incluir valores para forma y tamaño, polaridad y carga, lipofilicidad, polarizabilidad o flexibilidad inherente a la molécula individual (Maldonado, A., 2006).

Estereoisómero. Es un isómero de una molécula que tiene las mismas conexiones átomo a átomo que dicha molécula, pero difiere en la orientación espacial de los mismos. Los estereoisómeros se pueden clasificar en:

- Isómeros conformacionales, o rotámeros, interconvertibles entre sí por la rotación en torno a enlaces.
- Isómeros configuracionales, interconvertibles entre sí mediante ruptura de enlaces.

Evaluación energética. Estimación de la energía de unión del complejo ligando-receptor en cada posición. La interacción entre dos moléculas está dada por una suma de fuerzas intermoleculares de carácter no enlazante. La energía de interacción resultante de todas las interacciones puede estimarse de diferentes maneras.

Fármaco. 1. Sustancia dotada de un efecto bioactivo determinado o que, sin poseer actividad, al ser administrado al organismo la adquieren luego que sufren cambios en su estructura química, como es el caso de los pro-fármacos. Este término se debe emplear exclusivamente para denotar al principio activo y no el producto farmacéutico (medicamento). 2. Cualquier producto que puede ser absorbido por un organismo, difundirse en él y producirle cambios, favorables o no.

Farmacóforo. Conjunto de características estéricas y electrostáticas que precisan el modo específico de la asociación de un ligando en un sitio de unión en una macromolécula, y que son necesarias para asegurar una óptima interacción .

Fuerzas intermoleculares de carácter no enlazante. Aquellas que no implican una interacción de tipo covalente.

Tipo de interacción	Geometría óptima	Ejemplo
Electrostática o iónica	Distancia: 2.8 Å	$=\text{NH}_2^+ \cdots \text{OOC}^-$
Puente de hidrógeno	Distancia: 2.7-3.1 Å Angulo: 120-180°	$\text{R}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{O}^{\text{R}}$
Van der Waals	Distancia: 3-4 Å	$\text{CH}_3 \cdots \text{H}_3\text{C}$
Cambios entrópicos		Interacción hidrofóbica

		Energía conformacional
--	--	------------------------

Glucólisis. Ruta inicial del catabolismo de los hidratos de carbono, en la que una molécula de glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato, con la producción neta de moléculas de ATP y la reducción de dos moléculas de NAD^+ a NADH. En condiciones aerobias, estas moléculas de NADH se reoxidan por la cadena de transporte electrónico; en condiciones anaerobias, se utiliza un aceptor de electrones diferente.

Grupo prostético. Un ión metálico o una molécula pequeña (distinta de un aminoácido) que forma parte de una proteína en el estado nativo y que es esencial para el funcionamiento proteico; su unión a la proteína puede ser covalente o no covalente.

Hidrófilo (hidrofilico). Hace referencia a la capacidad de un átomo o una molécula de presentar interacciones de atracción con las moléculas de agua. Las sustancias que son iónicas o pueden participar en enlaces de hidrógeno son hidrófilas. Las sustancias hidrófilas son solubles en el agua.

Hidrófobo (hidrofóbico). La propiedad molecular de no presentar interacciones de atracción con las moléculas de agua. Las sustancias hidrófobas son no iónicas y no polares; no se disuelven con facilidad en el agua.

Inhibidor. Sustancia que disminuye la velocidad de una reacción enzimática.

Inhibidor competitivo. Moléculas estructuralmente semejantes al sustrato (e incluso algunos que no lo son), que son capaces de unirse al sitio activo de la enzima formando el complejo enzima-inhibidor, éste no tiene la capacidad de transformar el sustrato en producto. En este tipo de inhibición se produce una competencia entre el sustrato y el inhibidor por la unión al sitio activo. Cinéticamente, se caracteriza porque aumenta la K_M y se mantiene constante la $V_{m\acute{a}x}$.

Inhibidor no competitivo. Molécula que se une a un sitio diferente al sitio activo, por lo que es posible la formación de los complejos inhibidor-enzima e inhibidor-enzima-sustrato. La velocidad de formación de producto a partir del complejo inhibidor-enzima-sustrato es menor que la velocidad en ausencia del inhibidor, reduciendo la eficiencia catalítica de la enzima. Es por esto que el análisis cinético revela que en una inhibición del tipo no competitiva varían tanto $V_{m\acute{a}x}$, aunque K_m permanece constante.

Interacciones carga-carga. Interacciones que se presentan entre grupos polares y cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos, dichos grupos ionizados se atraen y forman un equivalente a sales entre residuos de la cadena polipeptídica, denominándose a veces *puentes salinos*. Estas interacciones desaparecen cuando el pH del medio es tal que se pierde el estado de ionización del grupo.

Interacciones no covalentes. Las interacciones no covalentes son aquellas que se establecen sin que necesariamente se compartan electrones entre los átomos enlazados. Éstas formalmente no se consideran enlaces químicos. Dentro de las interacciones no covalentes podemos encontrar a las interacciones electrostáticas, de dipolo permanente e inducido, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals.

Interacciones de fuerzas de Van der Waals. Son fuerzas de estabilización molecular; forman un enlace químico no covalente en el que participan dos tipos de fuerzas o interacciones, las

fuerzas de **dispersión** (que son fuerzas de atracción) y las fuerzas de **repulsión** entre las capas electrónicas de 2 átomos contiguos. El denso empaquetamiento en el núcleo de las proteínas globulares facilita la interacción débil entre grupos moleculares sin carga. Dichos enlaces son de baja energía, pero su abundante número suple su debilidad. Cada interacción individual sólo contribuye en unos pocos kilojulios a la entalpía de interacción negativa global, pero la suma de todas las contribuciones de todas las interacciones sí que puede estabilizar a la estructura plegada.

Ligando. Molécula que se fija de manera específica y estereoquímicamente complementaria a una proteína.

Medicamento. Es aquel preparado farmacéutico obtenido a partir de uno o más principios activos, que puede o no contener excipientes. Es presentado bajo una forma farmacéutica definida, dosificado y empleado con fines terapéuticos.

Puente de hidrógeno (enlace por puente de hidrógeno). Interacción que se establece cuando un átomo de hidrógeno se encuentra entre dos átomos más electronegativos, estableciendo un vínculo entre ellos. El átomo de hidrógeno tiene una carga parcial positiva, por lo que atrae a la densidad electrónica de un átomo cercano en el espacio. Las cadenas laterales de muchos aminoácidos se comportan como donadores o como aceptores de enlaces de hidrógeno (es el caso de los grupos hidroxilo de la serina y los grupos amino de la glutamina, por ejemplo). Además, si los protones amida o los carbonilos del armazón polipeptídico no están implicados en el enlace peptídico, pueden interaccionar también en este tipo de uniones estabilizadoras. Si bien los enlaces de hidrógeno son débiles en disolución acuosa, su gran número puede estabilizar enormemente la estructura proteica.

Quiral. Respecto a una molécula u otro objeto, la propiedad de no ser superponible a su imagen especular. Un átomo que hace a una molécula quiral, como un carbono con cuatro sustituyentes diferentes, se denomina átomo quiral o centro de quiralidad.

Receptores (diana, molécula blanco). 1. Proteínas presentes en la superficie celular que unen un fármaco específico induciéndose un determinado efecto fisiológico. 2. Sitio de unión (ligando) de gran afinidad por un determinado tóxico, de cuya unión se derivará un efecto.

Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, de las siglas en inglés de Quantitative Structure-Activity Relationships). Modelo matemático que relaciona las propiedades fisico-químicas de una sustancia y/o las de sus subestructuras moleculares y las actividades biológicas, incluida la toxicidad.

SMILES. De las siglas en inglés de Simplified Molecular Input Line Entry System. Es una manera de representar la estructura química usando cadenas de caracteres alfanuméricos de tipo ASCII. A partir de la descripción en formato **SMILES** de las **moléculas** obtenemos una estructura de datos en forma de grafo.

DEDICATORIAS

ESTA TESIS ES DE MI MADRE,

QUE ES EL ANGEL MÁS SABIO QUE LA VIDA PUDO DARME.

TE AMO MAMITA, CON CADA UNA DE MIS PROTEÍNAS!!!

Y PARA MI HERMANA JACQUE,

QUIEN ES LA PERSONA MÁS MARAVILLOSA DEL UNIVERSO.

SIMPLEMENTE ESTO NO HUBIERA SIDO POSIBLE SIN TI!!!

PARA MIS 7 ENANOS: EDGAR, KARLA, LAURA, ANDRES, ANA, DANIEL Y PAOLA.

PARA MIS HERMANOS: CARLOS, JAVIER Y OSCAR

PARA MIS CUÑADAS: LOURDES, REYNA Y WENDY

A DIEGO PRADA GRACIA,

POR LA ILUSIÓN DE TODOS LOS DÍAS...

AGRADECIMIENTOS

...son tantas personas a las que quisiera agradecer que es seguro que esta sección quedará incompleta.

Mis disculpas más sinceras si es que esto sucede.

A mi gran maestro y amigo, Javier Velázquez Moctezuma.

Gracias por confiar en mí, por enseñarme a jugar con la vida, sin miedos...
Por los consejos, por las charlas, por la maravillosa compañía (aún en la distancia).
Por ser el mejor de los amigos. Por dejarme escucharlo...
Gracias Doc, por hacerme entender que si mi trabajo no me divierte, es porque algo estoy haciendo mal...

...Esto se lo debo a usted!

A mi querido Carlos Kerbel Lifshits.

Me enseñaste tantas cosas, me infundiste tanto valor y me diste tanto cariño, que no tengo idea de cómo te lo pagaré. Gracias Kerbel, por haber sido algo más que un simple profesor, por mostrarme a la Ciencia en su justa dimensión. Gracias por incluirme en tu familia, por compartir las tardes con Tamara y con Susana (te quiero Su, mucho mucho!!). Gracias por darme la sombra de un gran roble.

A Gerardo Escobar Chanona.

Gracias coleguita!!
Que hubieran sido estos años sin tu compañía??
Sabes que las palabras no me alcanzan para agradecer que hayas crecido conmigo.
Que me hayas dejado crecer contigo...

A Yaned Z. Vite Hernández.

Gracias amiga, por todo.
Por todos estos años. Por acabarnos al mundo y arreglarlo en un café.
Por preocuparte por conocerme. Por dejarme conocerte.
Gracias por el respeto y por las constantes muestras de cariño. Sabes que es mutuo.

*A Juan Manuel Cedeño y Mercedes Martínez.

Gracias por el cariño, por los pensamientos.
No saben lo afortunada que me siento de tenerlos como amigos.
Espero un día poder regresarles un poquito de lo mucho que me han dado.

Gracias Juanito, por levantarme tantas veces. Gracias Mercedes, por ser tan transparente. Los quiero par de dos!! CASÍ TRES!!!! (ojala que sea niña, y que se parezca a la tia!!)

*A Ana y Jesús (Chua).

Por las comidas, las tardes, las risas, el apoyo.

*A Eduardo Rios.

Gracias Lalo! esas charlas tan entropiosas, llenas del realismo mágico que cocinas en el horno de tu cabecita, me hacen SIMPLEMENTE FELIZ!! Ojala que nunca te vayas, aunque contigo no se sabe, jejeje... eres bien importante para mi salud mental.

*A Juan Antonio Sarmiento Muro.

Gracias Juanito!! Lo logramos, jejeje... nunca tendre como pagarte que me hayas dado tantas sonrisas, tantos consejos, tanto cariño sincero. Y esos bailongos que nos hacian UNICOS!! Ay que cosa y cuantos desfiguros!! TE QUIERO MUCHOOOOOOOOO!!

*Al Doctor Isaac Kornhauser, por todo lo bueno que fue conmigo. Por sus sonrisas y sus bromas verdes, que hacian de mis visitas al laboratorio de fisicoquímica de superficies, verdaderas aventuras.

*A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal,

Mónica Ponce	Fulgencio Espejel	Fernando Rivera
Fernando Díaz de León	Alejandro Granados	Ana Casa Iñiguez
Antonio y Glu	Olivia	Blanca Farfan-Labonne

que ya son todos unos Doctores y con quien compartí momentos realmente enriquecedores. Gracias por haberme iniciado en esto. En especial a mi Jefa Laura Pérez Flores, eres enorme!!

*A mis compañeros del Laboratorio de Psicobiología Neuroendocrina

Dra. Anabel Jiménez	Dra. Julieta Mendoza	Dr. Carlos Torner
---------------------	----------------------	-------------------

por dejarme aprender de ustedes... gracias Dra. Anabel, por haber sido tan buena conmigo y por seguir regalándome de sus consejos.

*A mis compañeros del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "M. V. S." del Área de Investigaciones Cerebrales.

Dr. Mario Alonso Vanegas	M. en C. Carlos Castillo	M. en C. Manuel Ruiz-Briones
--------------------------	--------------------------	------------------------------

Gracias por los desvelos, por los buenos momentos a la hora de la colación. Gracias por tantas burradas que hacían de las madrugadas en los pasillos del hospital una verdadera maravilla!!

Dr. Mario Alonso, muchas gracias por ayudarme cuando más lo necesite. Por respaldarme como un verdadero amigo. Por darme una mano a pesar de la diferencia de horarios jejeje...

MUY ESPECIALMENTE A

Mi asesor, el Dr. Arturo Rojo Domínguez.
A los miembros de mi jurado,

Dr. Armando Gomez Puyou
Dra. Adela Rodríguez Romero
Dra. Caludia Benítez Cardoza
Dr. Daniel A. Fernández
Dr. Rafael Zubillaga Luna

Por dejarme compartir de su enorme sabiduría. Por cuestionarme, por escucharme y por dejarme aventurar en mis respuestas.

Dr. Octavio Novaro Peñalosa, por todas las atenciones, por haber sido mi asesor, por las muestras de cariño y por aquel regaño en su oficina... Toda mi admiración y mi respeto.

Dr. Ricardo Gómez, muchas gracias por la confianza, por el aprecio y por dejarme aprender de usted. Gracias por la beca del S. N. I.

A todos los profesores del área de Biofísicoquímica, con profundo respeto.
Muy especialmente al Dr. Zubillaga. Doctor muchas gracias por las sonrisas, le salen re bonitas!!! Sin usted, mi tesis no sería mi tesis. Le agradezco desde el corazón que se haya tomado el tiempo de leerla con cuidadito, de cuestionarme tantas horas, de motivarme cuando daba una buena respuesta. Gracias por mostrarme el camino...

A todos mis compañeros de las distintas áreas del Departamento de Química. A toooodos con toooodo mi cariño!!!!!!!!!!!!!!!!!! UN VERDADERO HONOR HABER SIDO SU COMPAÑERA!!



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Química

**“Determinación del mecanismo molecular
de la inhibición de TcTIM:
estudios de la interacción proteína-ligando
y su aplicación en el diseño de fármacos”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias (Química)

presenta

I.B.Q.I. Liliana Marisol Moreno Vargas

Área de Biofísicoquímica

Posgrado en Ciencias Químicas
Doctorado Directo

Dr. Arturo Rojo Domínguez
Asesor

México, D. F., enero de 2008.