



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Estudio de los Requerimientos Físicoquímicos en el Reconocimiento  
Molecular entre Fármacos y la Acetilcolinesterasa**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. Verónica Tello Franco



TUTOR: Dr. Manuel Soriano García

AÑO: 2007



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Manuel Soriano García y con el apoyo de la beca para estudios de Maestría del CONACYT

## Índice

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes	
2.1. La enfermedad de Alzheimer	
2.1.1. Patología general del Alzheimer .....	3
2.1.2. Tratamiento farmacológico .....	5
2.2. La Acetilcolinesterasa	
2.2.1. Estructura.....	9
2.2.2. Función.....	12
2.3. Inhibidores de acetilcolinesterasa .....	13
2.4. La curcumina y el Alzheimer.....	21
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general.....	22
3.2. Objetivos específicos .....	22
4. Hipótesis .....	23
5. Metodología	
5.1. Superposición de ligandos .....	24
5.2. Dinámica molecular .....	26
5.3. Cálculo de interacciones .....	27
5.4. Docking.....	28
5.5. Otros descriptores .....	29

6. Resultados y discusión	
6.1. Superposición de ligandos .....	31
6.2. Dinámica molecular .....	35
6.3. Acoplamiento sobre proteína relajada .....	37
6.4. Cálculo de interacciones para moléculas sometidas a dinámica molecular.....	42
6.5. Acoplamiento sobre la estructura cristalográfica.....	47
6.6. Cálculo de interacciones para moléculas sometidas a minimización .....	48
6.7. Otros descriptores .....	62
7. Conclusiones .....	70
8. Perspectivas .....	72
9. Bibliografía.....	73
10. Anexos	
10.1. El método PM3 .....	82
10.2.El campo de fuerza CHARMM.....	84
10.3. Dinámica Molecular .....	87
10.4. GOLD y SILVER .....	89
10.5. Puentes de hidrógeno y HBAT .....	92
10.6. PDB2PQR y PROPKA .....	94
10.7. GRASP.....	96
10.8. CASTp .....	97

## **1. Introducción**

Dado el continuo incremento en la esperanza de vida, principalmente en los países más desarrollados, las enfermedades relacionadas con la edad se han vuelto retos para la salud pública. En México no estamos fuera de esta tendencia, pues la esperanza de vida se incrementó dos años entre 1994 y 2000 (Organización Panamericana de la Salud), y para 2005 se calculó en 75.3 años (Secretaría de Salud, 2006). Entre estas enfermedades, el Alzheimer y otras demencias representaron para los países más desarrollados, la causa de muerte en 2.7% de los casos en el 2002 (World Health Organization, 2007). Se estima que en el 2025, 34 millones de personas sufrirán esta enfermedad (Vas y cols., 2001).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y multifactorial. Debido a su complejidad, se realiza abundante investigación para identificar los factores que la causan, tanto los genéticos como los derivados del estilo de vida. En la actualidad el único tratamiento disponible es el sintomático, pues no se cuenta con una cura para la enfermedad. Los fármacos recetados generalmente tienen la finalidad de mejorar las habilidades cognitivas de los pacientes. Uno de ellos es un antagonista de receptores N-metil-D-aspartato, mientras que tres más son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa.

Los extractos de plantas utilizadas en medicina tradicional han sido estudiados como fuentes potenciales de principios activos. Por ejemplo la galantamina, fármaco aprobado por la FDA en 2001, es un alcaloide aislado de varias plantas de la familia Amaryllidaceae; mientras que la huperzina A, utilizada para el tratamiento del Alzheimer en China, es obtenido de *Huperzia serrata* (Zhu y cols., 2006). Park y Kim (2002) observaron que el extracto metanólico de *Curcuma longa* protege a las células neuronales de la toxicidad de los péptidos  $\beta$ -amiloides, identificando a la curcumina como una de las moléculas con esta actividad. Posteriormente, Yang y colaboradores (2005) demostraron que la curcumina inhibe la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide y bloquea la formación de oligómeros solubles. Al ser una molécula altamente hidrofóbica, la curcumina puede atravesar la barrera hematoencefálica.

Por ello, en este trabajo se estudian las interacciones existentes en la unión de la enzima acetilcolinesterasa con algunos de sus inhibidores, a fin de identificar aquellas que confieren alta especificidad. Esta información es utilizada para sugerir un modo posible de unión entre curcumina y la acetilcolinesterasa, y proponer las modificaciones químicas necesarias para generar un inhibidor específico de alta afinidad.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. La enfermedad de Alzheimer**

#### 2.1.1. Patología general del Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una demencia neurodegenerativa primaria que se manifiesta mediante el deterioro gradual de las funciones cognitivas del paciente (Vas y cols., 2001). Clínicamente, el diagnóstico se realiza mediante el deterioro intelectual del individuo, con los criterios enlistados en la Tabla 2.1

Neuropatológicamente, está caracterizada por la formación de placas neuríticas extracelulares y ovillos neurofibrilares intraneuronales. Las placas neuríticas están formadas por péptidos  $\beta$ -amiloides de 39 a 43 aminoácidos. Estos son generados a partir de la proteína precursora amiloide (PPA), una proteína integral de membrana que en su metabolismo regular es procesada mayormente por la  $\alpha$ -secretasa generando un péptido que es secretado al exterior de la célula y un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos. Este último es cortado por la  $\gamma$ -secretasa para producir un péptido soluble y otro fragmento C-terminal pequeño. No se conocen bien sus funciones normales, pero se sugiere que ayudan a regular la sobrevivencia neuronal, la plasticidad sináptica, la adhesión celular y el crecimiento de neuritas. En el proceso amiloide, la PPA es lisada por la  $\beta$ -secretasa produciendo un fragmento N-terminal secretado y el fragmento C-terminal unido a membrana, el cual a su vez es procesado por la  $\gamma$ -secretasa generando un fragmento C-terminal aún menor y fragmentos  $\beta$ -amiloides ( $\beta$ A) de distintas longitudes. Casi el 90% de estos fragmentos consisten de 40 aminoácidos ( $\beta$ A40), produciéndose fragmentos de 42 residuos ( $\beta$ A42) en menor proporción. Estos últimos se agregan más rápidamente, formando oligómeros y depositándose en forma de placas que son tóxicas para las neuronas (Hellström-Lindahl, 2000; Mattson, 2004; Nguyen y cols., 2006; Skovronsky y cols., 2006).

**Tabla 2.1** Criterios DSM-IV para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer<sup>1</sup>

A	Desarrollo de deficiencia cognitiva múltiple, manifestada por:
A.1	Alteración de memoria (aprender nueva información y evocar la ya aprendida), y
A.2	Una o más de las siguientes alteraciones cognitivas: afasia, apraxia, agnosia y/o alteración de funciones ejecutivas.
B	Las alteraciones descritas en A representan un deterioro con respecto a las capacidades previas del paciente, y producen dificultades significativas en la función ocupacional y en la social.
C	La evolución se caracteriza por instauración gradual y deterioro cognitivo continuo.
D	Las alteraciones expresadas en A.1 y A.2 no se deben a lo siguiente:
D.1	Otros trastornos del sistema nervioso central que puedan ocasionar deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas (por ej. enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral).
D.2	Trastornos sistémicos que pueden ocasionar demencia (por ej. hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico, niacina, hipercalcemia, neurosífilis, SIDA)
D.3	Intoxicaciones
E	Las alteraciones no ocurren únicamente durante un síndrome confusional agudo.
F	El trastorno no es atribuible a una alteración psiquiátrica que pudiera justificar las manifestaciones, como por ejemplo una depresión mayor o una esquizofrenia.

<sup>1</sup>Criterios DSM-IV para el diagnóstico de la demencia. <http://www.infodoctor.org/infodoc/alzheimer/articulos/criterios.htm>  
(Consultado en mayo, 2007)

Los ovillos neurofibrilares están compuestos de pares de filamentos helicoidales de proteína  $\tau$  (tau) hiperfosforilada. La proteína  $\tau$  se une a microtúbulos en las neuronas, estabilizándolos. Diversas mutaciones pueden causar pérdida de su función o aumento en la formación de fibrillas. La hiperfosforilación por ejemplo, causa que la proteína se disocie de los microtúbulos alterando la estructura celular, con lo que el transporte axonal de proteínas se ve afectado, resultando en pérdida de función sináptica y muerte neuronal (Hellström-Lindahl, 2000; Skovronsky y cols., 2006).

La hipótesis amiloide propone que la respuesta inflamatoria iniciada por los oligómeros  $\beta A$ , junto con su toxicidad, conlleva daños neuríticos y sinápticos progresivos, alterando eventualmente la homeostasis neuronal y aumentando la vulnerabilidad ante el estrés oxidativo y metabólico. Al afectarse la actividad de cinasas y fosfatasas, se promueve la mayor fosforilación de la proteína  $\tau$ , resultando en la formación de ovillos neurofibrilares. La conjunción de daño celular causado por ambas lesiones se manifiesta como demencia, síntoma característico de la enfermedad de Alzheimer (Hardy y Selkoe, 2002).

Se han identificado mutaciones en los genes PPA, presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2) que generan un aumento en la producción del péptido  $\beta A$ . En el gen PPA, las mutaciones modifican uno o dos aminoácidos adyacentes al péptido  $\beta A_{42}$  aumentando su lisis por las

$\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas. Las mutaciones en los genes PS1 y PS2 alteran la actividad de la  $\gamma$ -secretasa al ser la presenilina una de las cuatro proteínas que forman el complejo  $\gamma$ -secretasa. Asimismo, las mutaciones en el gen de la apolipoproteína E se consideran factores de riesgo genético. La isoforma apoE4 favorece la mielinización, el depósito y reduce la eliminación  $\beta$ -amiloide, además de modificar la plasticidad neuronal (Mattson, 2004; Proaño Narváez y Aguilar Rebolledo, 2004). Adicionalmente, se consideran factores de riesgo: la alimentación alta en colesterol, el sedentarismo y el bajo nivel educativo (Mattson, 2004).

### 2.1.2. Tratamiento farmacológico

Partiendo de los mecanismos de la enfermedad conocidos hasta el momento, se han identificado diversos nichos para el desarrollo de tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer (Figura 2.1). En primer lugar se busca evitar la formación de péptidos  $\beta$ A. Esto puede lograrse con agonistas de la  $\alpha$ -secretasa, o mediante inhibición de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas. La  $\alpha$ -secretasa es una proteína de la membrana celular poco caracterizada, y se postula como una metaloproteínasa. Su actividad aumenta al estimularse vía la proteína cinasa C, la cuál puede activarse mediante agonistas muscarínicos  $M_1$  y antagonistas muscarínicos  $M_3$  (Hardy y Selkoe, 2002; Nguyen y cols., 2006; Skovronsky y cols., 2006).

La  $\beta$ -secretasa, o BACE (enzima escindidora de PPA en el sitio beta) pertenece al grupo de proteasas aspárticas, para las que ya se han desarrollado inhibidores. Se han identificado las dos isoformas BACE1 y BACE2, siendo el tipo 1 el predominante en cerebro. Además de contarse con su estructura de rayos X, se observó que en el ratón knock-out para esta proteína se elimina la producción del péptido  $\beta$ A sin presentar otros efectos secundarios, por lo que su inhibición es prometedora. Actualmente se investigan péptidos con actividad inhibitoria de BACE1, además de otros inhibidores no-peptídicos (Nguyen y cols., 2006; Skovronsky y cols., 2006).

La inhibición del complejo de  $\gamma$ -secretasa también ha sido estudiada. En este caso existe mayor preocupación por posibles interferencias con otras rutas de señalización, pues este

complejo interviene en la cascada tipo Notch, relacionada con la diferenciación celular tanto en embriones como en adultos (Hardy y Selkoe, 2002; Skovronsky y cols., 2006). Sin embargo, se cuenta ya con fármacos en fase clínica de estudios que no presentan estas interferencias, pues se observa una ventana terapéutica donde se conserva la actividad Notch mientras se obtienen los efectos deseados (Leuchtenberger y cols., 2006; Nguyen y cols., 2006).

Por otra parte, se ha demostrado en ratones que los fármacos estabilizadores de microtúbulos mejoran el transporte axonal y aumentan el número de los mismos. Otras estrategias para evitar la formación de ovillos neurofibrilares son: la prevención de la hiperfosforilación de la proteína  $\tau$  mediante inhibidores de cinasas, el diseño de moléculas que promuevan su degradación proteolítica, y el empleo de moléculas que inhiban la agregación de los filamentos de proteína  $\tau$  (Castro y cols., 2002; Skovronsky y cols., 2006).

Alternativamente, se estudia la inmunización, ya sea activa (con péptidos  $\beta A$ ) o pasiva (anticuerpos monoclonales contra el péptido  $\beta A$ ), a fin de inhibir la formación de los depósitos amiloides. Se ha observado en ratones la disminución de placas amiloides y una mejora en la actividad cognitiva, mientras que en otros estudios se observa la falta de efecto sobre placas previamente formadas. Se concluye que el tratamiento puede prevenir y retrasar la progresión de la enfermedad, pero no revertir el daño ya causado. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar el efecto de la inmunización. En humanos se iniciaron estudios clínicos, que fueron suspendidos al presentarse algunos casos de meningoencefalitis. Por ello, actualmente se investigan principalmente técnicas de inmunización pasiva o con inmunógenos distintos al péptido  $\beta A$  (Da Silva y cols., 2006; Skovronsky y cols., 2006).

El péptido  $\beta A$  posee sitios con alta afinidad por el  $Cu^{2+}$  y baja afinidad hacia el  $Zn^{2+}$ . Se ha observado que la administración de quelantes para estos metales disminuye los depósitos amiloides en ratones y en humanos disminuyen los niveles plasmáticos de  $\beta A_{42}$ , pues se propone que estos iones participan en la agregación de los péptidos y en la toxicidad mediada por oxígeno (Skovronsky y cols., 2006; Ono y cols., 2006).

En estudios epidemiológicos se relacionan los niveles altos de colesterol con un riesgo mayor de Alzheimer, mientras que la administración crónica de antiinflamatorios no-esteroides (NSAID por sus siglas en inglés) como ibuprofeno o indometacina correlaciona con un riesgo menor. Se sugiere que el colesterol puede promover la ruta amiloide de procesamiento de la PPA. Por lo tanto, se administran estatinas para disminuir los niveles de colesterol. Se ha observado que este tratamiento disminuye los niveles de  $\beta A$  y la formación de placas en ratones transgénicos (Hardy y Selkoe, 2002; Skovronsky y cols., 2006). Por su parte, los NSAID disminuyen la producción del péptido  $\beta A_{42}$  mediante un mecanismo independiente de ciclooxigenasa pero que probablemente involucra la modulación de complejo de  $\gamma$ -secretasa (Leuchtenberger y cols., 2006). Asimismo, la administración de antioxidantes y compuestos con propiedades neuroprotectoras, tales como vitaminas C y E busca prevenir los efectos tóxicos y neurodegenerativos de la  $\beta A$  (Castro y cols., 2002; Ono y cols., 2006).

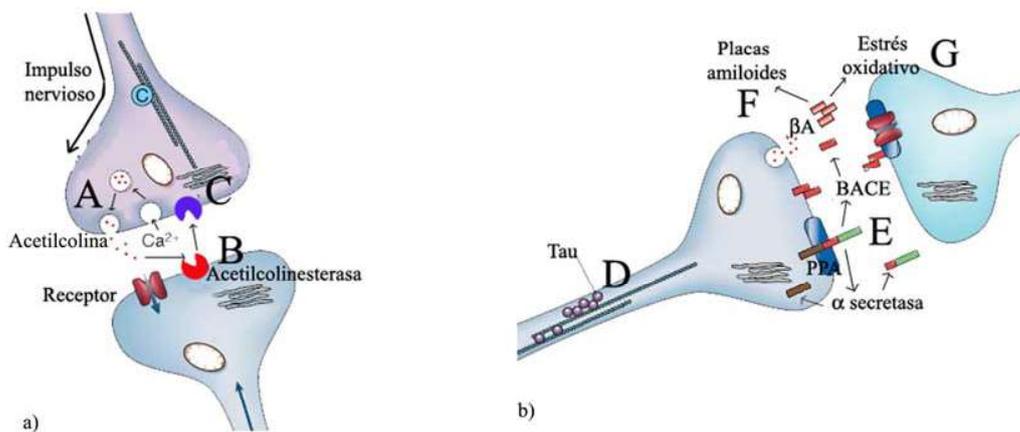
Una vertiente distinta en el tratamiento farmacológico del Alzheimer se enfoca en el alivio de los síntomas y en disminuir la degeneración neuronal. Se basa en la llamada “hipótesis colinérgica”, según la cuál la neurodegeneración se relaciona con el deterioro en la neurotransmisión colinérgica (Castro y Martinez, 2006).

Brevemente, la acetilcolina es sintetizada en el citoplasma neuronal a partir de colina y acetilcoenzima A, y es almacenada en vesículas sinápticas. Al recibir un impulso eléctrico, ésta es liberada hacia el espacio sináptico mediante señalizaciones dependientes de canales de  $Ca^{2+}$ . La acetilcolina se une a sus receptores en la membrana postsináptica, que pueden ser nicotínicos o muscarínicos. La acetilcolinesterasa, una enzima localizada en la membrana de la célula postsináptica, hidroliza la acetilcolina a ión acetato y colina. La colina liberada al espacio sináptico es captada nuevamente por la célula presináptica mediante un sistema de transporte dependiente de  $Na^+$ , para ser reutilizada (Flórez, 1992).

Existen dos tipos de colinesterasas, la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. La primera se encuentra localizada extracelularmente en el espacio sináptico de las terminaciones colinérgicas, e intracelularmente en neuronas y eritrocitos, e hidroliza la

acetilcolina a colina y acetato. La butirilcolinesterasa (BChE) se localiza en el plasma de células de hígado, músculo, intestino y otros tejidos. Además de acetilcolina, hidroliza otros esteres de colina y algunos fármacos (Flórez, 1992).

A nivel presináptico, el tratamiento farmacológico busca aumentar la liberación de acetilcolina. Para ello se plantean diversas estrategias como por ejemplo, bloquear los canales de  $K^+$  o  $Na^+$  que regulan su liberación, o mediante antagonistas muscarínicos  $M_2$  interrumpir la retroalimentación negativa del proceso para aumentar la liberación de acetilcolina. El uso de agonistas nicotínicos también tendrá el mismo efecto, pero mediante retroalimentación positiva. Alternativamente, la función colinérgica puede favorecerse mediante fármacos que promuevan la resorción presináptica de colina (Camps y Muñoz-Torrero, 2002). A nivel postsináptico, se busca aumentar la estimulación de los receptores y por ende, mejorar la transmisión colinérgica. Esto puede lograrse al inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa. Una descripción más detallada sobre este tipo de fármacos se encuentra en la sección 2.3



**Figura 2.1** Sitios blanco para el tratamiento farmacológico del Alzheimer

**a)** Esquema de la sinapsis colinérgica. Ésta puede promoverse mediante: A. Aumento en la liberación de acetilcolina. B. Inhibición de la acetilcolinesterasa. C. Aumento en la resorción de colina.

**b)** Esquema de la formación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ). Otras alternativas de tratamiento son: D. Protección de los microtúbulos. E. Inhibición de la formación del péptido  $\beta A$  mediante agonistas de la  $\alpha$  secretasa o inhibición de la BACE. F. Inhibición de la agregación de  $\beta A$ . G. Protección y prevención contra el daño oxidativo.

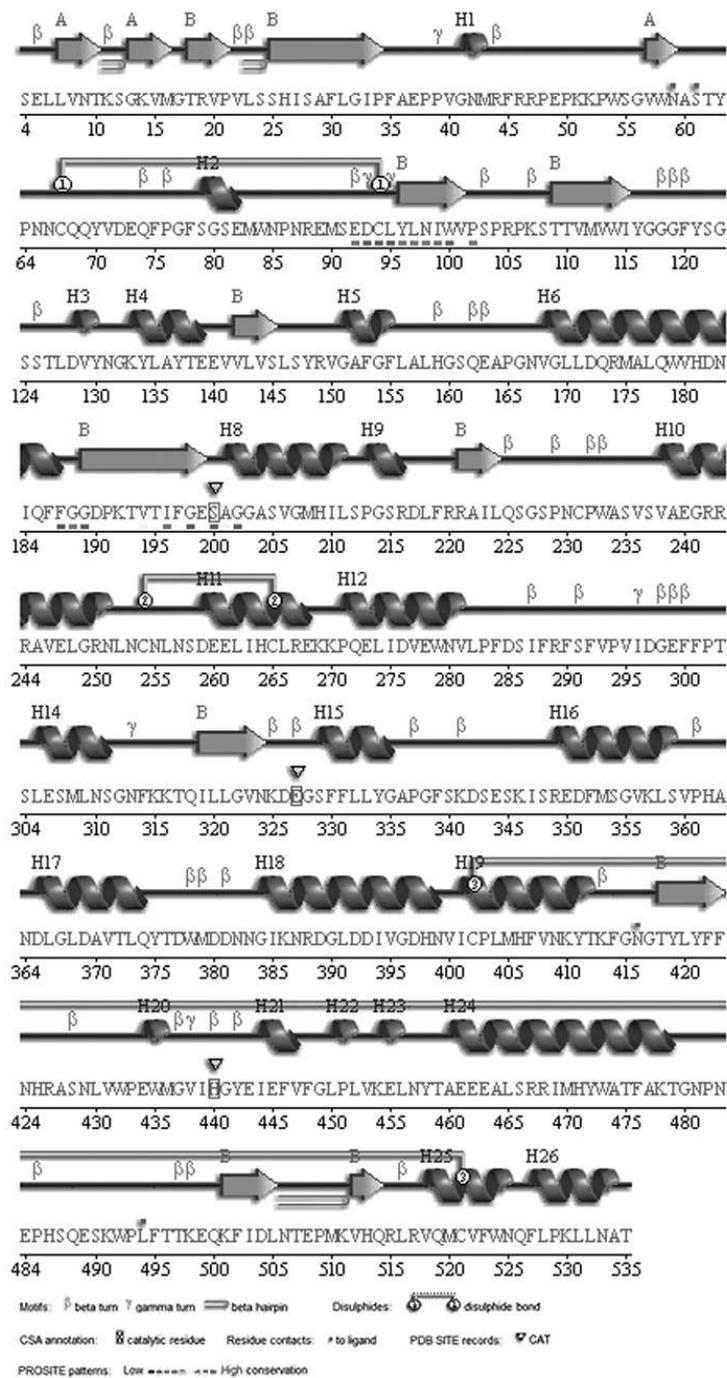
## 2.2. La Acetilcolinesterasa

### 2.2.1. Estructura

La acetilcolinesterasa (AChE) es una proteína perteneciente a la familia de las colinesterasas. Debido a la alta homología entre sus miembros, tanto en secuencia como en estructura terciaria (Cygler y cols., 1993), se ha estudiado mayormente aquella aislada de *Torpedo californica*, una raya que posee la proteína en abundancia en sus órganos eléctricos (Alberts y cols., 2002); y los resultados se han extrapolado a toda la familia. Por ello, en este trabajo se hará referencia a la acetilcolinesterasa aislada de *T.californica*, y la numeración de los aminoácidos de interés corresponderá a la misma.

La AChE de *T.californica* es una proteína de 537 aminoácidos, elipsoidal, de dimensiones aproximadas de 45 x 60 x 65 Å. Su estructura secundaria es 30% hélices  $\alpha$  y 15% hojas  $\beta$  (Figura 2.2), formando un plegamiento tipo alfa/beta hidrolasa. Consiste de una hoja  $\beta$  central formada por 12 hebras y rodeada de 14 hélices  $\alpha$ . Las dos primeras y dos últimas hebras forman horquillas beta unidas más débilmente a las hélices centrales.

El sitio activo se localiza en el fondo de una hendidura angosta de aproximadamente 20 Å de longitud. Ésta se encuentra formada por un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, un buen número de ellos aromáticos. Se distinguen cinco sitios de interés. El sitio activo está formado por una triada catalítica, Ser200, Glu327 e His440. Adyacente al mismo, se localiza el llamado sitio oxianión, formado por los N en Gly118, Gly119 y Ala201. Dos aminoácidos aromáticos, Trp84 y Phe330, junto con Asp199 conforman el sitio cuaternario; mientras que el sitio de unión al grupo acil está formado por las fenilalaninas 288, 290, 331 y por Trp233. Finalmente, en la parte superior de la hendidura se ubica el sitio aniónico periférico, formado por Tyr70, Tyr121 y Trp279 (Greenblatt y cols., 2003; Harel y cols., 1996; Sussman y cols., 1991)



**Figura 2.2** Estructura secundaria de la acetilcolinesterasa de *Torpedo californica*. Tomado de PDBsum (Laskowski y cols., 2005), códigoPDB: 1EA5

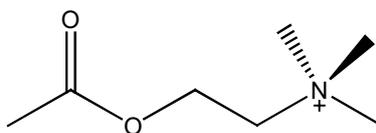
La acetilcolinesterasa se encuentra en distintos arreglos dependiendo del tejido estudiado. Estos son generados mediante splicing alternativo seguido por modificaciones post-

traduccionales en que se le unen subunidades estructurales no catalíticas generando el polimorfismo. En humanos existe un solo gen, que es capaz de generar tres subunidades catalíticas: H, T y una tercera cuyo producto de traducción no ha sido observado. Las subunidades H forman dímeros unidos a membrana mediante GPI (glicosil-fosfatidilinositol), mientras que las subunidades T pueden existir como monómeros o dímeros anfipáticos, o tetrámeros solubles. Pueden también unirse con distintas subunidades estructurales para formar tetrámeros unidos a membrana o conjuntos asimétricos de uno a tres tetrámeros (Giles, 1997; Silman y Sussman, 2005).

En el sistema nervioso central humano, la unidad funcional es un tetrámero de subunidades T que se ancla a la membrana mediante un polipéptido de 20 kDa (PRiMA). La interacción se realiza entre un dominio rico en prolinas en el extremo N-terminal de PRiMA con el dominio llamado WAT por sus siglas en inglés (tryptophan amphiphilic tetramerization) en el extremo C-terminal de las subunidades T. Si bien se observa la formación de puentes disulfuro entre estos péptidos, la estructura es estabilizada mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de apilamiento entre los triptofanos y las prolinas (Dvir y cols., 2004; Silman y Sussman, 2005).

El tetrámero está formado por dos dímeros. Es conformacionalmente flexible, observándose dos posibles arreglos cuaternarios para los dímeros: con sus ejes principales a  $40^\circ$  y los ejes en la interfase antiparalelos; o con los ejes principales antiparalelos y los ejes de la interfase a  $60^\circ$  entre sí (Bourne y cols., 1999). Para formar un dímero, los monómeros dependen del contacto entre zonas altamente hidrofóbicas formadas por las hélices alfa 7, 8 y 10 de cada uno, además de observarse la presencia de un puente disulfuro entre las subunidades (mediante las C537 de cada una). La hendidura donde se localiza el sitio activo en cada subunidad está orientada a lados opuestos del dímero (Giles, 1997; Morel y cols., 2001).

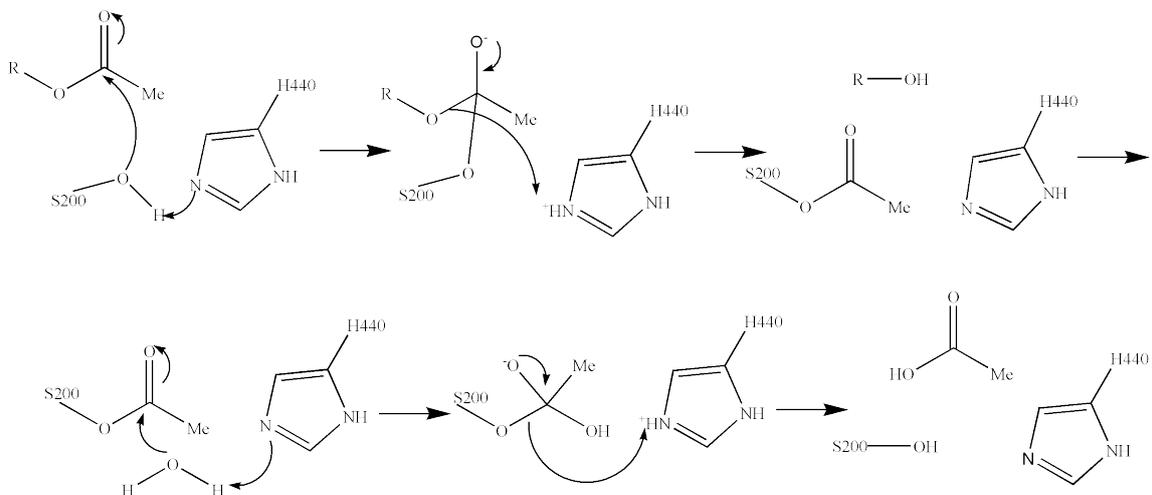
### 2.2.2. Función



**Figura 2.3** Estructura de la acetilcolina

Los distintos sub-sitios identificados en la hendidura de la acetilcolinesterasa deben su nombre a su función con respecto al sustrato natural, la acetilcolina. Por ejemplo, el sitio periférico une con baja afinidad a moléculas encontradas en solución, atrapándolas para que puedan posteriormente entrar en la hendidura y dirigirse hacia el sitio activo. El resto interactúa con las distintas funciones características de la acetilcolina. El sitio cuaternario estabiliza la función trimetilamonio mediante interacciones  $\pi$ -catión. Por su parte, el sitio de unión al grupo acil aumenta la especificidad por el sustrato al restringir su tamaño. El sitio oxianión une a la función acetil, estabilizando al intermediario tetraédrico (Greenblatt y cols., 2003; Rosenberry y cols., 2005; Sussman y cols., 1991). Finalmente, es en el sitio catalítico donde se lleva a cabo la hidrólisis de la acetilcolina, mediante un mecanismo mostrado en la Figura 2.3. El papel del Glu327 no se encuentra bien definido, si bien se propone que estabiliza el estado de transición y el intermediario tetraédrico mediante interacciones electrostáticas (Zhang y cols., 2002).

Además de su papel de hidrolizar la acetilcolina en la sinapsis colinérgica, la acetilcolinesterasa alternativamente realiza otras funciones “no clásicas”. La proteína posee homología en secuencia y posiblemente estructural con un conjunto de proteínas de adhesión neuronal, por lo que se propone un papel en el desarrollo y mantenimiento sináptico. Asimismo posee la capacidad de interactuar con la laminina, una proteína membranal, realizando funciones de proteína de la matriz ósea. También se relaciona a la acetilcolinesterasa con el crecimiento de neuritas, mediante interacciones con el sitio periférico. Este mismo sitio se postula como el dominio que interactúa con los péptidos  $\beta$ A acelerando la formación de fibras amiloides al inducir cambios conformacionales. Se ha observado que las placas amiloides con presencia de AChE son más neurotóxicas que aquellas formadas únicamente por fibras. Se postula que la presencia de acetilcolinesterasa



**Figura 2.4** Mecanismo catalítico de la acetilcolinesterasa. Tomado de Zhang y cols., 2002.

acelera la agregación del péptido  $\beta$ A, el cuál a su vez inhibe algunos pasos de la expresión, ensamblaje y glicosilación de AChE (Castro y Martinez, 2006; Hellström-Lindahl, 2000; Silman y Sussman, 2005).

### 2.3. Inhibidores de acetilcolinesterasa

Debido a la relación observada entre la activación colinérgica y el metabolismo de PPA, se proponen distintos modos en que los inhibidores de AChE pueden interferir en dicho metabolismo. En primer lugar, al estimular los receptores nicotínicos y muscarínicos se promueve el metabolismo de PPA mediante la ruta no-amiloide ( $\alpha$ -secretasa). Se presenta también la posibilidad de que los inhibidores regulen la síntesis, glicosilación, fosforilación o transporte de la PPA. Finalmente, los inhibidores podrían también actuar inhibiendo la  $\beta$ -o la  $\gamma$ -secretasa. Se han realizado estudios con distintos inhibidores, reportándose amplia variación en los efectos observados dependiendo del inhibidor utilizado y de los distintos tipos de células. Sin embargo, ha logrado comprobarse la relación entre la inhibición del sitio periférico de la AChE y la disminución en la agregación del péptido  $\beta$ A (Castro y Martinez, 2006; Hellström-Lindahl, 2000). No obstante, los principales esfuerzos se han

enfocado a la inhibición de la acetilcolinesterasa en su sitio activo, buscando moléculas que se unan de manera reversible o pseudo-irreversible y con alta afinidad.

Considerando una estructura base, generalmente de un inhibidor de buena afinidad bien caracterizado, se han realizado diversas sustituciones y modificaciones, resultando en una gran cantidad de compuestos. Se enlistarán algunas referencias relevantes a cada caso, resaltando aquellos compuestos que han reportado características sobresalientes (Tabla 2.2). Cuando se ha cristalizado el complejo inhibidor-acetilcolinesterasa, se indica el código del Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank, Berman y cols., 2003) entre paréntesis.

**Tabla 2.2** Inhibidores de acetilcolinesterasa

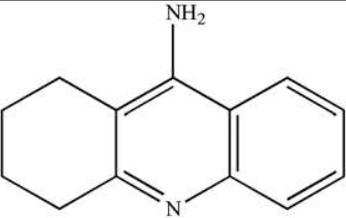
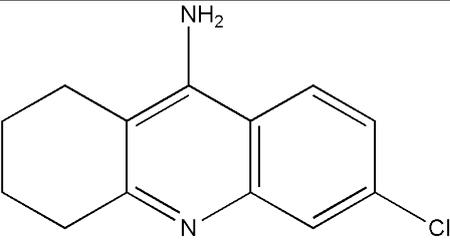
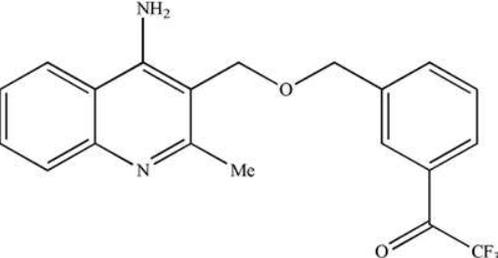
Estructura base	Ejemplos	CI <sub>50</sub>	Referencia
 Tacrina (1ACJ)		1.8 nM**	Gregor y cols., 1992
		3 nM *	Doucet y cols., 2001
	Otros		Barreiro y cols., 2003 Fink y cols., 1995 McKenna y cols., 1997 Recanatini y cols., 2000 Tabarrini 2001

Tabla 2.2 Continúa

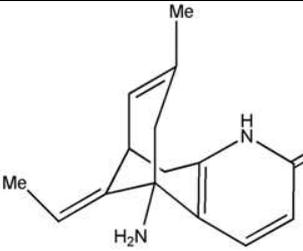
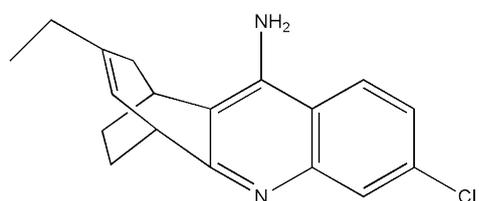
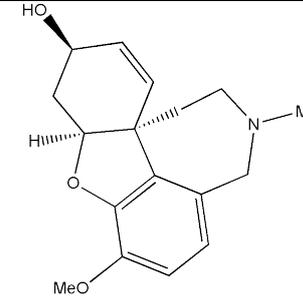
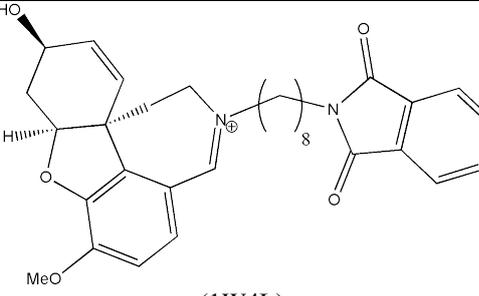
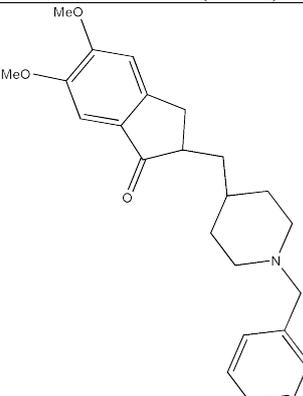
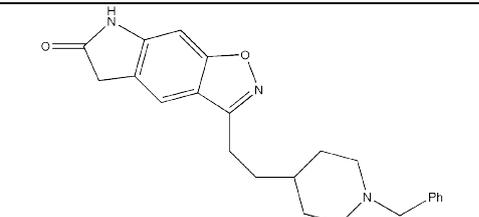
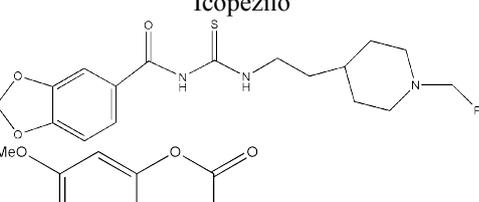
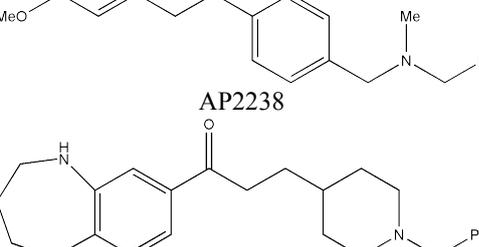
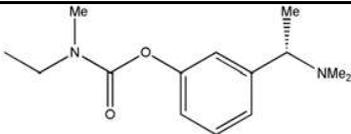
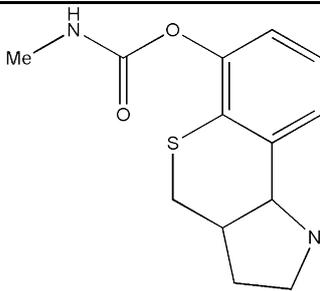
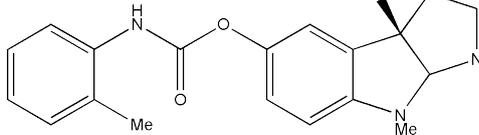
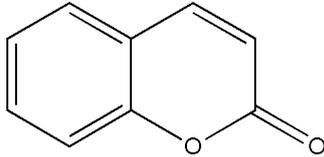
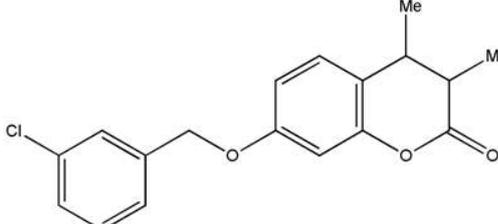
Estructura base	Ejemplos	CI <sub>50</sub>	Referencia
 <p>Huperzina-A (1VOT)</p>	 <p>Huprina X (1E66)</p> <p>Otros</p>	0.32 nM **	Camps y cols., 2000 Camps y cols., 2003 Högenauer y cols., 2001 Zhou y Zhu, 2000
 <p>Galantamina (1DX6)</p>	 <p>(1W4L)</p>	10 nM †	Mary y cols., 1998
 <p>Donepezilo (1EVE)</p>	 <p>Icopezilo</p>  <p>AP2238</p>  <p>TAK-147 (zanapezilo)</p> <p>Otros</p>	0.33 nM **	Villalobos y cols., 1995 Vidaluc y cols., 1994 Piazzini y cols., 2003 Ishihara y cols., 2000 Andreani y cols., 2001 Contreras y cols., 2001 Rodríguez-Franco y cols., 2005 Toda y cols., 2003 Vidaluc y cols., 1995 Villalobos y cols., 1994

Tabla 2.2 Continúa

Estructura base	Ejemplos	CI <sub>50</sub>	Referencia
 <p>Rivastigmina (1GQR)</p>		8.11 nM **	Bolognesi y cols., 2004
Otros		10 nM **	Yu y cols., 2001
			Bolognesi y cols., 2001 Yu y cols., 2002
 <p>Cumarina</p>		Ki=3.4 μM <sup>†</sup>	Brühlmann y cols., 2001
Otros			Kang, y cols., 2001

\*AChE de Torpedo californica \*\*AChE en eritrocitos humanos †AChE de *E. electricus* ‡AChE de rata

La tacrina, (1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina) es uno de los fármacos aprobados para el tratamiento de los síntomas del Alzheimer. Se ha cristalizado a la acetilcolinesterasa con este inhibidor (código PDB: 1ACJ), observándose las siguientes interacciones: apilamiento entre el anillo y W84 en una cara y con F330 por la otra, además de la formación de un puente de hidrógeno entre el N del anillo y H440\O (Harel y cols., 1993).

La huperzina A es un alcaloide aislado de *Huperzia serrata*, que se encuentra en fase de estudios clínicos en China para el tratamiento del Alzheimer. Su estructura cristalográfica en unión a la AChE (código PDB: 1VOT) revela un puente de hidrógeno entre el carbonilo y Y130\OH, puentes de hidrógeno mediados por agua con el carbonilo de E199 y con Y121\OH, interacciones del grupo amino con W84 y F330 similares a los existentes para el tacrina, y un puente de hidrógeno débil entre el grupo metil del etilidieno con H440\O, además de contactos con los residuos del sitio oxianión. Como característica única, se observa un cambio en el ángulo psi entre G117 y G118, modificando la conformación del sitio oxianión (Raves y cols., 1997). Los derivados de mejores características para esta

molécula se obtuvieron al combinar la función aminoquinolina de la tacrina con el bicyclo de la huperzina, obteniendo un grupo de compuestos llamados huprinas. Su estructura cristalográfica muestra que las funciones que lo integran mantienen prácticamente todas sus interacciones características (Camps y cols., 2003). Además, se ha observado que algunos compuestos como la huprina X combinan su alta afinidad por la AChE con la capacidad de estimular receptores nicotínicos y muscarínicos (Muñoz-Torrero y Camps, 2006).

La galantamina es un alcaloide aislado de diversas plantas de la familia Amaryllidaceae. Posee buena especificidad para la acetilcolinesterasa con respecto a la butirilcolinesterasa, además de ser un activador de receptores nicotínicos. Es otro de los fármacos utilizados en el tratamiento de Alzheimer. Se ha cristalizado la estructura de la acetilcolinesterasa con ésta molécula en su sitio activo (código PDB: 1DX6). Se observan las siguientes interacciones: dos puentes de hidrógeno, entre el grupo hidroxilo y E199\OE1, y entre el O del grupo metoxi y S200\OG. Se observan, además, un puente de hidrógeno débil entre el grupo N-metil y D72\OD2, y un puente aromático entre el grupo hidroxilo y la F330. Adicionalmente, la galantamina presenta contactos con los residuos del sitio cuaternario (W84) y del sitio de unión a acil (F288 y F290) (Greenblatt y cols., 1999; Greenblatt y cols., 2003).

El donepezilo, el tercero de los fármacos utilizados en el tratamiento del Alzheimer, se une a lo largo de la hendidura, interactuando con distintos residuos aromáticos (código PDB:1EVE). En la parte superior, hay una interacción de apilamiento con W279, y el carbonilo forma contactos con F290, F331, y a través de una molécula de agua con F288. El N de la piperidina interactúa tipo  $\pi$ -catión con F330, y forma un puente de hidrógeno mediado por agua con Y121\OH. El anillo bencilo se une al sitio cuaternario mediante apilamiento con W84 y forma un puente de hidrógeno aromático con una agua conservada. No se observa interacción directa con la triada catalítica ni con el sitio oxianión (Kryger y cols., 1999). Se han diseñado diversos derivados, conservando la N-bencilpiperidina y reemplazando el anillo indanona. Por ejemplo, el icopezilo presenta una  $CI_{50}$  muy baja así como alta selectividad por AChE respecto a BchE. El zanapezilo se encuentra en estudios clínicos en Japón, y posee también buena selectividad además de estimular la transmisión

monoaminérgica y potenciar la actividad de la colina transferasa (Muñoz-Torrero y Camps, 2006).

La rivastigmina es un fármaco aprobado en el año 2000 para el tratamiento del Alzheimer. Es un análogo de sustrato caracterizado por su función carbamato, que reacciona lentamente con el sitio activo (Bolognesi y cols., 2004). Su estructura cristalográfica (código PDB:1GQR) muestra cómo la función carbamilo se une covalentemente a la S200 mientras la porción restante, ya disociada, está unida al sitio cuaternario. Con respecto al carbamilo, el oxígeno del carbonilo está en contacto con G119\N y A201\N del sitio oxianión, mientras que la porción amino interactúa con F288 y F290 del sitio de unión al grupo acilo. El grupo saliente presenta interacciones de apilamiento con W84 e interacciones aromáticas con un ángulo de 45° con F330, mientras que su grupo amino forma un puente de hidrógeno con G118\N. La H440 forma un puente de hidrógeno con E199, perdiendo la interacción con E327, lo cual se propone sea la causa de la cinética lenta de la reacción de reactivación (Bar-On y cols., 2002).

Aprovechando el conocimiento de la estructura cristalográfica de AChE, se han diseñado otra serie de fármacos compuestos de dos unidades funcionales unidas por una cadena de longitud variable. De este modo se busca inhibir el sitio activo de la proteína mientras que al interactuar con el sitio periférico, se incrementa la afinidad. Estos ligandos duales pueden estar compuestos por dos unidades de un mismo tipo, o de distinta naturaleza. A continuación se mostrará la Tabla 2.3 con algunos ejemplos.

**Tabla 2.3** Inhibidores duales de la acetilcolinesterasa

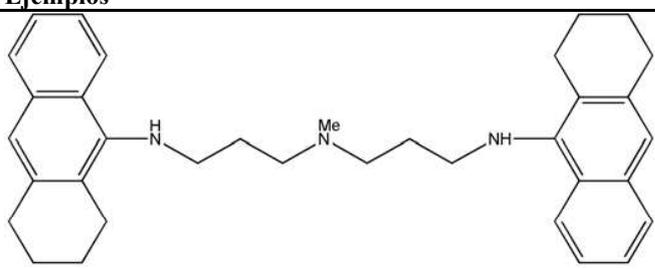
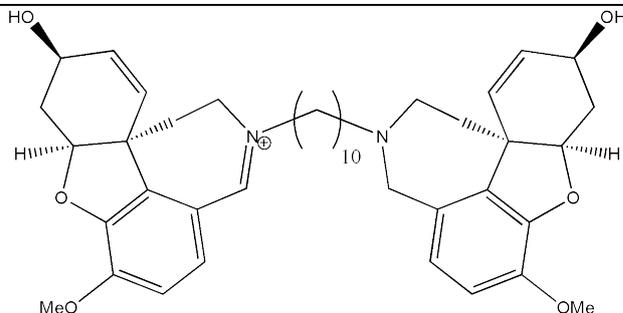
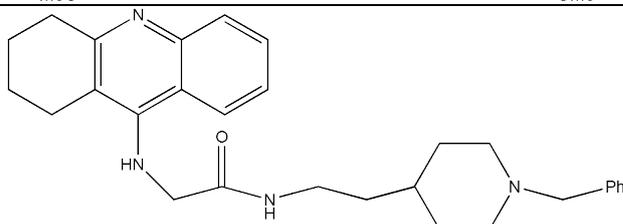
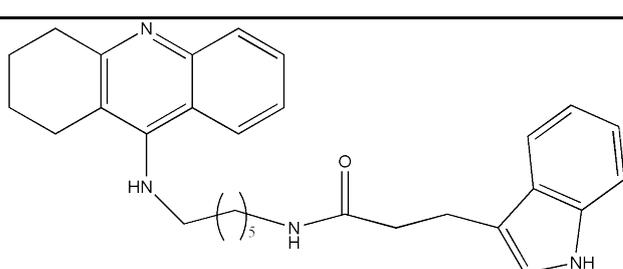
Estructura base	Ejemplos	IC <sub>50</sub>	Referencia
Tacrina		Ki=0.06 nM*	Savini y cols., 2003
Otros			Pang y cols., 1996

Tabla 2.3 Continúa

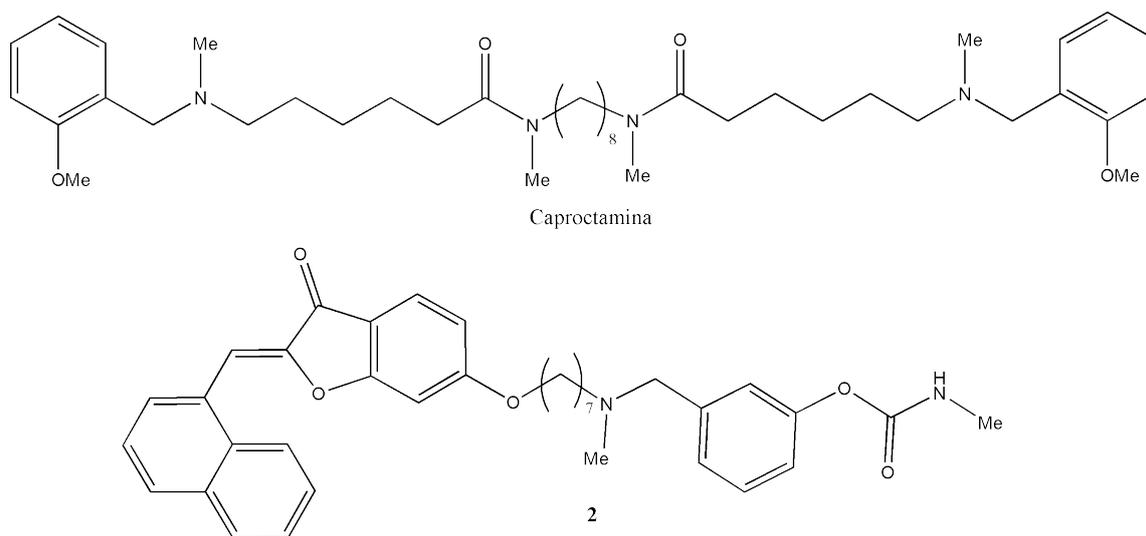
Estructura base	Ejemplos	IC <sub>50</sub>	Referencia
Galantamina		12 nM**	Guillou y cols.,2000
Tacrina- donepezilo		6 nM <sup>†</sup>	Shao y cols., 2004
Tacrina- otros	 <p style="text-align: center;">1</p>	0.02 nM <sup>‡</sup>	Muñoz-Ruiz y cols., 2005
Otros			Camps y cols., 2005 Carlier y cols.,1999 Rodríguez-Franco y cols., 2006

\*AChE suero fetal bovino \*\*AChE de E.electricus <sup>†</sup>AChE de rata <sup>‡</sup>AChE humana

Al obtener la estructura cristalográfica de AChE unida a bis-tacrina mediante una cadena de siete átomos de carbono (código PDB: 2CKM), se observó que las interacciones en la parte inferior de la cavidad son muy similares a las observadas para la tacrina, sin cambios significativos en los residuos de la parte media, mientras que en el sitio periférico el W279 cambia su conformación para permitir la formación de un “sándwich”, con la molécula entre el W279 y Y70 (Rydberg y cols., 2006). La incorporación de un grupo amino en la cadena alifática aumenta considerablemente la afinidad, indicando la existencia de un sitio de reconocimiento en la parte media de la hendidura (Savini y cols., 2003). La cristalización de AChE con un ligando dual de galantamina (código PDB: 1W4L), por su

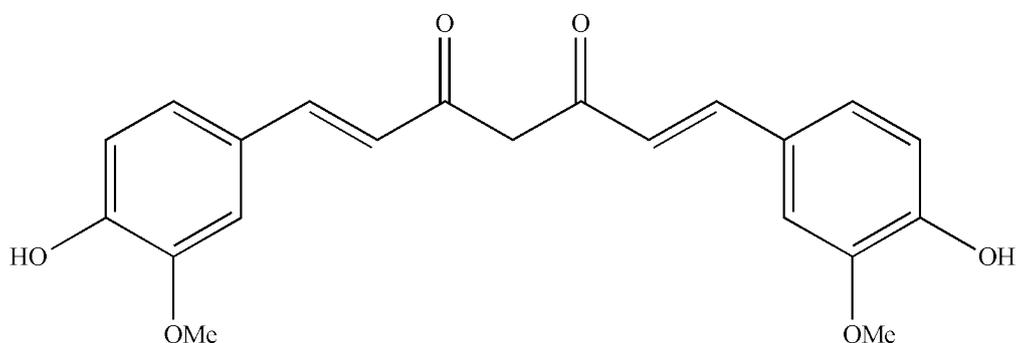
parte, mostró las mismas interacciones para la porción de galantamina en el fondo de la hendidura, y una interacción del grupo aromático con el W279. En este caso pudo observarse la importancia de forzar un cambio en la conformación de F330, pues esto redujo la afinidad (Greenblatt y cols., 2004).

Dentro de la búsqueda de fármacos con diversos tipos de acción se han diseñado algunos que, además de inhibir el sitio activo y el sitio periférico de la AChE, muestran afinidad ante los receptores muscarínicos tipo M2, como la caproctamina (Figura 2.5). Esta presenta aproximadamente la misma afinidad para ambos receptores. Por otra parte, el diseño de ligandos duales formados por una unidad de tacrina unida a un anillo de indol (**1**, ver Tabla 2.3) o por un carbamato unido mediante una cadena de metilenos a otro grupo cíclico (**2**), mostraron inhibición en la agregación del  $\beta$ A además de inhibición de AChE (Castro y Martínez, 2006). Con la finalidad de lograr, además de la inhibición de AChE, inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO); se han diseñado varios ligandos. Entre ellos destacan los derivados de cumarinas (Barril y cols., 2002) y aquellos que combinan la función carbamato de la rivastigmina con la estructura del inhibidor de MAO-B rasagilina (Muñoz-Torrero y Camps, 2006).



**Figura 2.5** Inhibidores duales de AChE con doble mecanismo de acción. Tomado de Castro y Martínez, 2006

## 2.4. La curcumina y el Alzheimer



**Figura 2.6** La estructura de curcumina, en su forma ceto. Tomada de Park y Kim, 2002.

En la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento del Alzheimer, se han estudiado los extractos de diversas plantas utilizadas en medicina tradicional como potenciales fuentes de principios activos. La galantamina y la huperzina A, por ejemplo, tienen este origen (Mukherjee y cols., 2007; Viegas y cols., 2005). Por su parte, el extracto metanólico de *Curcuma longa* conteniendo curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina mostró propiedades protectoras contra la toxicidad del péptido  $\beta$ A-42 en dos líneas celulares distintas (Kim y cols., 2001). Posteriormente se demostró su capacidad atravesar la barrera hematoencefálica e inhibir la formación de fibras amiloides, además de promover su desagregación (Yang y cols., 2005). Lo anterior, unido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias independientes de la inhibición de ciclooxigenasa, y a su baja toxicidad, hace a la curcumina un compuesto prometedor en el diseño de fármacos contra el Alzheimer. Otras potenciales aplicaciones de la curcumina y sus derivados se encuentran en el tratamiento de la fibrosis quística (Egan y cols., 2004), en el tratamiento de hiperlipidemias (Kempaiah y Srinivasan, 2006) y como anticancerígenos (Ono y cols., 2006).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Determinar los requerimientos de estructura molecular y fisicoquímicos que definen la especificidad de inhibición en la enzima acetilcolinesterasa por ligandos naturales y sintéticos específicos.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Estudiar la estructura y características fisicoquímicas de sustratos e inhibidores conocidos de la enzima.
- Identificar mediante métodos computacionales los residuos proteicos que están directamente involucrados en la interacción ligando y enzima; asimismo correlacionar los hallazgos con índices de actividad reportados para distintas moléculas.
- Proponer el modo de unión de la enzima con el producto natural curcumina y derivados, y posibles modificaciones a la misma para mejorar su capacidad inhibitoria.

#### **4. Hipótesis**

Es posible definir un conjunto de características físicas, químicas y fisicoquímicas que expliquen la afinidad de una molécula específica por el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa. Esto se puede lograr combinando la información estructural disponible con el estudio computacional de la enzima, el cuál incluye el análisis de conformación de los sustratos y de los complejos macromoleculares en el sistema enzima-ligando.

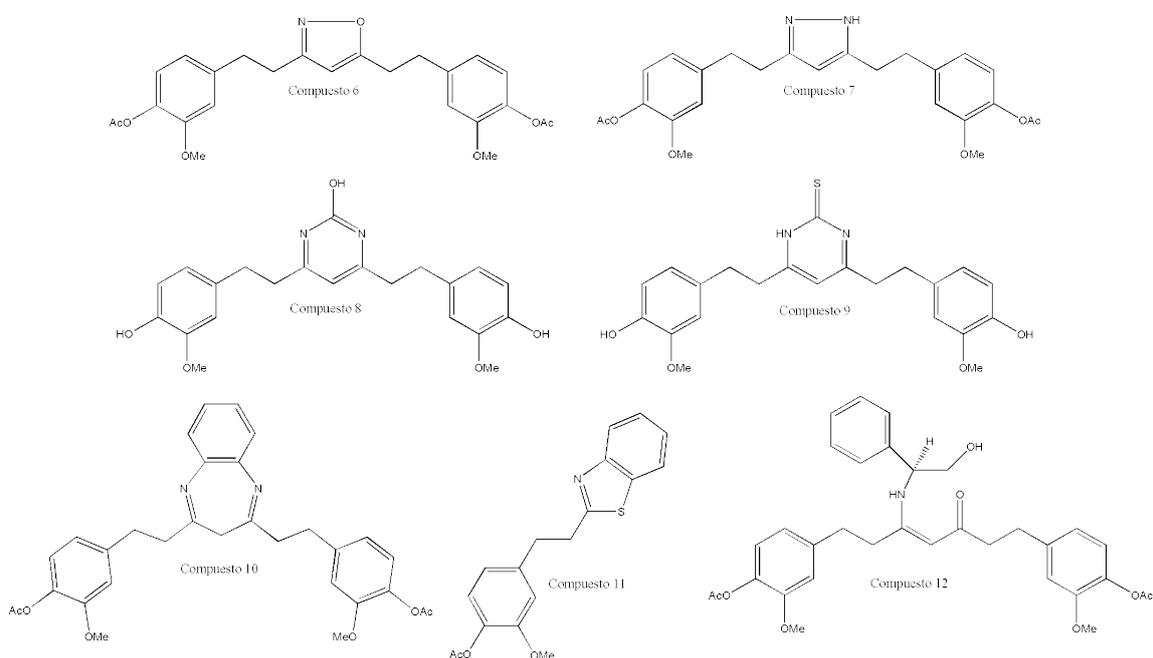
## **5. Metodología**

### **5.1. Superposición de ligandos**

Se realizó una revisión de todos los compuestos reportados como inhibidores de la acetilcolinesterasa, tanto en publicaciones como en patentes hasta abril de 2006, mediante el SciFinder Scholar (American Chemical Society, 2005). Los compuestos fueron agrupados de acuerdo a su estructura básica en 7 categorías: derivados de la 9-aminoacridina, derivados de la huperzina A, derivados de la galantamina, derivados de N-bencilpiperidinas, derivados de la rivastigmina (caracterizados por un fenilcarbamato), derivados cumarínicos y compuestos duales, incorporando las actividades biológicas cuando estas se encontraban reportadas. Tomando como criterio de selección la menor  $CI_{50}$ , junto con reportes de alta selectividad por AChE o la presencia de un segundo mecanismo de acción (por ejemplo, estimulación de receptores nicotínicos) se obtuvo un conjunto de moléculas, mostradas en las Tablas 2.2 y 2.3.

En los casos en que la estructura se encontraba cristalizada en el sitio activo de la enzima, se tomaron dichas coordenadas del Banco de Datos de Proteínas (PDB por sus siglas en inglés). Para los ligandos cuya estructura tridimensional (3D) no ha sido reportada como complejo enzima-ligando en el PDB, se procedió a modificar la estructura base para obtener la estructura del ligando deseado empleando el programa Quanta2000 (QUANTA2000. Version 00.1110. Molecular Simulations Inc). Cuando los ligandos son muy diferentes a la estructura base, la estructura 3D de estos ligandos fue generada con el programa Chem3D (Chem3D Ultra © CambridgeSoft Corporation 1985-2002), y fue optimizada en Gaussian03 (Gaussian 03W Versión 6.0. ©Gaussian, Inc. 1995-03) con el método semiempírico PM3. Se realizaron dinámicas moleculares con Chem3D a 298 K durante 20 ps, guardando las coordenadas cada ps. Se graficaron las energías en función del tiempo para cada dinámica, seleccionando las tres conformaciones de menor energía. Estas se minimizaron nuevamente con Gaussian03, método PM3.

Por otra parte, se eligieron siete derivados de la curcumina cuya síntesis se encuentra reportada en la literatura (Lozada y cols., 2005) (Figura. 5.1). A partir de la estructura cristalográfica de un octavo derivado de la curcumina (Lozada y cols., 2004), se hicieron las modificaciones necesarias con el programa Quanta2000 y se optimizaron las estructuras con Gaussian03, mediante el método semiempírico PM3. Se buscó generar manualmente la mejor superposición posible entre las estructuras de inhibidores de acetilcolinesterasa y los derivados de la curcumina a estudiar, priorizando la coincidencia de los anillos aromáticos y la superposición del mayor número de átomos.



**Figura 5.1** Derivados de curcumina estudiados, tomados de Lozada y cols., 2005. Se conserva la numeración de los compuestos usada en la referencia.

A partir de la estructura cristalográfica del derivado de curcumina utilizado anteriormente, se realizaron las modificaciones necesarias para obtener la estructura de la curcumina mediante el programa Quanta2000. Se optimizó la estructura con Gaussian03, mediante el método semiempírico PM3. Se tomaron del Protein Data Bank trece estructuras cristalográficas de la acetilcolinesterasa con distintos inhibidores, con los siguientes códigos de PDB: 1ACJ, 1ACL, 1DX6, 1E3Q, 1EVE, 1HBJ, 1OCE, 1ODC, 1U65, 1W4L, 1ZGB, 1H22 y 2CEK (ver Tabla 6.1). Mediante el programa Quanta2000, se buscó

superponer manualmente a la curcumina con el inhibidor, buscando la mejor coincidencia de grupos funcionales y el menor número de contactos con los aminoácidos del sitio activo.

## **5.2. Dinámica molecular.**

Se seleccionó una serie de estructuras cristalográficas representativas de la unión enzima-ligando: 2C58 para la unión con el sustrato natural, 1AMN para el estado de transición, 1GPK para un ligando sin carga formal ubicado en el fondo de la hendidura, 1U65 para un ligando sin carga formal unido a lo largo de la hendidura, 1E3Q para ligandos con carga formal a lo largo de la hendidura y 1EVE como el mejor resultado de la superposición manual. En la estructura de 2C58, el ligando cristalográfico fue sustituido, mediante el programa Quanta2000, por las coordenadas de la acetilcolina. Estas se generaron al optimizar la estructura cristalográfica obtenida del CSD (Cambridge Structural Database, Allen, 2002) con el código CHOLC01. Para el análogo del estado de transición, se calcularon las cargas del compuesto con el programa HyperChem (HyperChem 7.01 © Hypercube Inc. 2002) realizando un cálculo puntual con el método PM3. En todos los casos se conservaron las aguas determinadas cristalográficamente situadas en un radio de 3 Å de los residuos de interés (sitios catalítico, de unión al grupo acil, cuaternario, oxianión y sitio periférico) y del ligando mediante el programa DeepView/Swiss-PdbViewer (versión 3.7 © N.Guex 1995-2001) eliminando el resto.

Las estructuras resultantes fueron minimizadas empleando el campo de fuerza CHARMM del programa Quanta2000, y el método de máxima pendiente hasta alcanzar un gradiente de energía de 0.5 kcal/mol; seguida de una segunda minimización con el método de gradiente conjugado hasta alcanzar un gradiente de 0.25 kcal/mol. La estructura resultante fue sometida a una dinámica molecular de 0.9 ps de duración, con 300 pasos de calentamiento, 300 de equilibrio y 300 de simulación. La temperatura de la simulación fue de 300 K. Posteriormente se añadió una esfera de solvatación de 8 Å alrededor de todos los residuos de aminoácidos, repitiéndose las optimizaciones de geometría hasta alcanzar un gradiente

de 0.99 kcal/mol y 0.35 kcal/mol respectivamente. Asimismo, se realizó una segunda dinámica molecular con los mismos parámetros.

Se identificó, mediante el SciFinder Scholar, una molécula que incluyese la función acetoxilo unida a un anillo bencílico en posición *para*, y presentase una actividad biológica distinta a la inhibición de la acetilcolinesterasa para ocuparse como control negativo. Esta es una  $\beta$ -lactama sintética reportada por Tsou y colaboradores en 1993 (Figura 6.2). La molécula se dibujó en GaussView (GaussView 3.0 © Semichem, Inc. 2000-2003.) y se optimizó su estructura con el programa HyperChem en dos pasos con el método PM3: una minimización con el algoritmo de máxima pendiente, y una segunda con el método de gradiente conjugado Polak-Ribier hasta alcanzar un gradiente de fuerza de 0.1 kcal/(Å mol), definido por el programa. Posteriormente se superpuso la estructura resultante, mediante el programa Quanta 2000, con las coordenadas del ligando en el complejo 1EVE. Tomando como base la superposición de la curcumina con el ligando de 1EVE generada en el paso anterior, se realizó la superposición con uno de los derivados de curcumina previamente minimizado. A este nuevo par de complejos se les aplicó el mismo proceso de minimización, dinámica molecular, solvatación, segunda minimización y segunda dinámica molecular.

### 5.3. Cálculo de interacciones

Se calculó la energía de las estructuras resultantes con el campo de fuerza CHARMM del programa Quanta2000. Se determinaron los puentes de hidrógeno con el programa HBAT (Hydrogen Bond Analysis Tools. Desarrollado por G.R. Desiraju, A. Tiwari, S. Kumar Panigrahi, T. Thakur y V. Aparna en la Facultad de Química, Universidad de Hyderabad, India). Al existir una limitante en el número de átomos aceptados por el programa, se eligieron aquellos residuos y moléculas de agua ubicados a 5 Å de los aminoácidos de interés definiendo un sitio activo con 84 aminoácidos. Este mismo sitio activo se utilizó para calcular los contactos proteína-ligando mediante el programa PEARLS (Han y cols.,

2006), que se confirmaron mediante su cálculo con el programa SILVER (SILVER 1.1.1 © CCDC 2004-2006).

#### **5.4. Docking**

Con el programa GOLD (GOLD 3.1.1, Jones y cols.,1995) se realizó el docking o acoplamiento de dos inhibidores de la acetilcolinesterasa de estructura cristalográfica conocida, con el fin de validar el protocolo sugerido por da Silva y colaboradores, 2006. Se minimizaron las estructuras cristalográficas de dos derivados de curcumina previamente reportadas (Lozada y cols., 2004; Lozada y cols., 2006) con el programa HyperChem en dos pasos del método PM3 (mismo procedimiento anterior). Posteriormente se acoplaron la curcumina y sus dos derivados a la estructura de la proteína de 1E3Q que había sido previamente minimizada y sometida a 0.6 ps de dinámica molecular (300 pasos de calentamiento y 300 pasos para equilibrar). Se conservaron las aguas del sitio activo de la estructura cristalográfica seleccionadas como se mencionó previamente. Se exploraron tres opciones para el manejo de las aguas, encendidas, apagadas y alternadas.

Las orientaciones resultantes fueron agrupadas, para cada una de las moléculas, de acuerdo a su ubicación en el sitio activo y a la desviación media cuadrática (RMSD por sus siglas en inglés) entre sí. Para algunos miembros de cada subconjunto se calcularon las energías, los puentes de hidrógeno y los contactos ligando-receptor. Para la curcumina y uno de sus derivados se tomó una estructura de la acetilcolinesterasa con la molécula acoplada a su sitio activo y se sometieron a un proceso de minimización y dinámica molecular, aumentando a 600 pasos (0.6 ps) la fase de simulación. Se seleccionaron las dos conformaciones de menor energía para cada caso, que resultaron ser muy similares entre sí, y se calcularon los puentes de hidrógeno, energía y contactos proteína-ligando.

Puesto que las conformaciones obtenidas no resultaron ser comparables con las estructuras cristalográficas, se repitió el ensayo de acoplamiento con el programa GOLD, esta vez sobre la estructura cristalográfica de la proteína en 1E3Q con sus aguas del sitio activo, a la

que nos referiremos como el molde. Los átomos de hidrógeno se asignaron con el programa PDB2PQR (Dolinski y cols., 2004), y fueron posteriormente minimizados con Quanta2000 mediante el algoritmo de máxima pendiente hasta alcanzar un gradiente de 0.05 kcal/mol. Además de la curcumina y sus dos derivados, se incorporaron un inhibidor de acetilcolinesterasa con buena afinidad y estructura similar al donepezilo (Palin y cols., 2002) y el derivado beta-lactámico elegido como control negativo. Las aguas se manejaron como alternadas y se permitió finalizar el análisis si los últimos 3 resultados se encontraban a 1.5 Å entre sí.

El mejor resultado para cada molécula, de acuerdo a la función de evaluación del programa, GoldScore, se sometió a un proceso de minimización basado en el reportado por Martin-Santamaría y colaboradores en el 2004. Este consistió en:

- minimización de los hidrógenos con 1000 pasos del algoritmo de máxima pendiente,
- minimización de las aguas con 5000 pasos del algoritmo de máxima pendiente,
- minimización de los residuos ubicados en un radio de 6 Å respecto al ligando con 2000 pasos de máxima pendiente seguido de 3000 pasos del algoritmo de gradiente conjugado, y
- minimización de la molécula completa mediante 3000 pasos de algoritmo de máxima pendiente y 2000 pasos de gradiente conjugado.

Adicionalmente se aplicó este proceso a la estructura del molde con su ligando cristalográfico, y a la proteína nativa con el mismo ligando en su sitio activo. Se compararon las estructuras resultantes con el molde, midiendo las RMSD con el programa Swiss-PdbViewer, y los puentes de hidrógeno con el programa HBAT. Se calcularon los valores de pKa para los residuos protonables del sitio activo mediante el programa PROPKA (Li y cols., 2005).

## **5.5. Otros descriptores**

A fin de estudiar las características de la unión de ligandos de distinta naturaleza (con o sin carga permanente, distinta ubicación en el sitio activo) se eligió un conjunto de siete

estructuras cristalográficas: 1ACJ, 1AX9, 1EVE, 1E3Q, 1VOT, 1W4L y 2C58. Se calcularon los valores de pKa, suponiendo un pH de 7, para los residuos de interés del sitio activo utilizando el programa PROPKA. Fueron también calculados los valores de pKa para la proteína sometida a dinámica molecular con los resultados del acoplamiento de curcumina y sus dos derivados; y para las estructuras de la proteína sometidas a minimización tras el acoplamiento. En base a estos valores se calcularon las cargas para cada átomo de la proteína mediante el programa PDB2PQR y se agregaron los hidrógenos con la protonación adecuada.

Los archivos de carga fueron utilizados en el programa GRASP (Nicholls y cols., 1991) para generar superficies de potencial y el cálculo del momento dipolar de las estructuras cristalográficas antes mencionadas. Estos mismos cálculos se realizaron para los ligandos, a fin de estudiar la complementariedad de las superficies de potencial. Para ello se calcularon las cargas mediante el método de carga puntual en Gaussian 03 con la teoría de funcionales de la densidad, utilizando el funcional B3LYP restringido, la base 6-31G y realizando un análisis completo de NBO (natural bonded orbitals, por sus siglas en inglés), tomando los valores obtenidos para las cargas de NBO. Para el mismo conjunto de proteínas se realizó el cálculo de cavidades utilizando el servidor en línea de CASTp (Dundas y cols., 2006), mientras que los volúmenes de los ligandos se calcularon tanto con HyperChem como con ASV (Petitjean, 1994), con los valores de radios de van der Waals establecidos por defecto, en el caso de HyperChem, y propuestos por el autor en el caso de ASV.

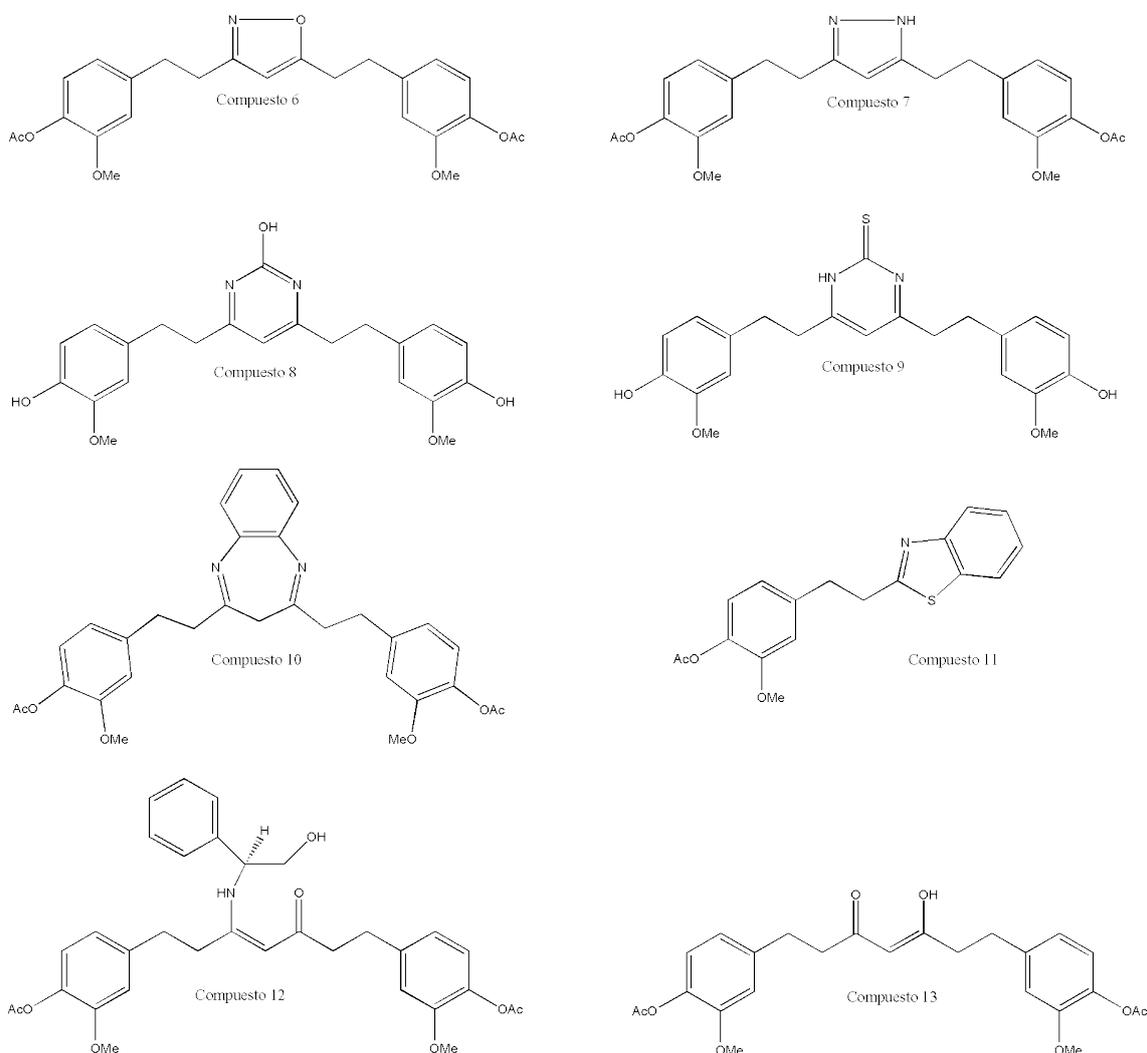
## **6. Resultados y discusión**

### **6.1. Superposición de ligandos**

Inicialmente se buscó definir posibles coincidencias entre las estructuras de los inhibidores de acetilcolinesterasa a estudiar y las de un conjunto de derivados de la curcumina, especialmente en lo referente a la ubicación espacial de sus grupos funcionales. Los inhibidores de acetilcolinesterasa fueron seleccionados a partir del valor de su  $CI_{50}$  y buscando abarcar la mayor diversidad de estructuras posible. Por su parte, se estudió un conjunto de derivados de curcumina sintetizados por un grupo con el que se mantiene una colaboración, buscando determinar su posible utilidad como inhibidores de acetilcolinesterasa. Debido a la gran diversidad de la naturaleza de los inhibidores de acetilcolinesterasa, no fue posible identificar fácilmente un grupo funcional presente en todos los casos, o que pareciera tener una ubicación equivalente. Por ello, el primer acercamiento fue superponer manualmente las estructuras tridimensionales minimizadas de los derivados de curcumina elegidos para este estudio (Figura 6.1), con un conjunto de estructuras tridimensionales de inhibidores de acetilcolinesterasa (mostrados en la Tablas 2.2 y 2.3). Estas últimas fueron ya sea tomadas de los correspondientes archivos de PDB, o generadas manualmente y optimizadas.

Para los derivados de curcumina puede observarse que el grupo -OH ha sido sustituido en algunos casos, por la función acetoxilo, que los dobles enlaces han sido reducidos y se han agregado grupos aromáticos o voluminosos en la parte media de la molécula, que en la mayoría de los casos conserva su simetría. Las estructuras tridimensionales minimizadas resultaron ser casi planas (forman un ángulo de aproximadamente  $8^\circ$  con respecto al plano). Los derivados de tacrina y huperzina, a pesar de ser planos, no pudieron superponerse satisfactoriamente debido a la distribución de los los grupos funcionales y a la diferencia en tamaño. El derivado de galantamina, al tener amplia libertad de torsión por su cadena alquílica, se aleja mucho de la planaridad, lo mismo que el derivado dual de galantamina. El mismo fenómeno se observó para: los derivados del donepezilo debido a la flexibilidad del grupo N-bencilpiperidina, para los derivados de rivastigmina debido a los ángulos

formados por la función carbamato, para el derivado de cumarina, y de manera mucho más notoria, para los derivados duales.



**Figura 6.1** Derivados de curcumina estudiados. Tomados de Lozada y cols., 2004 y Lozada y cols., 2005.

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa analizados mostraron ya sea un menor tamaño que los derivados de curcumina, o flexibilidad en su parte media. La presencia de un tercer grupo aromático en el centro de los compuestos 6-10, y de un sustituyente voluminoso en el compuesto 12 limitan la flexibilidad de las moléculas de manera importante, impidiéndoles alcanzar conformaciones similares a las de los inhibidores conocidos. Esto hizo imposible comparar las estructuras de nuestros derivados con las de los inhibidores. Por ello se decidió estudiar únicamente a la curcumina (que carece de sustituyentes) y forzar la

rotación de sus enlaces. A fin de poder incluir la información del ambiente proteico se realizó únicamente la superposición manual con ligandos cristalizados en el sitio activo de la acetilcolinesterasa, y que con excepción de la tacrina, tuviesen una cadena de longitud considerable entre los dos grupos aromáticos laterales. Sus códigos de PDB son: 1ACJ, 1ACL, 1DX6, 1E3Q, 1EVE, 1HBJ, 1OCE, 1ODC, 1U65, 1W4L, 1ZGB, 1H22 y 2CEK. En la Tabla 6.1 se enlistan los ligandos para estas estructuras, y algunas más utilizadas en este trabajo.

**Tabla 6.1** Estructuras cristalográficas utilizadas

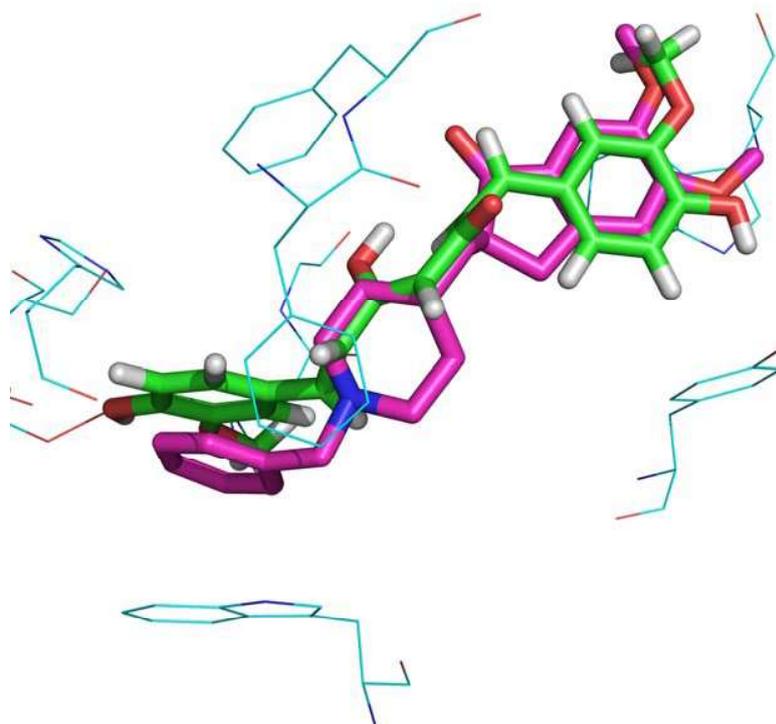
Código PDB	Ligando	Referencia
1ACJ	Tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina)	Harel y cols., 1993
1ACL	Ión decametonio (trimetil-[10-trimetilamoniodecil]azonio)	Harel y cols., 1993
1AMN	<i>m</i> -( <i>N,N,N</i> -trimetilamonio)-2,2,2-trifluoro- 1,1 dihidroxietilbenceno	Harel y cols., 1996
1AX9	Ión edrofonio (etil-[3-hidroxifenil]-dimetil-azonio)	Ravelli y cols., 1998
1DX6	(-) Galantamina ([4aS,6R,8aS]-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-3-metoxi-11-metil-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzacepin-6-ol)	Greenblatt y cols., 1999
1E3Q	BW284C51 ([4-(5-{4-[dimetil-prop-2-enil-amonio]fenil}-3-oxo-pentil)fenil]-dimetil-prop-2-enil-azonio)	Felder y cols., 2002
1EA5		Harel y cols.
1EVE	Aricept (E2020) ([2R]-2-[(1-bencil-4-piperidil)metil]-5,6-dimetoxi-2,3-dihidroin-1-ona)	Kryger y cols., 1999
1GPK	(+) Huperzina A ([5S,9S,11E]-5-amino-11-etiliden-5,6,9,10-tetrahidro-7-metil-5,9-metanocicloocta[b]pidirin-2(1H)-ona)	Dvir y cols., 2002
1H22	(5S)-5-[10-[[[(5S)-2-oxo-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinolin-5-il]amino]decilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-1H-quinolin-2-ona	Wong y cols., 2003
1HBJ	4-amino-5-fluoro-2-metil-3-(3-trifluoroacetilbenciltiometil) quinolina	Doucet-Personeni y cols., 2001
1OCE	MF268 (cis-2,6-dimetilmorfolinoctilcarbamileserolina)	Bartolucci y cols., 1999
1ODC	<i>N'</i> -(1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidroquinolin-4-il)- <i>N</i> -(1,2,3,4,4a,10-hexahidroacridin-9-il)octano-1,8,diamina	Rydberg y cols., 2006
1U65	CPT-11 ([4S]-4-11-dietil-4-hidroxi-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahidro-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-B]quinolin-9-il 1,4'-bipiperidina-1'-carboxilato)	Harel y cols., 2005
1VOT	(-) Huperzina A ([5R,9R,11E]-5-amino-11-etiliden-5,6,9,10-tetrahidro-7-metil-5,9-metanocicloocta[b]pidirin-2(1H)-ona)	Raves y cols., 1997
1W4L	Ión (4AR,6S,8AR)-11-[8-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)octil]-6-hidroxi-3-metoxi-5,6,9,10-tetrahidro-4AH-[1]benzofuro[3A,3,2-EF][2]benzacepin-11-o	Greenblatt y cols., 2004
1ZGB	(5R)-5-[[10-(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-ilamino)decil]amino]-5,6,7,8-tetrahidroquinolin-2(1H)-ona	Haviv y cols., 2005
2C58	Acetilcolina	Colletier y cols., 2006a
2C5F	Ión 4-oxo- <i>N,N,N</i> -trimetilfentaminio	Colletier y cols., 2006a
2CEK	<i>N</i> -[8-(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-iltio)octil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina	Colletier y cols., 2006b

Con la tacrina, al hacer coincidir el anillo aromático con el de la curcumina, se generaron contactos muy desfavorables con F330 y F331, o con F288 según la orientación elegida para la curcumina. Igualmente fue imposible generar una superposición de las moléculas que evitara la formación de numerosos contactos desfavorables con los aminoácidos del sitio activo en las estructuras de 1OCE y 1ODC. Debido a la mayor longitud de la cadena alifática no fue posible lograr la superposición de los grupos aromáticos de curcumina con los ligandos de 1ZGB, 1H22 ni 2CEK (10, 10 y 8 carbonos entre de los grupos aromáticos laterales, respectivamente).

Fue posible superponer la cadena principal de la curcumina sobre la cadena alquílica del decametonio, proponiendo la unión a todo lo largo de la hendidura y formando una interacción de apilamiento con el W279 del sitio periférico, mas no fue posible evitar contactos desfavorables con el W84. Contrariamente, se logró una buena coincidencia de los anillos fenílicos con aquellos del BW284C51, sin embargo debido a las diferencias en longitud de las cadenas centrales, la curcumina no pudo ser orientada a modo de evitar contactos. Para el ligando de 1HBJ se logró una buena superposición de ambos anillos y una adecuada ubicación de la cadena principal, formándose contactos desfavorables con los aminoácidos de la triada catalítica.

Por otro lado, al superponer los anillos fenílicos sobre el derivado dual de galantamina y ajustar la cadena principal, se evitó la formación de contactos desfavorables, no obstante no pudo reproducirse ninguna interacción favorable. Igualmente fue posible hacer coincidir la curcumina con la parte plana de CPT-11, mas esto la ubica demasiado cerca de la boca de la hendidura, imposibilitando su interacción con los sitios de interés. Al superponer uno de los anillos de la curcumina con el bencilo de E2020 (Aricept) y el segundo con la función indanona, se logró la coincidencia de los oxígenos del anillo superior y una buena localización de la cadena a lo largo de la hendidura. Pudieron así reproducirse las interacciones de apilamiento en los sitios cuaternario y periférico, y evitar contactos desfavorables de la cadena central. Se observaron contactos entre los sustituyentes del anillo inferior y los residuos del sitio oxianión, sin embargo, dado el número de

interacciones positivas, se consideró esta la mejor propuesta del modo de unión de la curcumina al sitio activo (Figura 6.2).

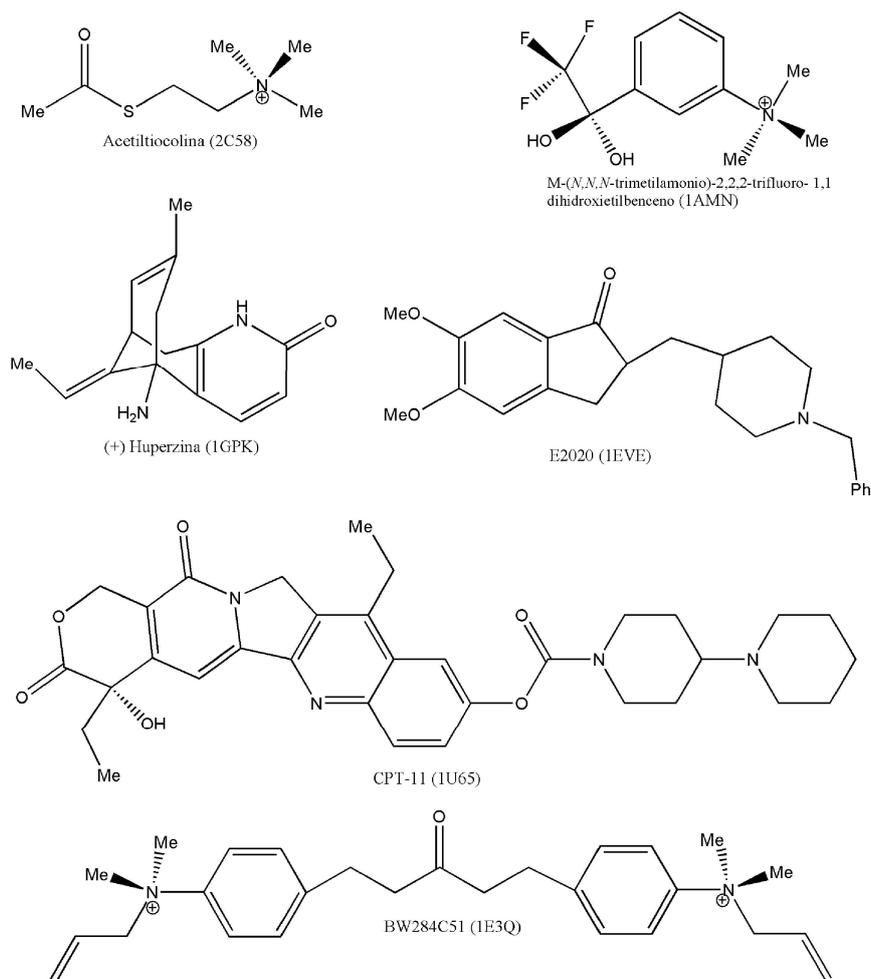


**Figura 6.2** Superposición de curcumina (verde) sobre E2020 (rosa) en el sitio activo de la acetilcolinesterasa

## 6.2. Dinámica molecular

Habiendo confirmado la factibilidad de la unión de la curcumina al sitio activo de la acetilcolinesterasa, y dada la imposibilidad de proponer una orientación que al tiempo de reproducir interacciones positivas no generase contactos negativos con los aminoácidos del sitio activo; se buscó incluir la naturaleza flexible de las proteínas en nuestro análisis mediante la dinámica molecular. Para ello se eligió una serie de complejos enzima-inhibidor que representaran distintas características de los ligandos (Figura 6.3), y que se esperaban nos orientaran sobre el comportamiento de la proteína al formar interacciones que estabilicen a cada tipo de ligando. Se estudió también un compuesto diseñado con una actividad biológica distinta, pero con algunas características de estructura química en común tanto con la curcumina como con E2020 (Figura 6.4), a fin de tener como referencia

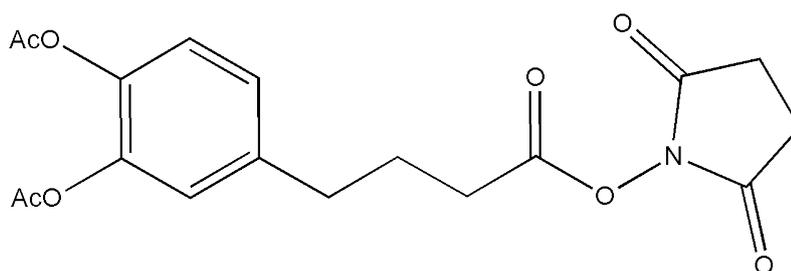
el comportamiento de la proteína ante una molécula sin afinidad por el sitio activo. Finalmente, fue incluida también la estructura de un derivado de curcumina, el compuesto 6, que se esperaba interactuara como un ligando de muy baja afinidad. Todos estos compuestos siguieron el procedimiento descrito en el apartado 5.2 para posteriormente realizar el cálculo de las interacciones que se discutirá más adelante.



**Figura 6.3** Estructura de los ligandos cuyos complejos se sometieron a dinámica molecular y posteriores análisis. El código de PDB correspondiente se muestra entre paréntesis

Las minimizaciones de moléculas pequeñas se realizaron mediante el método semiempírico PM3, mientras que los complejos macromoleculares fueron minimizadas con el campo de fuerza CHARMM. En ambos casos, la optimización de la geometría se realizó en dos pasos, con distintos métodos de primera derivada. El primero es el algoritmo de máxima pendiente, efectivo para minimización inicial de moléculas. El tamaño del paso se calcula en cada

ciclo para ajustarse al valor de energía, pero al no incorporar la información de pasos anteriores, la convergencia es lenta. La segunda etapa de la minimización se realizó con el método de gradiente conjugado, el cual es más efectivo para moléculas cercanas a su mínimo. Al incluir la información de los pasos anteriores para elegir la dirección de la minimización, requiere de menos ciclos y su convergencia es más rápida.



**Figura 6.4** Beta lactama sintética ocupada como control negativo. Tomado de Tsou y cols., 1993.

### 6.3. Acoplamiento sobre proteína relajada

Se buscó comparar el comportamiento del complejo acetilcolinesterasa-curcumina sometido a dinámica molecular, con los datos obtenidos de las dinámicas moleculares de los complejos cristalográficos y del control negativo. Para ello se generó una ubicación inicial de la curcumina mediante acoplamiento con el programa GOLD. Como primer paso se realizó el acoplamiento de la tacrina a la estructura cristalográfica de la proteína a fin de validar el protocolo con una molécula plana. Las 20 estructuras resultantes pueden agruparse en dos conjuntos. El primero incluye al 85% de los resultados y reportó un

promedio de RMSD ( $RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x_i - y_i|^2}$ , donde  $x_i - y_i$  es la distancia entre N átomos

equivalentes. Valores calculados con VMD, Humphrey y cols., 1996) de 0.97 Å entre sí y de 3.0 Å respecto a las coordenadas cristalográficas. El segundo conjunto, que incluye al restante 15% de los resultados, reportó un promedio de RMSD de 3.3 Å respecto a las coordenadas cristalográficas y de 0.44 Å entre sí. Tomando en cuenta que las dimensiones

de la base de la hendidura del sitio activo son de aproximadamente 11 Å x 10 Å x 6 Å, se consideró que se reproduce de manera satisfactoria el modo de unión de la tacrina.

A continuación se realizó el acoplamiento para el ligando BW284C51 (abreviado como BW), que se une a lo largo de la hendidura. El 80% de los resultados presentan desviaciones de 1.95 Å entre sí y de 5 Å con el ligando cristalográfico. La posición del nitrógeno positivo unido al fondo de la hendidura se encuentra bien reproducida, mientras que la cadena alquílica varía en su posición haciendo poco reproducible la ubicación del segundo nitrógeno positivo en el sitio periférico. Únicamente un resultado reproduce adecuadamente la ubicación determinada por cristalografía de la cadena y del grupo aromático en el sitio periférico. Se concluyó que el método es consistente, pues los resultados son muy similares entre sí, y reproduce adecuadamente la ubicación de moléculas aromáticas pero tiene poca probabilidad de reproducir fielmente zonas con mucha flexibilidad, característica que debe de ser tomada en consideración al analizar el resto de los resultados obtenidos.

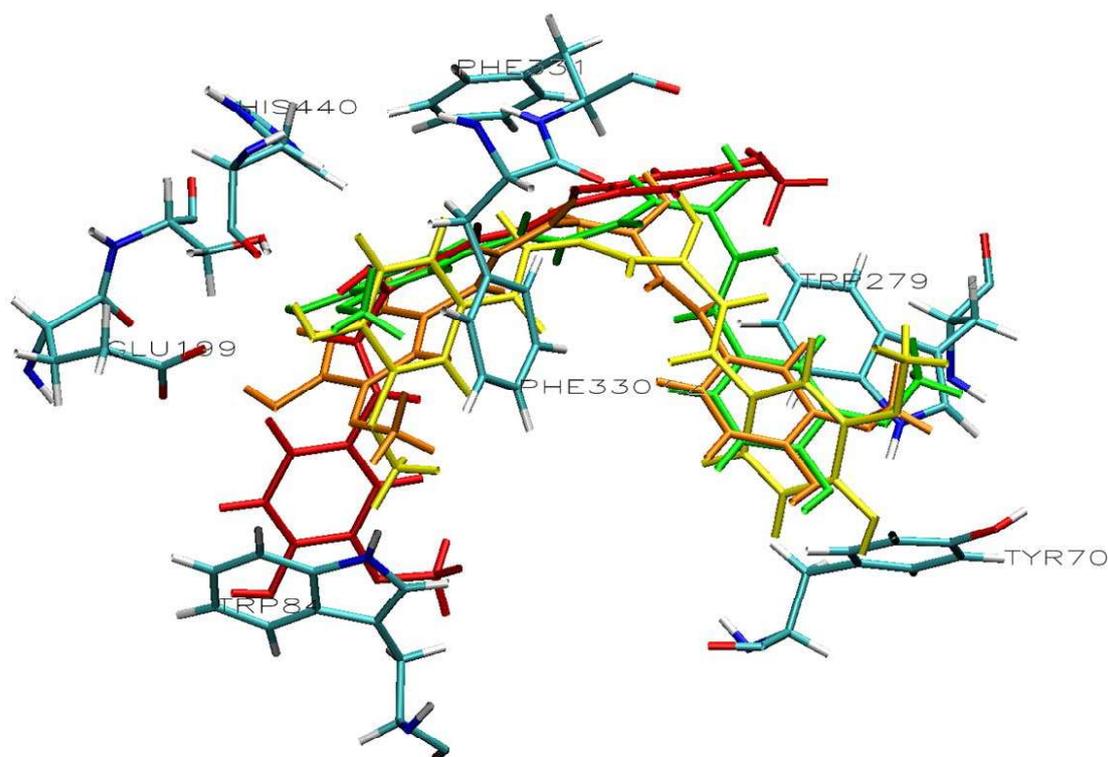
Con la intención de contar con una estructura de la proteína sin las tensiones propias del empacamiento cristalográfico se realizaron los ensayos de acoplamiento en la estructura de la acetilcolinesterasa tomada de 1E3Q, conservando las aguas en el sitio activo. La proteína había sido anteriormente minimizada y sometida a los pasos de calentamiento y equilibrio previos a la dinámica molecular. Los ligandos utilizados fueron la curcumina y sus derivados 6 y 13. El compuesto 13 difiere de la curcumina en la presencia del sustituyente acetoxilo y en la reducción de los enlaces. El compuesto 6 presenta además rigidez en su parte media. Puesto que la ubicación de las aguas en el sitio activo correspondía a la necesaria para optimizar la interacción con el ligando BW, se exploraron las tres opciones que el programa permite para el manejo de las aguas: todas presentes, ninguna presente, o selección automática de las moléculas presentes.

Los resultados obtenidos durante los tres ensayos con la curcumina pudieron ser agrupados en cuatro conjuntos (Tabla 6.2 y Figura 6.5), tomando como primer criterio el que tuvieran una RMSD menor o igual a 3 Å entre sí (de acuerdo a las desviaciones observadas para el

ensayo con la tacrina). Puesto que algunas moléculas podían ser agrupadas en dos conjuntos, se consideró como segundo criterio la orientación de los anillos respecto al sitio activo. Un 11% de los resultados no pudieron ser agrupados en ningún conjunto, por lo que se les dejó fuera del análisis. El mayor porcentaje de resultados muestra al anillo inferior de la curcumina ubicado paralelamente a la F330 y el anillo superior paralelo a W279, lo cual puede indicar que esa sea la orientación del ligando más apropiada. Únicamente el conjunto de resultados 4 ubicó a la curcumina formando interacciones con el W84, en contraste con la orientación de la curcumina obtenida por superposición con E2020, donde aparentemente formaba interacciones tanto con W84 como con W279. La diferencia puede deberse a la limitada rotación de los enlaces conjugados en la curcumina.

**Tabla 6.2** Agrupación de los resultados para el acoplamiento de la curcumina

Conjunto	% de resultados	Orientación
1	20	Paralelo a F331, perpendicular a F330. Paralelo a W279.
2	39	Perpendicular a F331, paralelo a F330. Paralelo a W279.
3	7	Paralelo a F331, perpendicular a F330. Paralelo a W279.
4	23	Paralelo a W84



**Figura 6. 5.** Resultados del acoplamiento para curcumina. El conjunto 1 se muestra en verde, el 2 en amarillo, el 3 en naranja y el 4 en rojo.

El acoplamiento para el compuesto 6 obtuvo resultados mucho más diversos en cuanto a su valor de RMSD. Por ello, el criterio para la formación de conjuntos se amplió a 3.5 Å. Se obtuvieron tres conjuntos, y un 17% de estructuras que no pudieron ser agrupadas (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3** Agrupación de resultados para el acoplamiento del compuesto 6

Conjunto	% de resultados	Orientación
1	13	Anillo inferior perpendicular a F330, el grupo acetoxilo a la altura del W84. Anillo medio paralelo a F331 y anillo superior paralelo a W279.
2	57	Anillo inferior paralelo a W84, anillo medio paralelo a F330 y a la altura de H440. Anillo superior a la altura de Y121
3	13	Anillo inferior perpendicular a W84, anillo medio paralelo a F330, anillo superior paralelo a Y334.

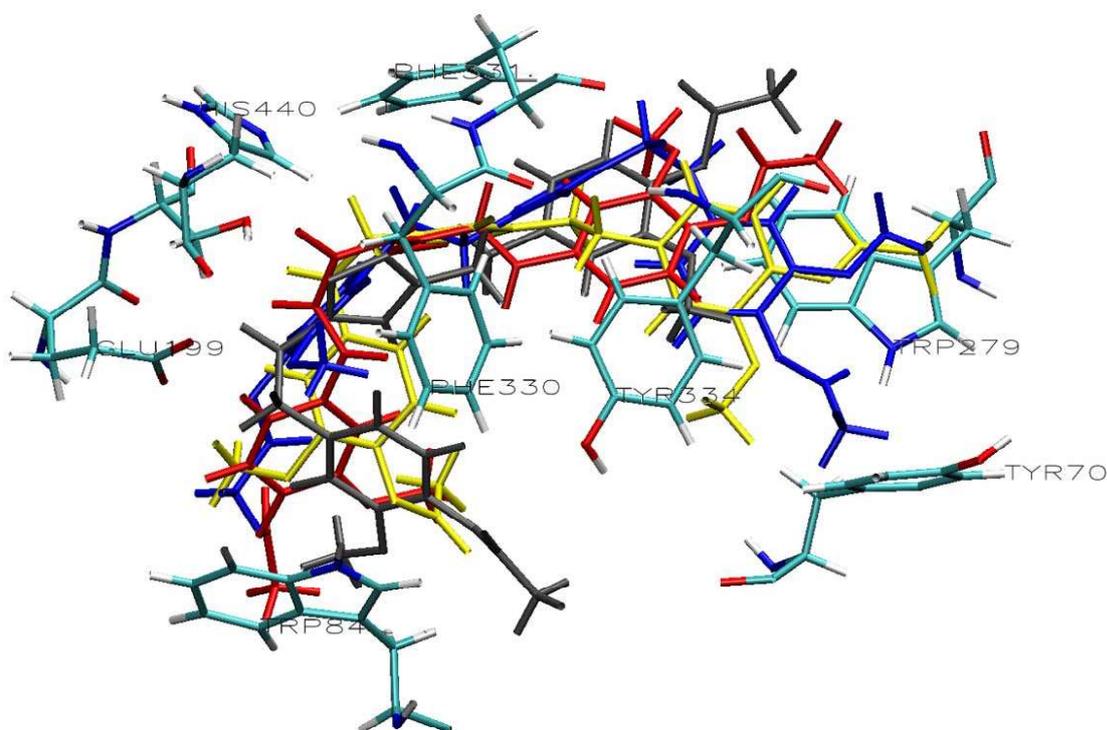
Con este mismo criterio se formaron también tres conjuntos para el compuesto 13, con un 7% de resultados sin ser agrupados (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4** Agrupación de resultados para el acoplamiento del compuesto 13

Conjunto	% de resultados	Orientación
1	65	Anillo inferior paralelo F330, el grupo acetoxilo cercano a W84 y anillo superior paralelo a W279.
2	23	Anillo inferior paralelo a W84, anillo superior perpendicular a W279
3	5	Anillo inferior a la altura de W84 y anillo superior paralelo a Y334.

Al comparar las orientaciones para los distintos ligandos, fue posible crear cuatro grandes grupos que describen la ubicación de curcumina y sus derivados dentro del sitio activo respecto al residuo aromático más cercano (Figura 6.6). Como cabía esperarse, la ubicación de la cadena central mostró alta variabilidad. El primer grupo está formado por los conjuntos 1, 2 y 3 de la curcumina junto con el conjunto 1 del compuesto 6 y el conjunto 1 del compuesto 13. Comprende el 49% del total de los resultados de los tres acoplamientos, abarcando más de la mitad de los resultados tanto para la curcumina como para el compuesto 13. Los rasgos comunes de esta orientación son: ubicación del grupo acetoxilo cerca del W84, anillo inferior a la altura de F330 y anillo superior paralelo a W279. La orientación del grupo hidroxilo para la curcumina y el compuesto 13 es variable, lo mismo que la orientación del grupo acetoxilo del anillo superior de los compuestos 6 y 13. El segundo grupo está formado por los conjuntos número dos tanto del compuesto 6 como del compuesto 13, abarcando el 25% del total de los resultados. Se observa que el anillo inferior es paralelo a W84 y se encuentra a la altura del anillo pirrol, mientras que el anillo superior es perpendicular a W279, pero la distancia entre ellos hace poco probable la

presencia de una interacción. El tercer grupo está formado por el conjunto 3 del compuesto 13 y el conjunto 4 de la curcumina. Suma el 10% de las interacciones totales y se caracteriza porque el anillo inferior se encuentra a la altura del W84 y es paralelo al mismo, mientras que el anillo superior se encuentra a la altura de la Y334. Finalmente, el último grupo está formado por el conjunto 3 del compuesto 6, y representa el 4% de las interacciones totales. En él el anillo inferior es perpendicular al W84 pero se encuentra alejado del mismo, y el anillo superior se encuentra entre Y334 y W279.



**Figura 6.6** Ubicación relativa en el sitio activo de los cuatro posibles modos de unión para curcumina y sus derivados. El grupo 1 se muestra en azul, el 2 en gris, el 3 en rojo y el 4 en amarillo

Las conformaciones obtenidas para los acoplamientos de la curcumina y del compuesto 13 resultaron ser comparables, reflejando la gran similitud entre ambos ligandos y los límites de sensibilidad del método. Los resultados para el compuesto 6 fueron ligeramente distintos, probablemente debido a la presencia de un tercer grupo aromático. Puesto que aproximadamente la mitad del total de los resultados de acoplamiento, así como el 66% de los resultados para curcumina se ubicaron dentro del grupo 1, se eligieron conformaciones de dicho grupo para ser analizadas con más detalle. Debido al parecido ya mencionado

entre los resultados para la curcumina y el compuesto 13, únicamente se realizaron dinámicas moleculares para un resultado de la curcumina y para un resultado del compuesto 6. A fin de permitir que la estructura de la proteína se modificase para interactuar eficientemente con los ligandos, se realizó el proceso de minimización, dinámica molecular, solvatación, nueva minimización y nueva dinámica molecular a estos dos complejos. A partir de los datos generados en la dinámica, se eligieron las dos conformaciones de menor energía para cada ligando. Al compararlos, los complejos de curcumina presentaron una RMSD de la proteína de 0.2 Å entre sí, mismo valor calculado para la ubicación del ligando. Para el compuesto 6 se obtuvo una RMSD de la proteína de 0.31 Å y para las coordenadas del ligando fue de 0.33 Å. Debido a la considerable similitud entre ambas estructuras se realizó el análisis de datos de únicamente una de ellas para cada ligando.

#### **6.4. Cálculo de interacciones para moléculas sometidas a dinámica molecular**

La energía de unión para las estructuras resultantes de la dinámica molecular fue calculada mediante el campo de fuerza CHARMM. Se eliminaron todas las aguas del sitio activo y el valor se obtuvo como:  $E_{\text{unión}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{proteína}} + E_{\text{ligando}})$ . Los valores obtenidos y sus componentes se muestran en la Tabla 6.5, con las siguientes abreviaturas: Ach para la acetilcolina, TS para el análogo del estado de transición (*m*-(*N,N,N*-trimetilamonio)-2,2,2-trifluoro-1,1 dihidroxietilbenceno), Hup para la huperzina, BW para el BW284C51, CPT para el CPT-11, Comp6 para el compuesto 6 ubicado por superposición, Dock Curc para el resultado del acoplamiento de la curcumina y Dock Comp6 para el resultado del acoplamiento del compuesto 6.

La energía de unión calculada presenta valores negativos para la acetilcolina y los inhibidores huperzina y BW, como podía esperarse para un inhibidor que se une con alta afinidad a la proteína. Para el análogo del estado de transición y los inhibidores CPT y E2020 la energía de unión mostró valores positivos. Al saberse que tanto CPT como E2020 son buenos inhibidores de la acetilcolinesterasa, se concluye que el método utilizado no

refleja adecuadamente la información experimental y no tendrá valor predictivo. Esto puede deberse a la ausencia de moléculas de agua durante la medición o a carencias en el campo de fuerza.

**Tabla 6.5** Valores de energía de unión para los complejos enzima-ligando tras dinámica molecular, en kcal/mol

	<b>Total</b>	<b>Enlaces</b>	<b>Angulo</b>	<b>Diedros</b>	<b>Impropia</b>	<b>Lennard-Jones</b>	<b>Electrostático</b>
Ach	-235.52	-28.43	14.58	-10.18	0.04	-21.38	-190.16
TS	421.35	-62.65	10.33	10.50	17.92	-30.26	475.52
Hup	-334.38	-132.30	14.44	-96.83	-31.03	-28.97	-59.69
BW	-632.96	-191.90	35.71	-96.39	-103.48	-292.21	15.32
CPT	263.51	83.61	-38.26	47.33	55.11	-122.95	238.66
E2020	331.88	77.42	40.36	44.05	0.70	-45.35	214.73
Comp6	541.08	115.77	70.52	47.87	-1.05	-265.43	573.40
Negativo	408.68	104.93	47.37	28.89	-1.24	-265.39	467.13
DockCurc	615.53	88.40	60.19	32.34	-0.46	-31.72	466.78
DockComp6	491.06	88.98	66.88	43.56	-9.88	-340.78	642.28

A continuación se calcularon los puentes de hidrógeno en el sitio activo de la acetilcolinesterasa mediante el programa HBAT (ver Anexos). Este tiene la ventaja de incluir el cálculo de puentes de hidrógeno débiles y aromáticos, los cuales son especialmente importantes en las proteínas. Se analizaron únicamente aquellos puentes donde participa el ligando, ya sea como donador o como aceptor. Éstos se enlistan en la Tabla 6.6. Para las moléculas de acetilcolina y del análogo del estado de transición, se reportan las interacciones esperadas con los aminoácidos del sitio oxianión y con S200 y H440 de la triada catalítica, además de los puentes  $\pi$  de este último con los residuos del sitio de unión al grupo acil. La huperzina se une de manera similar al fondo de la hendidura, formando puentes de hidrógeno débiles con los aminoácidos del sitio oxianión y con la histidina catalítica.

Los ligandos BW, CPT y E2020 se unen a todo lo largo de la hendidura, presentando interacciones comunes con E199 del sitio cuaternario en la parte inferior, y con el W279 en la parte superior. El modo de unión, así como un número significativo de puentes de hidrógeno se reprodujeron con respecto a las estructuras cristalográficas de los complejos. Por ello se concluye que los cálculos de dinámica molecular no alteraron de manera

sustancial el modo de unión entre los ligandos y la proteína, haciendo posible la comparación con las interacciones calculadas para los derivados de la curcumina.

La estructura para el compuesto 6 orientada por superposición reproduce únicamente dos interacciones respecto a las formadas por E2020: con E199 en el fondo de la hendidura y con Y121 en la parte media. Adicionalmente el compuesto 6 forma nuevos puentes de hidrógeno con S200 y H440 de la triada catalítica y con F288 y F331 del sitio de unión a acil, mismos que se repiten en la estructura del compuesto 6 generada por acoplamiento. Ambas orientaciones son ligeramente distintas, pues la generada por superposición presenta interacciones con los residuos del sitio oxianión, mientras que aquella generada por acoplamiento se encuentra ligeramente desplazada hacia la boca de la hendidura, pudiendo interactuar con W279. El compuesto usado como control negativo conserva las interacciones con E199 y W279 únicamente, y es interesante señalar que, a pesar de su similitud con el resto de las estructuras, no reporta la formación de ningún puente de hidrógeno aromático. Finalmente, para la estructura de curcumina se observan interacciones con el sitio oxianión, con la S200 del sitio catalítico y con F331 en el sitio de unión al grupo acil del fondo de la hendidura, con Y121 en la parte media y con D72 en la parte superior. A pesar de la buena superposición con E2020, no se reproduce su modo de unión, más bien se conserva la orientación generada durante el acoplamiento.

El programa SILVER permite calcular los contactos y los puentes de hidrógeno para complejos enzima-ligando. Estos se muestran en la Tabla 6.7. En general estos datos confirman las observaciones realizadas a partir de los cálculos de HBAT. Adicionalmente se observa un contacto de la acetilcolina con el F330 del sitio cuaternario, un contacto de la huperzina con la serina catalítica y con F331 del sitio de unión al grupo acil. Tanto BW como CPT y E2020 presentan contactos con el sitio cuaternario. Las estructuras del compuesto 6 presentan también interacciones con el W279 del sitio periférico.

El programa PEARLS (Program for Energetic Analysis of Ligand-Receptor Systems, por sus siglas en inglés) fue utilizado para estimar la energía de interacción entre la proteína y el ligando. Los resultados fueron descartados, pues a pesar de reconocer al ligando (reporta

**Tabla 6.6** Puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos del sitio activo calculados con HBAT

	Y70	Y71	D72	Q74	W84	Y116	G117	G118	G119	Y121	S122	Y130	E199	S200	W279	L282	D285	S286	I287	F288	R289	F290	F330	F331	Y334	H440	G441	H20	Total				
Ach	Fuertes														1															3			
	Débiles																									2				1	5		
	CH...pi																													0			
TS	Fuertes							1							1															2			
	Débiles						2	1		1	2											2				1		1	1	10			
	CH...pi															4									2		2		8				
Hup	Fuertes																													0			
	Débiles						1	3	1		1															2	1	1	1	10			
	CH...pi																													0			
BW	Fuertes																													0			
	Débiles							1		1		2	1								1		1	1					1	9			
	CH...pi														4															4			
CPT	Fuertes																													1			
	Débiles								1			2	2	1	1	1	1	1	1	1			1	2	1	1	2	1	3	16			
	CH...pi														4															5			
E2020	Fuertes																													4	5		
	Débiles																								4					13	19		
	CH...pi																													2			
Comp6	Fuertes																													5	5		
	Débiles																									1	2	2	1	2	9	29	
	CH...pi																													0			
Neg	Fuertes																													4	4		
	Débiles																													3	2	8	22
	CH...pi																														0		
DockCurc	Fuertes																													1	1	6	
	Débiles																														8		
	CH...pi																														2		
DockComp6	Fuertes																													1	2		
	Débiles																														1	2	21
	CH...pi																														3		

**Tabla 6.7** Puentes de hidrógeno y contactos proteína-ligando calculados con SILVER

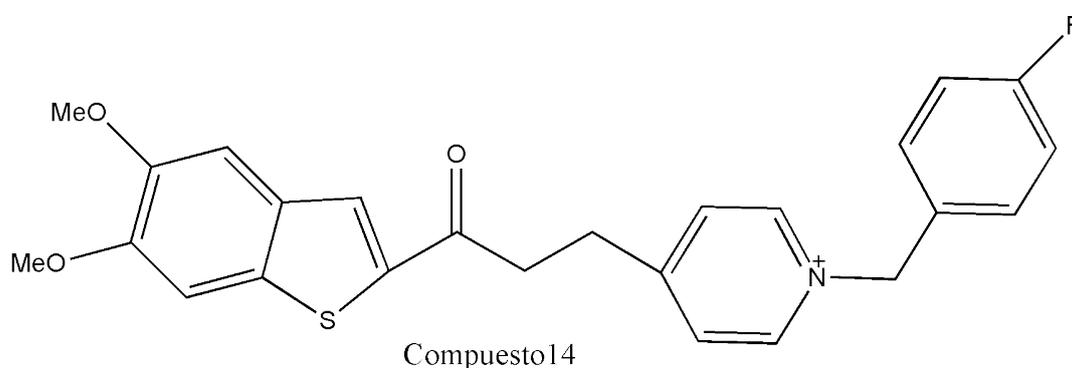
		Y70	V71	D72	Q74	W84	Y116	G117	G118	G119	Y121	S122	G123	Y130	E199	S200	W279	L282	D285	S286	I287	F288	R289	F290	F330	F331	Y334	I439	H440	G441	Y442	I444	Total		
Ach	Contacto		4								2													2				4	4		1		1	17	
	PuenteH		1																															1	
TS	Contacto		4	2		1	3																1	2				1						14	
	PuenteH		1																																1
Hup	Contacto	1	3	3		3	1	1															1	1			3	3						20	
	PuenteH																																		0
BW	Contacto	1	1	2	4	4		1	2	2												1	1	5	2			1						26	
	PuenteH																																		0
CPT	Contacto	2	1	1				2	5	3	3	2	5									1	9	8	5		2							49	
	PuenteH																																		1
E2020	Contacto	3	2		2			1	5														5	1			1							20	
	PuenteH																																		0
Comp6	Contacto	4	3	1			4	1	3													1	1	3	2		2	2						30	
	PuenteH																																		0
Neg	Contacto	1	1		1		2	1	4													1	7				6	4						30	
	PuenteH																																		0
DoekCure	Contacto	3	1		1	2	3		1	4													2	2	1		1	1						22	
	PuenteH																																		0
DoekComp6	Contacto	3	1	1	1	2	1	2	1	1	1												3	3			2	4	4					35	
	PuenteH																																		3

correctamente el número de átomos del mismo) reportó los mismos valores de energía para todas las moléculas estudiadas.

## 6.5. Acoplamiento sobre la estructura cristalográfica

Al comparar las interacciones reportadas en la literatura y calculadas en el paso anterior para el complejo acetilcolinesterasa-E2020 cristalográfico contra el modelo tras la dinámica molecular, fue posible observar que algunas de ellas no se encontraban reproducidas. Esto pudo explicarse por el movimiento de los aminoácidos del sitio activo durante la dinámica, especialmente de las aguas. Igualmente se observó un ligero cambio en las coordenadas del esqueleto de la proteína (RMSD de aproximadamente 1 Å). Puesto que para el cálculo de los descriptores que se analizarán en el siguiente apartado, el conservar el ambiente cercano a los aminoácidos estudiados es muy importante, se buscó que nuestros modelos reprodujeran a las estructuras cristalográficas. Por ello se repitieron los estudios de acoplamiento, en esta ocasión con la estructura cristalográfica de la proteína del complejo de 1E3Q, únicamente agregándole hidrógenos mediante el programa PDB2PQR y definiendo la protonación de los residuos para un pH de 7.

Se realizaron estudios de acoplamiento para el ligando BW como control positivo, para la curcumina, para sus derivados 6 y 13, y para la molécula usada como control negativo. Además se incluyó un derivado del donepezilo con buena actividad biológica reportada y



**Figura 6.7.** Ión 4-[3-(5,6-dimetoxibenzo[b]tien-2-il)-3-oxopropil]-1-[(4-fluorofenil)metil] piridino. Tomado de Palin y cols., 2002.

cuyo modo de interacción con el sitio activo no es conocido, al que nos referiremos como Compuesto 14 (Figura 6.7). Tras haber constatado la consistencia del programa y del protocolo utilizado, se permitió al programa decidir si incluir o no las aguas del sitio activo. Se generaron únicamente 10 resultados para cada ligando y se permitió terminar el proceso si los últimos 3 resultados fuesen muy similares. Como en el caso anterior, para el ligando BW la ubicación del anillo aromático y del nitrógeno positivo en el fondo de la hendidura se reprodujeron adecuadamente, mientras que aquellos ubicados en la parte superior de la hendidura mostraron más variabilidad.

Para curcumina el proceso se detuvo tras generar únicamente cuatro resultados, tres de ellos muy similares entre sí. Los anillos tanto inferior como superior se encuentran aproximadamente en la misma ubicación que para los resultados del acoplamiento anterior, pero la cadena alquílica tiene distinta colocación. Para los compuestos 6 y 13 la posición del anillo inferior es consistente con los resultados del acoplamiento anterior mientras que el resto de la cadena muestra variabilidad. Para el compuesto 14 todos los resultados se encuentran a un promedio de RMSD de 2 Å entre sí, con el anillo bencílico prácticamente en la misma posición en todos los casos, el nitrógeno a un RMSD promedio de 1 Å y tres posibles ubicaciones para el átomo de azufre. El anillo bencílico se ubica paralelo al W84 y a distancia adecuada para formar una interacción mientras que el nitrógeno se localiza cerca de F330. Por su parte el anillo ubicado en la parte superior se localiza paralelo a W279. Por último, el programa no pudo realizar el acoplamiento para el control negativo, reportando la insuficiencia de puntos de correspondencia para definir una conformación tridimensional.

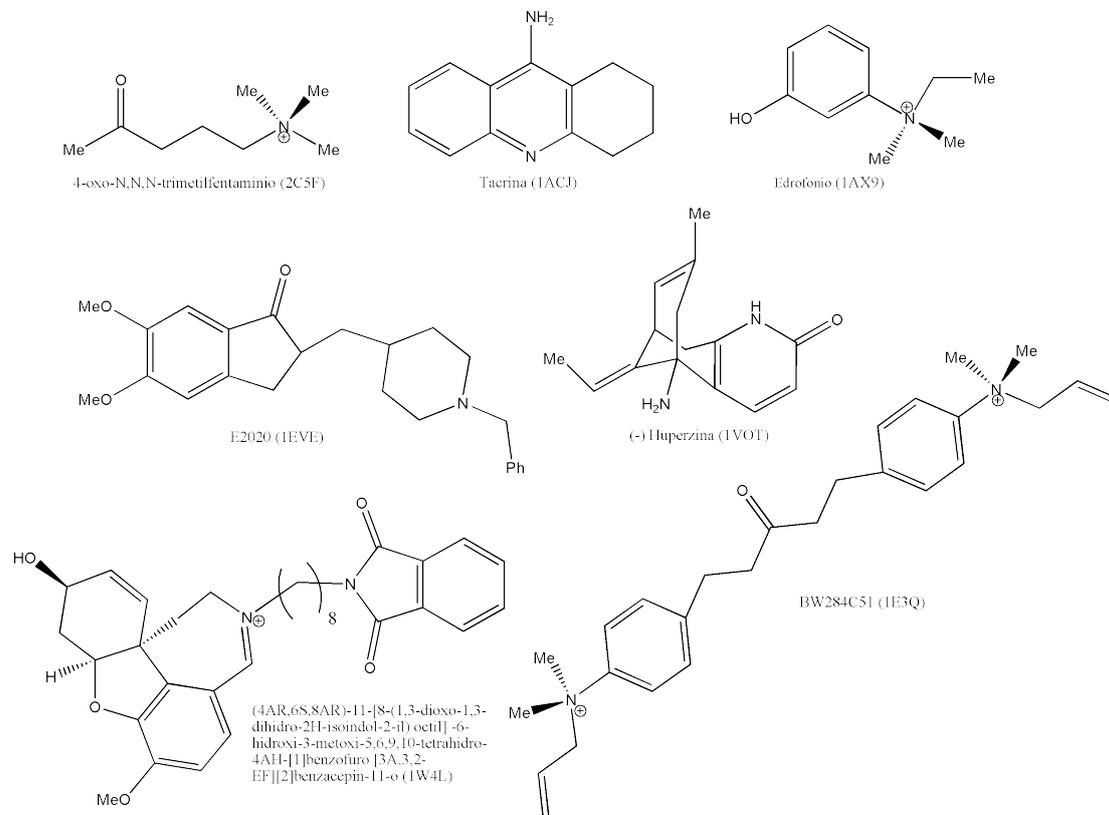
## **6.6. Cálculo de interacciones para moléculas sometidas a minimización**

Dada la gran similitud entre las orientaciones obtenidas para cada ligando durante el ensayo de acoplamiento anterior, se eligieron los mejores resultados para cada molécula de acuerdo a la función de evaluación del programa, GoldScore. Se buscó aplicar un método que permitiese a los residuos del sitio de unión adecuar su conformación para optimizar la unión con sus ligandos, y al mismo tiempo evitar cambios significativos en la estructura de

la proteína. Por ello se eligió el proceso de minimización descrito en el apartado 5.4. También se minimizaron la estructura cristalográfica del complejo proteína-ligando del molde (a fin de constatar el grado de conservación de la estructura), así como la estructura cristalográfica de la proteína nativa (código PDB 1EA5) con el ligando BW colocado en el sitio activo (a fin de constatar el grado de adaptación de la estructura). Adicionalmente, se aplicó el proceso a la estructura cristalográfica del molde con el ligando negativo colocado en el sitio activo, usando las coordenadas generadas por la superposición con E2020 (procedimiento descrito en la sección 5.2). Esto se realizó para observar el comportamiento de la proteína ante una molécula sin afinidad. Las estructuras de los complejos proteína-ligando obtenidas fueron comparadas con la estructura cristalográfica del molde, midiendo las RMSD para todo el esqueleto proteico y para los aminoácidos de interés.

Se calcularon también estas RMSD para un conjunto de estructuras del PDB que representan distintos modos de unión: 2C5F para un análogo de sustrato, 1ACJ para un ligando plano y sin carga formal unido en el fondo de la hendidura, 1AX9 para un ligando con carga formal unido al fondo de la hendidura, 1EVE como el modo de unión potencialmente más parecido al de curcumina, 1VOT para un ligando sin carga formal unido al fondo de la hendidura y 1W4L como un ligando con carga formal al fondo de la hendidura y que se une a todo lo largo (Figura 6.8). 1E3Q, ocupado como molde, representa a un ligando que se une a todo lo largo de la hendidura con cargas formales en los sitios cuaternario y periférico. La finalidad fue identificar las modificaciones esperadas en el sitio activo de acuerdo a la naturaleza del ligando, y definir un rango de RMSD aceptable. Brevemente, los valores de RMSD varían entre 0.1 Å y 1 Å para la mayor parte de los aminoácidos, excepto para E73, G117, W279, R289, F330 y H398, para los que son mayores de 1 Å.

E73 y W279 se encuentran en asas en la parte superior de la hendidura, en contacto con el solvente por lo que su movilidad es esperada. Por su parte, se ha reportado que F330 puede variar entre distintas conformaciones a fin de permitir el paso de moléculas al sitio activo y formar mejores interacciones con los ligandos cuaternarios, contribuyendo a la eficiencia



**Figura 6.8** Estructura de los ligandos cuyos complejos se sometieron a minimización y posteriores análisis. El código de PDB correspondiente de muestra entre paréntesis

catalítica de la enzima (Kryger y cols., 1999). Para G117 la alta RMSD encontrada ante la unión con la huperzina se explica por el movimiento de “flip-flop” mencionado en el apartado 2.3. La H398 se encuentra a aproximadamente a 3 Å del R289, por lo que el cambio de posición de la histidina debe estar relacionado con la variación en la posición de dicha arginina. R289, a pesar de encontrarse en el radio del sitio estudiado, no fue considerado en el análisis pues el programa PDB2PQR, al agregar los hidrógenos y optimizar las estructuras para evitar contactos negativos, cambió la torsión de su grupo sustituyente alejándolo de su posición observada en las estructuras cristalográficas. Esto puede deberse al algoritmo del programa, el cuál optimiza en el primer paso las redes de puentes de hidrógeno que incluyen a las argininas.

A continuación se procedió a medir las RMSD de las estructuras cristalográficas con respecto a sus estructuras minimizadas con el ligando BW, a fin de verificar que el proceso de minimización efectivamente modificaba las posiciones de los aminoácidos del sitio activo para optimizar la unión con el ligando, sin distorsionarlo demasiado. Los valores se muestran en la Tabla 6.8. En la segunda columna se incluyen los valores de RMSD encontrados como normales para las estructuras cristalográficas. En la tercera y cuarta

**Tabla 6.8** RMSD en ángstroms para controles positivos

	Rango aceptable	RMSD respecto a nativa		RMSD respecto a 1E3Q	
		Nat+BW6A	Nat+Bwall	Bw+Bw6A	Bw+Bwall
esqueleto		0.06	2.19	0.09	2.45
proteína		0.15	2.71	0.24	2.79
aa sitio act		0.46	2.73	0.84	3.03
TYR 70	0.79	<b>1.92</b>	<b>4.18</b>	<b>1.53</b>	<b>3.49</b>
ASP 72	0.72	0.27	<b>5.7</b>	0.1	<b>4.7</b>
GLU 73	1.95	0	<b>6.26</b>	0.01	<b>5.61</b>
GLU 82	0.97	0	<b>5.03</b>	0.01	<b>6.24</b>
TRP 84	0.44	0.37	4.16	0.45	<b>4.84</b>
TYR 116	0.22	0.01	<b>0.97</b>	0.03	<b>1.86</b>
GLY 117	1.9	0.06	1.68	1.21	1.89
GLY 118	0.48	0.39	<b>1.37</b>	<b>0.63</b>	<b>1.35</b>
GLY 119	0.46	<b>0.54</b>	<b>1.15</b>	<b>0.72</b>	<b>0.8</b>
TYR 121	0.54	0.2	<b>1.22</b>	0.28	<b>1.75</b>
TYR 130	0.3	0.08	<b>2.16</b>	0.12	<b>1.58</b>
TYR 148	0.2	0	<b>1.28</b>	0	<b>1.07</b>
GLU 199	0.29	<b>0.69</b>	<b>1.47</b>	<b>0.54</b>	<b>1.2</b>
SER 200	0.85	0.14	<b>1.55</b>	0.49	<b>1.72</b>
ALA 201	0.17	0.01	1.91	0.04	<b>1.09</b>
CYS 231	0.4	0	<b>1.51</b>	0	<b>1.62</b>
TRP 233	0.43	0	1.96	0	<b>2.37</b>
TRP 279	1.43	0.4	2.64	1.39	<b>3.47</b>
ASP 285	0.39	0	<b>2.38</b>	0	<b>2.2</b>
PHE 288	0.44	0.03	2.02	0.03	<b>2.54</b>
PHE 290	0.44	0.24	<b>1.47</b>	0.03	<b>1.94</b>
GLU 327	0.62	0	<b>1.49</b>	0	<b>1.51</b>
PHE 330	2.42	0.28	1.59	0.77	1.08
PHE 331	0.8	0.47	1.56	0.36	<b>1.71</b>
TYR 334	0.52	0.49	<b>1.56</b>	<b>2.48</b>	<b>4.35</b>
HIS 398	1.19	0	<b>2.77</b>	0	<b>2.67</b>
HIS 440	0.6	<b>0.74</b>	<b>2.25</b>	<b>1.42</b>	<b>2.05</b>
TYR 442	0.41	0.06	<b>2.07</b>	0.07	<b>2.03</b>
GLU 443	0.37	0	<b>1.51</b>	0	<b>2.06</b>

columnas se muestran los valores de RMSD para la minimización de la estructura nativa con el ligando BW, en los pasos de minimización de un radio de 6 Å y minimización de la estructura completa. En las columnas cinco y seis se muestran los valores de RMSD para la estructura de 1E3Q en ambas etapas de la minimización. Los valores para los aminoácidos estudiados mayores al rango se muestran en negritas.

Es posible observar que para las estructuras completamente minimizadas la mayor parte de los valores quedaron por encima del rango, y que la RMSD para el esqueleto de la proteína y para la proteína completa son mayores de 2 Å. Se consideró que la minimización completa modifica mucho la estructura de la proteína, no cumpliendo con la finalidad de este proceso: la de obtener estructuras comparables con las cristalográficas. Por lo tanto se decidió no analizar los datos de los complejos completamente minimizados y trabajar únicamente con aquellos minimizados a 6 Å del ligando. La posición del ligando para ambos controles varía una RMSD promedio de 7 Å con respecto a la estructura cristalográfica. Presenta la misma ubicación para el nitrógeno y anillo inferior, el carbonilo se encuentra a menos de 1 Å de RMSD mientras que la mayor variación se observa para los grupos que interactúan con el sitio periférico. En este grupo de datos es posible observar que algunos aminoácidos no modificaron su posición, probablemente por encontrarse a más de 6 Å del ligando. Estos son: E73, E82, Y148, C231, W233, D285, E327, H398 y E443. Puesto que la literatura no reporta la participación de ninguno de estos aminoácidos en la formación de interacciones que estabilicen el complejo enzima-ligando, lo mismo que los estudios de dinámica molecular realizados en el apartado 6.4, se consideró que el radio utilizado era suficiente para abarcar los aminoácidos de interés.

Por el contrario, algunos aminoácidos presentan valores de RMSD por encima del rango establecido como aceptable. Esto son: Y70, G118, G119, E199, F331, Y334 y H440. En su mayor parte, es posible correlacionar el cambio de conformación en estos aminoácidos con la formación de interacciones enzima-ligando. Para la estructura cristalográfica del complejo 1E3Q se reporta una interacción aromática entre el anillo en la parte superior de la hendidura y Y334 formado un ángulo de 45° entre sí, contactos con F331 en la parte media, interacciones aromáticas con H440 e interacciones electrostáticas con E199 en el

fondo de la hendidura (Felder y cols., 2002). Además, la estructura cristalográfica de 1E3Q presenta un RMSD de 1.1 Å para G117 y de aproximadamente 0.5 Å para G118 y G119 respectivamente con respecto a la estructura nativa de la proteína. Esto se debe a que el ángulo phi de la G117 se modifica resultando en una nueva orientación para su función carbonilo. Esta se mueve hacia el sustrato, probablemente creando una interacción electrostática con uno de los metilos unidos al nitrógeno positivo. Se concluye que el proceso de minimización demostró poder reproducir el modo de unión del ligando BW a la acetilcolinesterasa, por lo que puede ser usado para predecir las interacciones que potencialmente podría formar curcumina con los aminoácidos del sitio activo.

A continuación se presentan los valores de RMSD para el complejo proteína-control negativo respecto a la estructura cristalográfica de la proteína en 1E3Q (Tabla 6.9). Al analizar los controles positivos se observó que algunos aminoácidos reportaron RMSD superiores al rango observado para las estructuras cristalográficas, por lo que se decidió ocupar estos nuevos valores como cota superior y establecer un nuevo rango aceptable. Los valores por encima de este nuevo rango se muestran en negritas, y se presentan para: W84, G118, G119, Y121, W279, F290 y W334. Para estos aminoácidos se generaron contactos negativos al superponer la molécula, forzando cambios en los ángulos de torsión de los sustituyentes o en el caso de las G117–G119 cambios en el esqueleto proteico. Estos valores pueden considerarse como poco probables de encontrarse para un buen inhibidor, por lo que nos servirán para establecer un criterio de rechazo. En este caso los aminoácidos Y116, Y148, A201, C231, W233 quedaron fuera del radio de minimización. Al igual que para los controles positivos, estos residuos no forman interacciones con los inhibidores reportados, por lo que se confirma que un radio de 6 Å es adecuado para este estudio.

Los valores de RMSD de los complejos de acetilcolinesterasa con el compuesto 14 y con la curcumina con respecto a la estructura cristalográfica de 1E3Q se muestran en la Tabla 6.10. Aquellos valores cuya RMSD es mayor que aquella considerada como dentro del rango aceptable, y por encima del criterio de rechazo establecido en el paso anterior se muestran en negritas. Para el compuesto 14 tal es el caso para W84 y D285. Al analizar la estructura del complejo se observa que el W84 se ubica a modo formar interacciones  $\pi$  con

el anillo *p*-fluoro-bencílico, por lo que se sugiere que esta interacción debe ser considerada como factible en la unión del compuesto 14 con la acetilcolinesterasa. El D285 se encuentra en la parte superior de la hendidura, en contacto con el solvente, por lo que cambio en RMSD puede no deberse a la unión del ligando al sitio activo. Y72 también sufre una modificación en su posición, pero se sugiere que esta se debe al movimiento de Y334 para interactuar con el compuesto 14.

**Tabla 6.9** RMSD en ángstroms para control negativo

	Rango cristalográfico	Rango controles	RMSD-1E3Q BW+Neg6A
esqueleto			0.11
proteína			0.28
aa sitio act			0.82
TYR 70	0.79	1.92	0.94
ASP 72	0.72	0.72	0.52
GLU 73	1.95	1.95	0.06
GLU 82	0.97	0.97	0.01
TRP 84	0.44	0.45	<b>0.58</b>
TYR 116	0.22	0.22	0
GLY 117	1.9	1.9	0.93
GLY 118	0.48	0.63	<b>0.76</b>
GLY 119	0.46	0.72	<b>1.67</b>
TYR 121	0.54	0.54	<b>1.06</b>
TYR 130	0.3	0.3	0.01
TYR 148	0.2	0.2	0
GLU 199	0.29	0.69	0.4
SER 200	0.85	0.85	0.77
ALA 201	0.17	0.17	0
CYS 231	0.4	0.4	0
TRP 233	0.43	0.43	0
TRP 279	1.43	1.43	<b>1.96</b>
ASP 285	0.39	0.39	0.01
PHE 288	0.44	0.44	0.02
PHE 290	0.44	0.44	<b>0.68</b>
GLU 327	0.62	0.62	0.01
PHE 330	2.42	2.42	0.62
PHE 331	0.8	0.8	0.08
TYR 334	0.52	2.48	<b>2.53</b>
HIS 398	1.19	1.19	1.16
HIS 440	0.6	1.42	0.96
TYR 442	0.41	0.41	0.08
GLU 443	0.37	0.37	0.01

**Tabla 6.10** RMSD en ángstroms para moléculas de prueba

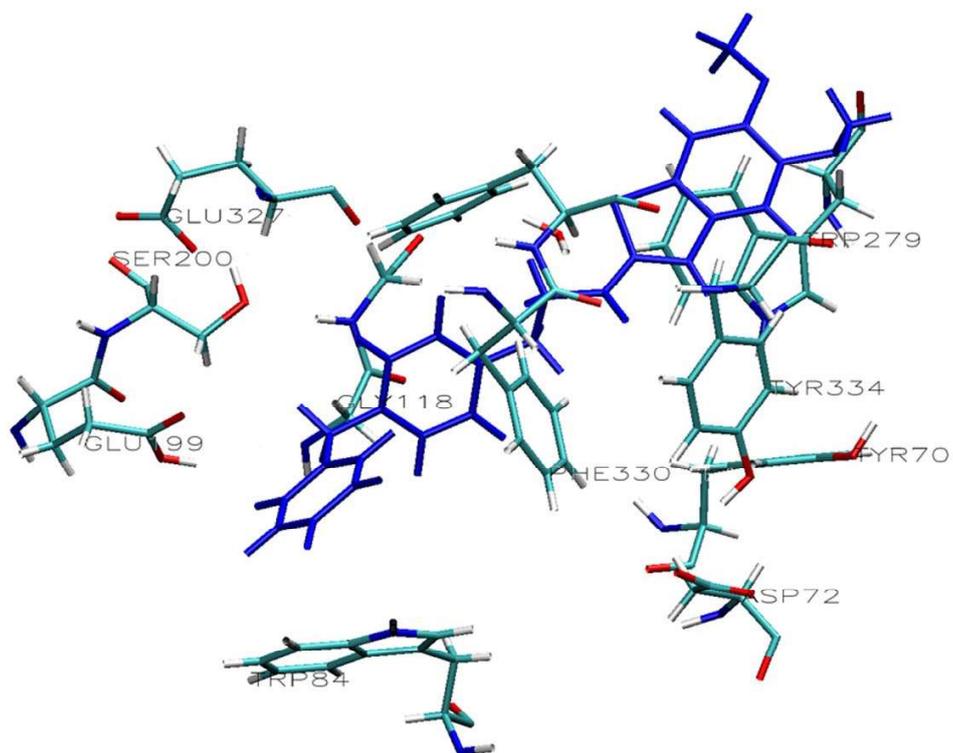
	Rango aceptable	RMSD-1E3Q	
		BW+C14	BW+curc
esqueleto		0.11	0.08
proteína		0.19	0.18
aa sitio act		0.63	0.65
TYR 70	1.92	0	0.33
ASP 72	0.72	0.44	0.72
GLU 73	1.95	0	0.01
GLU 82	0.97	0	0.02
TRP 84	0.45	<b>0.66</b>	<b>0.52</b>
TYR 116	0.22	0	0.04
GLY 117	1.9	1.03	1.17
GLY 118	0.63	0.47	0.58
GLY 119	0.72	0.16	0.05
TYR 121	0.54	0.08	0.48
TYR 130	0.3	0.02	0.18
TYR 148	0.2	0	0
GLU 199	0.69	0.17	0.39
SER 200	0.85	0.3	0.48
ALA 201	0.17	0	0
CYS 231	0.4	0	0
TRP 233	0.43	0	0
TRP 279	1.43	0.07	1.42
ASP 285	0.39	<b>0.92</b>	0.01
PHE 288	0.44	0.18	0.02
PHE 290	0.44	0.11	0.02
GLU 327	0.62	0	0
PHE 330	2.42	0.4	0.91
PHE 331	0.8	0.31	0.04
TYR 334	2.48	1.91	0.6
HIS 398	1.19	0	0
HIS 440	1.42	0.3	1.19
TYR 442	0.41	0.18	0.09
GLU 443	0.37	0	0

El resto de los aminoácidos que se propone modifican su ubicación para interactuar con el compuesto 14 son: G117 y G118 en el sitio oxianión, S200 en sitio catalítico, los residuos del sitio de unión a acil, y F330 y E199 en el sitio cuaternario. Los aminoácidos Y70, E73, E82, Y116, Y148, A201, C231, W233, E327, H398 y E443 se ubicaron fuera del radio de minimización, y como en los casos anteriores es importante mencionar que, con excepción de Y70, no se excluyeron aminoácidos que formen interacciones importantes con los

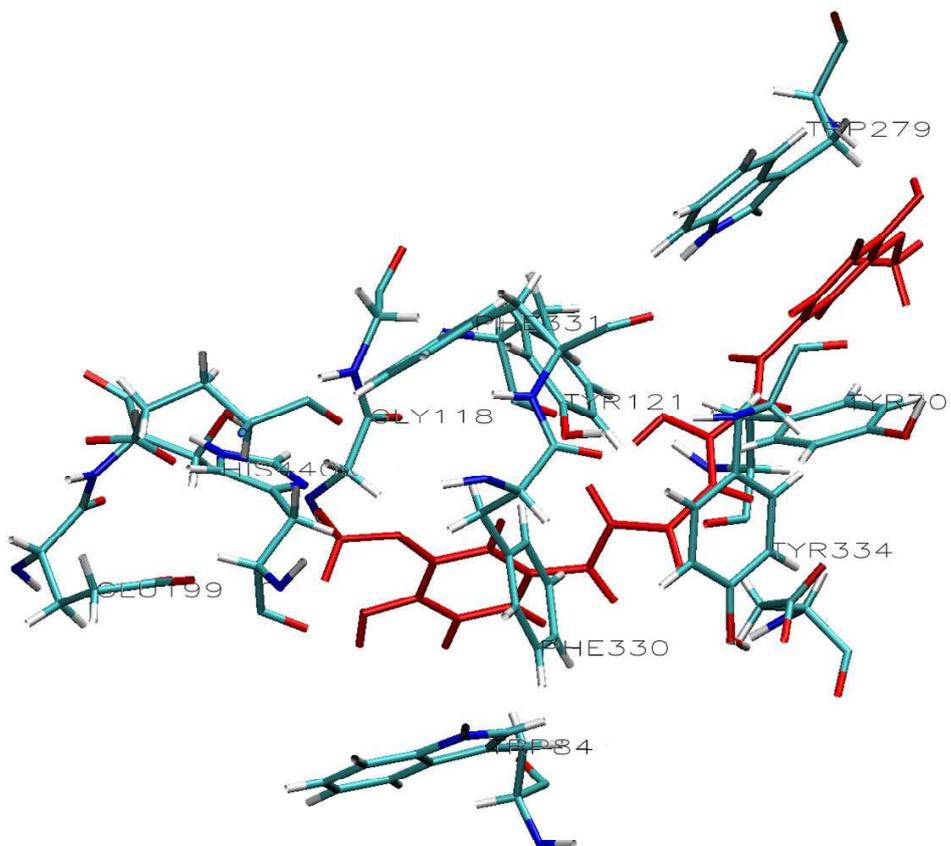
inhibidores. Como se muestra en la Figura 6.9, el compuesto 14 se une a todo lo largo de la hendidura, interactuando con W279 de manera similar a la que lo hace BW, sin formar interacciones con Y70.

Para la curcumina únicamente W84 tiene una RMSD por encima del criterio de rechazo. En la Figura 6.10 puede observarse que este aminoácido forma una interacción de apilamiento con el anillo inferior, por lo que en este caso también se sugiere que esta interacción es factible. Otros aminoácidos que modifican su ubicación para interactuar con la curcumina son: W279, Y70 y Y334 en la parte superior de la hendidura, Y121 en la parte media, G117 y G118 en el sitio oxianión, E199 en el sitio cuaternario y S200 e H440 en el sitio catalítico. F330 también presenta un cambio de RMSD más no resulta evidente el efecto que esto tiene en la unión con curcumina.

Con el programa HBAT se calcularon los puentes de hidrógeno para el conjunto de estructuras cristalográficas mencionadas anteriormente. Con el fin de comparar únicamente aquellos presentes en el sitio activo y que forman parte de redes de puentes de hidrógeno mediadas por moléculas de agua, se eligió un conjunto de aminoácidos de interés (Y70, D72, W84, G118, G119, E199, S200, A201, C231, W233, W279, F299, F290, F300, F331, E327 e H440), analizando los puentes de hidrógeno formados entre sí, con el ligando y con moléculas de agua. Un resumen de estos puentes se muestra en la Tabla 6.11. Como puede verse existe variabilidad en el número total de puentes encontrados para cada estructura. Algunas interacciones se repiten en todos los casos, indicando interacciones independientes de la unión del ligando. Estas son 57, el 31% de los puentes calculados para la estructura nativa. Para el análogo de sustrato, se conservan un 80% de los puentes de hidrógeno observados en la estructura nativa, el 75% de los puentes débiles y el 83% de los puentes fuertes. Esto es indicativo de muy pocos cambios en el ambiente de la hendidura ante la unión del sustrato. Se esperaría que los ligandos con cargas formales positivas interactúen de manera similar con el sitio activo. La comparación indica que las estructuras 1AX9, 1E3Q y 1W4L conservan el 44% de los puentes de hidrógeno presentes en la estructura nativa (56% fuertes, 35% débiles), confirmando lo anterior. Lo mismo es cierto



**Figura 6.9** Estructura del compuesto 14 (en azul) en el sitio activo de la acetilcolinesterasa



**Figura 6.10** Estructura del curcumina (en rojo) en el sitio activo de la acetilcolinesterasa.

para 1ACJ, 1EVE y 1VOT; que conservan el 47% de las interacciones (43% fuertes, 52% débiles).

Como una segunda manera de validar el proceso de minimización descrito en la sección 5.4, se compararon los puentes de hidrógeno de los complejos usados como controles positivos con los de las estructuras cristalográficas usadas como molde en cada caso. Para la estructura de la acetilcolinesterasa nativa con el ligando BW en el sitio activo, se observó que se conservan un 60.5% de los puentes de hidrógeno (55% fuertes, 64.5% débiles), indicando pocas modificaciones en el sitio activo como consecuencia de la minimización. Por otro lado, para la estructura de 1E3Q se conservaron un 70% de los puentes (72% fuertes, 68% débiles), demostrando que la minimización si modifica las interacciones presentes en las estructuras cristalográficas, no pudiéndolas conservar en un 100%. Es relevante mencionar que al comparar los puentes de hidrógeno entre ambos controles positivos, la identidad fue del 79% (79% fuertes, 78% débiles), indicando la consistencia del método.

Para la estructura utilizada como control negativo se conservaron el 67% de los puentes de hidrógeno (85% fuertes, 55% débiles) con respecto a su molde. Este porcentaje fue mucho mayor a lo esperado tras haber analizado las RMSD de los aminoácidos del sitio activo, pues estas si presentaron variabilidad. Al analizar la conservación de los puentes de hidrógeno separando los aminoácidos con RMSD alta y baja pudo observarse que los aminoácidos con poca variabilidad conservan el 68% de los puentes de hidrógeno (86% fuertes, 57% débiles) mientras que aquellos con alta variabilidad conservan prácticamente el mismo porcentaje (67%, dividido en 84% fuertes y 52% débiles). Por ello debe concluirse que la conservación de puentes de hidrógeno no es un criterio adecuado para discriminar la unión de compuestos con o sin afinidad por el sitio activo.

Se hace necesario, entonces, analizar más detenidamente la naturaleza de los puentes de hidrógeno formados por los aminoácidos del sitio activo con el ligando. Un resumen se muestra en la Tabla 6.12. La tacrina se une al fondo de la hendidura interactuando con

**Tabla 6.11.** Puentes de hidrógeno calculados con HBAT para estructuras cristalográficas

	1EA5		1ACJ		1AX9		1EVE		1VOT		1W4L		1E3Q		2C5F	
	Débiles	Fuertes														
Y70	7	3	4	3	2	2	6	5	2	2	7	4	3	1	8	6
D72	9	7	10	5	7	6	7	8	8	8	11	9	7	7	11	8
W84	11	7	12	8	10	9	8	8	7	6	10	10	8	8	10	8
G118	3	6	3	5	3	6	3	6	3	7	2	9	3	5	4	6
G119	4	8	4	5	4	5	3	6	6	6	3	6	2	3	4	5
E199	7	7	11	6	9	8	10	6	8	7	7	6	8	2	8	5
S200	12	5	8	5	8	5	10	4	9	5	9	4	7	4	9	3
A201	6	4	2	4	3	5	7	5	6	7	4	4	2	4	4	4
C231	2	3	5	2	3	4	2	4	1	2	2	3	2	3	3	4
W233	9	3	8	4	9	5	6	5	5	3	7	4	9	4	9	5
W279	4	2	1	1	2	1	5	3	2	1	1	0	3	1	6	4
F288	8	2	5	2	5	2	7	2	6	2	7	2	6	1	10	3
F290	2	0	3	3	3	4	3	2	3	4	2	1	6	2	4	2
E327	9	5	9	4	3	7	8	7	8	7	10	8	5	6	7	7
F330	3	3	3	2	5	4	6	3	3	3	6	3	4	3	6	5
F331	7	4	5	4	5	4	8	5	3	4	7	4	3	4	6	6
H440	7	3	8	1	7	3	10	3	9	2	9	2	7	1	10	5
Total	110	72	101	64	88	80	109	82	89	76	104	79	85	59	119	86
	182		165		168		191		165		183		144		205	

**Tabla 6.12** Puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos del sitio activo, calculados por HBAT

	Y70	D72	W84	Y116	G117	G118	G119	Y121	Y130	E199	S200	A201	W279	I287	R289	F290	F330	F331	Y334	H440	G441	H2O	Total		
1ACJ																									
	Fuertes																							1	1
	Débiles	1						2											1	1				2	7
	CH...pi																								0
1AX9	Fuertes																								0
	Débiles			1		1	1										1		2				1	7	7
	CH...pi																								0
1EVE	Fuertes																								2
	Débiles			2		3										1	1		1				10	19	19
	CH...pi								2																2
1VOT	Fuertes																								6
	Débiles			1		1	1	1											1				1	7	7
	CH...pi																								0
1W4L	Fuertes																								6
	Débiles	1	1		1	4		1									1		1				5	6	6
	CH...pi																								2
1E3Q	Fuertes																								0
	Débiles	1	1		1	2		2								1			1				2	11	11
	CH...pi																								3
2C5F	Fuertes																								6
	Débiles	1	1		1	2		1	1	1									1				13	20	20
	CH...pi																								0
Neg	Fuertes																								2
	Débiles	1				2									1	2	2	2					2	2	10
	CH...pi																								2
Comp14	Fuertes	1																							1
	Débiles	1													2	1	1	1				1			11
	CH...pi																								0
Curc	Fuertes																		1						5
	Débiles	1																				1			3
	CH...pi																								4

H440, E199, W84 y Y334. Únicamente forma un puente de hidrógeno tradicional, a través de una molécula de agua, con E199. El edrofonio interactúa con E199, S200, F331 y H440 en el fondo de la hendidura, y con Y121 en la parte media. A pesar de que está reportado en la literatura, el puente con G119 no es detectado. Para E2020 las interacciones con Y121, E199 y W279 coinciden con las calculadas para el complejo sometido a dinámica molecular. Adicionalmente se observan puentes de hidrógeno débiles con R289 y F290 en el sitio de unión al grupo acil.

Para la (-) huperzina A se observa que las interacciones son ligeramente distintas respecto a la (+) huperzina A, estudiada en el complejo sometido a dinámica molecular. Se mantienen los puentes con Y116 y H440, formándose puentes de hidrógeno con Y130 y con G117 a través de moléculas de agua, y puentes débiles con Y121. Para el inhibidor dual de galantamina se observan interacciones con S200, H440 y F331 en el fondo de la hendidura, y con Y70 y W279 en el sitio periférico. Se forman puentes mediados por moléculas de agua con G117, Y121 y Y130. Para BW vuelven a observarse las interacciones con Y121, E199, W279 y F290 al igual que para la estructura tras dinámica molecular. Además se observa la formación de un puente con la G117 en vez de con la G118. Finalmente, el análogo de sustrato estudiado en esta ocasión se encuentra unido covalentemente a la S200, por lo tanto se observan interacciones con la G119, E199 y A201.

El control negativo no forma ningún puente de hidrógeno fuerte, a pesar de tener varios posibles donadores o aceptores. Al igual que para el modelo generado por dinámica molecular interactúa con W84 y F330 en el sitio oxianión, con F290 en el sitio de unión a acil, y con W279 en el sitio periférico. Además forma puentes débiles con Y121 y F331. La única característica distintiva de este complejo es la ausencia de una molécula de agua altamente conservada en el sitio de unión a acil, y de manera similar al ligando dual de galantamina no interactúa con E199. Las interacciones formadas no reproducen las de ningún otro ligando, no pudiendo establecer una comparación. El compuesto 14 forma puentes de hidrógeno con W84, E199 y F330 en el sitio cuaternario, con F290 en el sitio de unión a acil y con G118 en el sitio oxianión. A pesar de unirse a todo lo largo de la hendidura no interactúa con el sitio periférico. Por último se observan nuevamente las

interacciones de curcumina con D72, Y121 y H440, además de la presencia de puentes de hidrógeno mediados por agua con D72 y Y334 y de interacciones  $\pi$  con W279. A partir de estos datos es posible proponer un modo de unión de curcumina con la acetilcolinesterasa, y sugerir posibles modificaciones a la molécula para aumentar el número de interacciones y con ello su afinidad. El único dato que podría sugerirnos la falta de afinidad del compuesto negativo por la acetilcolinesterasa es la interrupción de la red de puentes de hidrógeno formados por aguas en el sitio activo (Koellner y cols., 2000) y la ausencia de puentes de hidrógeno fuertes entre el agua y la molécula.

## 6.7 Otros descriptores

Puesto que un cambio de conformación en una proteína modifica los valores de pKa de sus aminoácidos, se estudiaron los valores de pKa de los residuos del sitio activo de los complejos proteína-inhibidor usados en la sección anterior. Se buscó la existencia de una relación entre el modo de unión de un ligando y un conjunto de valores de pKa, a fin de ayudar en la predicción de interacciones entre la acetilcolinesterasa y un posible inhibidor. Se utilizó el programa PROPKA para la predicción de los valores de pKa. Puesto que el método no posee parámetros para poder incluir a los ligandos en este cálculo, las diferencias observadas se deben únicamente al cambio de conformación del sitio activo inducido por el ligando. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.13. Se observan cambios significativos en los valores de pKa solamente para algunos aminoácidos. Tomando como base los valores para la estructura nativa, se observan cambios de 0.5 unidades de pKa o mayores para los aminoácidos Y70, E199, C231, E327, H440 y E443. Suponiendo pH igual a 7 la protonación de los residuos en todas las estructuras será la misma excepto para E443. Este aminoácido, al igual que C231, no se encuentra en la superficie de la cavidad, por lo que sus cambios deberán reflejar los efectos a distancia por la unión del ligando.

**Tabla 6.13** Valores de pKa para los aminoácidos del sitio activo

	nativa	1ACJ	1AX9	1EVE	1VOT	1W4L	1E3Q	2C5F
TYR 70	10.55	10.06	10.31	10.62	10.37	<b>9.85</b>	<b>9.9</b>	10.82
ASP 72	3.05	3.17	3.1	3.16	3.36	2.82	3	3.11
GLU 73	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.71
GLU 82	3.83	3.65	4.12	3.98	3.96	3.93	4.16	3.88
TYR 116	12.56	12.62	12.73	12.66	12.73	12.37	12.6	12.69
TYR 121	12.62	12.56	12.69	12.39	12.81	12.5	12.36	12.6
TYR 130	12.94	13.05	13.09	13.15	13.18	12.96	12.98	13.01
TYR 148	15	14.99	15.3	14.79	14.91	14.75	14.72	15.04
GLU 199	10.83	<b>10.27</b>	<b>9.55</b>	10.8	10.82	10.7	<b>8.5</b>	10.78
CYS 231	8.77	11.7	9.31	10.58	10.4	9.2	8.61	9.12
ASP 285	3.94	3.92	3.93	3.94	3.93	3.94	3.88	3.93
GLU 327	3.48	3.59	3.93	3.77	<b>3.99</b>	3.72	3.27	3.55
TYR 334	14	14.03	14.28	14.19	14.09	13.96	14.04	14.21
HIS 398	-1	-1.13	-1.39	-0.81	-1.39	-1.01	-0.94	-0.71
HIS 440	4.3	4.26	<b>6.61</b>	3.95	<b>3.77</b>	4.11	<b>6.28</b>	4.35
TYR 442	12.77	13.14	12.76	12.8	12.9	12.97	13.11	12.89
GLU 443	7.02	7.25	7.26	7.01	<b>6.45</b>	6.92	6.59	<b>7.64</b>

El valor de pKa para Y70 disminuye para las estructuras de la acetilcolinesterasa unida al ligando dual de galantamina y a BW. Ambos forman puentes de hidrógeno aromáticos con este ligando, sin embargo no es evidente qué origina la modificación en el ambiente ya que para BW el aminoácido prácticamente no se mueve. En el caso de E199 el pKa disminuye para la tacrina, el edrofonio y BW. El cambio puede relacionarse con la presencia de una carga positiva en el sitio cuaternario (suponiendo la amina del tacrina protonada), pero el análogo del sustrato, 2C5F, tiene una carga en la misma posición y su valor de pKa varía muy poco. La formación de puentes de hidrógeno con el ligando o a través de moléculas de agua tampoco explica este fenómeno. Para E327 únicamente existe una variación notable para la huperzina. Al formar parte de la triada catalítica E327 forma un puente de hidrógeno con H440 y lo estabiliza mediante interacciones electrostáticas. El cambio en su valor de pKa puede deberse a un cambio en H440. Para la H440 el pKa disminuye ligeramente en el complejo con la huperzina y aumenta más drásticamente con el ión edrofonio y con BW. Puede nuevamente relacionarse con la presencia de una carga positiva cercana que afectaría el ambiente electrostático aumentando el pKa, mientras que para la huperzina la interacción con un doble enlace lo disminuiría. Finalmente para la huperzina y el análogo de sustrato de observan cambios en los valores de pKa de E443, pero estos son signo opuesto.

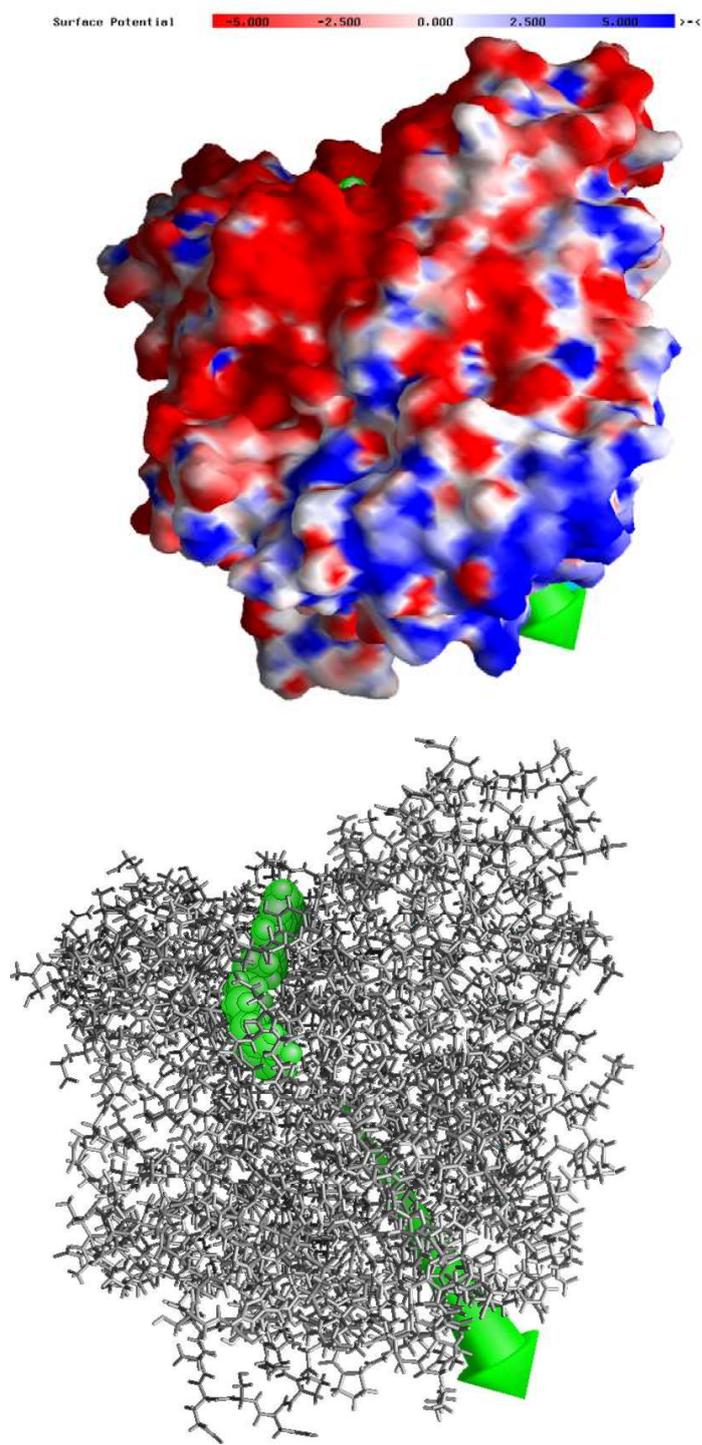
Comparando los valores de pKa calculados para las estructuras cristalográficas contra aquellos calculados para los complejos minimizados (ver Tabla 6.14) se observan cambios en los valores de pKa incluso para aquellos residuos que quedaron fuera del radio de minimización, indicando sensibilidad del método para detectar modificaciones el ambiente de un aminoácido. Para el compuesto 14 se presentan cambios significativos en los valores de pKa para Y70, E199 y H440. Esto puede indicar que el compuesto 14 comparte características con BW generando los mismos efectos o que la minimización no fue lo suficientemente extensa para permitir el cambio en el ambiente del sitio activo. Para curcumina los valores de pKa de Y121, Y130, E199 e H440 cambian con respecto a la proteína nativa y únicamente el pKa de Y130 cambia significativamente con respecto a BW. Esto puede relacionarse con la presencia de hidroxilos y metoxilos cerca del sitio cuaternario (Y130 se encuentra a aproximadamente 3 Å de W84). Sin embargo, los valores de pKa para ambos compuestos son muy similares a los de la proteína molde, por lo que no es posible aseverar que sean significativos.

**Tabla 6.14.** Valores de pKa para moléculas de prueba

	nativa	1E3Q	BW+C14	BW+Curc
TYR 70	10.55	<b>9.9</b>	<b>9.6</b>	10.26
ASP 72	3.05	3	3.07	3.34
GLU 73	4.5	4.5	4.5	4.5
GLU 82	3.83	4.16	4.15	4.16
TYR 116	12.56	12.6	12.6	12.56
TYR 121	12.62	12.36	12.24	<b>11.96</b>
TYR 130	12.94	12.98	13.1	<b>13.65</b>
TYR 148	15	14.72	15.11	15.16
GLU 199	10.83	<b>8.5</b>	<b>8.2</b>	<b>8.19</b>
CYS 231	8.77	8.61	8.56	8.58
ASP 285	3.94	3.88	3.8	3.88
GLU 327	3.48	3.27	3.42	3.43
TYR 334	14	14.04	13.94	14.12
HIS 398	-1	-0.94	-0.6	-0.64
HIS 440	4.3	<b>6.28</b>	<b>6.31</b>	<b>6.11</b>
TYR 442	12.77	13.11	13.04	13.03
GLU 443	7.02	6.59	6.42	6.4

La alta afinidad de la acetilcolinesterasa por su sustrato y algunos inhibidores con carga positiva sugiere que el ambiente electrostático en la hendidura del sitio activo es importante. Para verificarlo, se calcularon superficies de potencial para el mismo conjunto de complejos proteína-inhibidor con el programa GRASP. Se utilizaron los archivos de carga generados en el paso anterior para los complejos cristalográficos. Para la proteína nativa pudo observarse que la hendidura del sitio activo posee potencial negativo, con excepción de tres pequeñas superficies, una ubicada en el sitio oxianión, otra cercana a la triada catalítica y una tercera en el sitio de unión al grupo acil. Este patrón se repite para todas las proteínas estudiadas. Dada la calidad de los datos generados por GRASP, no pudo realizarse un análisis más profundo que considerara los valores numéricos. En la Figura 6.11 se muestra la superficie de potencial para la estructura nativa de la acetilcolinesterasa. Además se muestra el momento dipolar de la proteína usando como referencia respecto a la orientación al ligando E2020 en verde.

Con el mismo programa se calcularon también las superficies de potencial y los dipolos para los ligandos, a partir de las cargas calculadas con DFT (Teoría de Funcionales de la Densidad). En este caso se eligió ocupar un método más costoso computacionalmente pero que generara una descripción más precisa de la distribución de carga en las moléculas. E2020 y huperzina se consideraron protonados en su grupo amino, pues algunos autores proponen que la forma cargada es la biológicamente activa (Felder y cols., 2002). En la Figura 6.12 se muestran ambos resultados, mientras los valores para el momento dipolar se incluyen en la Tabla 6.15. No fue posible realizar estos cálculos para la curcumina, pues además de tener una carga de cero la distribución de carga es simétrica (la molécula tiene un  $C_2$ ), y el programa no detecta la existencia de diferencias. Por inspección visual puede afirmarse que una característica importante de los inhibidores estudiados es su distribución de cargas y la existencia de un dipolo, pues este interactúa con el momento dipolar de la proteína, ayudando a las moléculas a transitar del sitio periférico al sitio catalítico.



**Figura 6.11** a) Superficie de potencial para la estructura nativa de la acetilcolinesterasa  
b) Momento dipolar para la estructura nativa de la acetilcolinesterasa

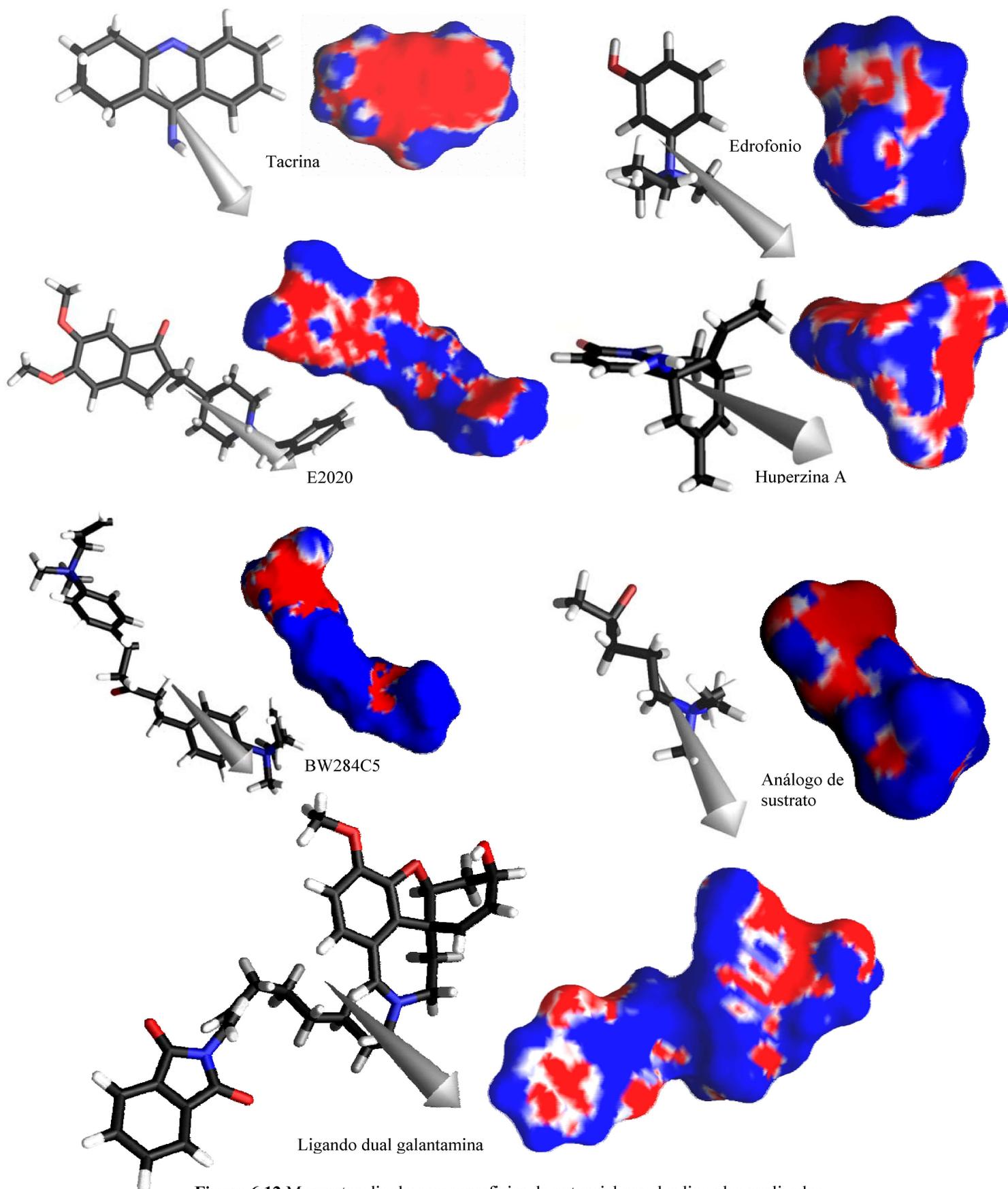


Figura 6.12 Momentos dipolares y superficies de potencial para los ligandos analizados

**Tabla 6.15** Momentos dipolares para inhibidores de acetilcolinesterasa

	Tamaño	
	e*A	Debyes
Tacrina	0.31	1.48
Edrofonio	0.91	4.35
E2020	3.09	14.84
Huperzina	1.91	9.17
dual-gala	1.84	8.85
BW	1.25	5.99
Análogo sust	4.73	22.69

Por último se midió el volumen y la superficie molecular de la cavidad del sitio activo mediante el programa CASTp, y se comparó con el volumen de los ligandos calculados por dos programas distintos. Se buscó identificar si existe una limitante en el volumen o dimensiones de los inhibidores, como datos para considerarse en el posterior diseño de derivados de curcumina con actividad inhibitoria. De acuerdo a la posición de F330, las características de cavidad del sitio activo pueden variar. Por ello se midieron los volúmenes para dos estructuras representativas de las distintas conformaciones de este residuo: la nativa con F330 perpendicular a W84 y la de la tacrina donde F330 está paralelo a W84. Los resultados se muestran en la Tabla 6.16. Se observa que los valores de volumen para las moléculas que se unen únicamente al fondo de la cavidad son significativamente menores que para aquellas que se unen a todo lo largo del sitio activo. El inhibidor más voluminoso, el derivado de galantamina, tiene un volumen de aproximadamente el 50% de la capacidad de la cavidad, lo que nos indica que incluso en este caso las interacciones mediadas por moléculas de agua serán importantes. La curcumina tiene un volumen similar al de E2020 y menor que BW. Potencialmente se cuenta con suficiente espacio para realizar funcionalizaciones en la cadena principal o sobre los anillos aromáticos que permitan la formación de puentes de hidrógeno fuertes.

**Tabla 6.16.** Volumen y superficie molecular

	<b>Superficie (Å<sup>2</sup>)</b>	<b>Volumen (Å<sup>3</sup>)</b>		
IEA5	730.9	986.26		
IACJ	936.58	1176.34		
	<b>HyperChem</b>		<b>ASV</b>	
	<b>Superficie (Å<sup>2</sup>)</b>	<b>Volumen (Å<sup>3</sup>)</b>	<b>Superficie (Å<sup>2</sup>)</b>	<b>Volumen (Å<sup>3</sup>)</b>
Tacrina	218.60	193.59	204.12	176.36
Edrofonio	209.93	174.60	193.90	158.88
E2020	422.42	370.91	395.50	341.13
Huperzina A	265.75	232.86	247.11	211.93
Dual galantamina	554.95	494.92	521.14	457.16
BW	496.19	431.04	462.38	393.79
Curcumina	392.01	330.69	458.40	380.83

## **7. Conclusiones**

Se analizaron las estructuras tridimensionales de un conjunto de inhibidores de la acetilcolinesterasa, distinguiéndose dos tipos: los que se unen en el fondo de la hendidura del sitio activo y los que se unen a lo largo de la misma. El primer conjunto posee como rasgos en común la presencia de ciclos fusionados, algunos de ellos aromáticos, y de un nitrógeno de tipo amina que tenga la capacidad de protonarse para generar una especie positiva. El segundo conjunto está constituido en su mayor parte por moléculas formadas por dos anillos aromáticos en los extremos unidos por una cadena alquílica flexible, que puede estar sustituida. Se observa también la presencia de un nitrógeno de tipo amina.

Se estableció para la muestra de los ligandos utilizados la importancia del momento dipolar y de una distribución de carga predominantemente positiva con ciertas zonas específicas negativas. Estas características facilitan la interacción inicial con la enzima y su movimiento hacia el sitio activo. Asimismo fue posible constatar que dadas las dimensiones de la hendidura del sitio activo, el tamaño de los inhibidores no parece ser una limitante para su unión.

Se analizaron distintos aspectos de un conjunto de complejos acetilcolinesterasa-inhibidor a partir de sus estructuras cristalográficas. Se buscó determinar la energía de unión de los ligandos, no pudiendo obtener valores significativos. A fin de determinar las interacciones que estabilizan al ligando en el sitio activo, se midieron los puentes de hidrógeno, se calcularon los contactos proteína-ligando, y se buscó establecer una relación entre los valores de pKa de los residuos del sitio activo y el modo de unión del ligando. Se concluyó que mediante el análisis de los puentes de hidrógeno entre el ligando y los aminoácidos del sitio activo se obtiene una buena descripción del modo de unión del primero, y se pueden identificar los grupos funcionales que contribuyen a una buena afinidad.

Por sus características químicas, la unión de la curcumina al sitio activo puede compararse con la del compuesto E2020. Se observó que la presencia de grupos aromáticos y/o aromáticos heterocíclicos en la parte central de curcumina limita la flexibilidad de la

cadena interna de carbonos ubicada entre los grupos aromáticos laterales, ocasionando una mayor dificultad para las interacciones de apilamiento con los residuos aromáticos del sitio activo. A fin de aumentar la flexibilidad de la curcumina se propone la reducción de los enlaces dobles que se encuentran en la cadena de carbonos.

A partir de los estudios de acoplamiento y el análisis de los puentes de hidrógeno entre proteína y ligando, se propone que la curcumina y sus derivados pueden interactuar con el sitio activo a través de puentes de hidrógeno fuertes con D72 en el sitio periférico, Y121 en la parte media y E199, S200, F331 y G441 en el fondo de la hendidura. Se propone también la posibilidad de la formación de interacciones de apilamiento con W84 y posiblemente con W279. Se observó que los ligandos con una amina cuaternaria tienen buena afinidad por la enzima, sin embargo, puesto que se busca que el compuesto atraviese barrera hematoencefálica, no es recomendable para las modificaciones a curcumina la inclusión de una carga permanente, ya que le restaría hidrofobicidad. Por lo tanto se sugiere la inclusión de una función amina con un pKa cercano al fisiológico para permitir que las especies positivas se generen en suficiente medida sin perder las propiedades de hidrofobicidad. Además la función amino propuesta podría tener la función de formar puentes de hidrógeno en la parte media de la enzima. Como alternativa a la incorporación de una función amina, se propone la inclusión de otra función que pueda formar un puente de hidrógeno fuerte con la Y121. Es deseable también que las modificaciones que se realizarán sobre la curcumina produzcan un dipolo en la molécula. Esto puede generarse mediante sustituciones asimétricas.

## **8. Perspectivas**

- Confirmar el modo de unión propuesto de la curcumina al sitio activo de la acetilcolinesterasa mediante experimentos de dicroísmo circular.
- Diseñar derivados de la curcumina que incorporen el mayor número posible de las características deseables propuestas.
- Sintetizar los derivados de curcumina diseñados y medir su actividad de inhibición de la acetilcolinesterasa.

## **9. Bibliografía**

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular biology of the Cell*, 4a ed.; Garland Science: Nueva York, 2002; p 647.
- Allen, F.H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **2002**, *58*, 380-388.
- Anderani, A.; Cavalli, A.; Granaiola, M.; Guardigli, M.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Recanatini, M.; Roda, A. Synthesis and screening for acetylcholinesterase activity of (1-benzyl-4-oxopiperidin-3-ylidene)methylindoles and – pyrroles related to donepezil. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4011-4014.
- Barreiro, E.J.; Camara, C.A.; Verli, H.; Brazil-Más, L.; Castro, N.G.; Cintra, W.M.; Aracavana, Y.; Rodríguez, C.R.; Fraga, C.A.M. Design, synthesis and pharmacological profile of novel fused pyrazolo[4,3-d]pyridine y pirazolo[3,4-b][1,8] naphthyridine isosteres: a new class of potent and selective acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1144-1152.
- Bar-On, P.; Millard, C.B.; Harel, M.; Dvir, H.; Enz, A.; Sussman, J.; Silman, J.L. Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3555-3564.
- Barril, X.; Kalko, S.G.; Orozco, M.; Luque, F.J. Rational design of reversible acetylcholinesterase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 27-36.
- Bartolucci, C.; Perola, E.; Cellai, L.; Brufani, M.; Lamba, D. "Back door" opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5714-5719.
- Berman, H.M.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 980.
- Bolognesi, M.L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V., Melchiorre, C. Hexahydrochomeno[4,3-b]pyrrole derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 105-109.
- Bolognesi, M.L.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Rosini, M.; Minarini, A.; Melchiorre, C. Design, synthesis and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogs. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5945-5952.
- Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougist, P.E.; Marchot, P. Conformational flexibility of the acetylcholinesterase tetramer suggested by X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 30370-30376.
- Brühlmann, C.; Ooms, F.; Carrupt, P.A.; Testa, B.; Catto, M.; Leonetti, F.; Altomare, C.; Carotti, A. Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamino oxidase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3195-3198.
- Camps, P.; El Achab, R.; Morral, J.; Muñoz-Torrero, D.; Badia, A.; Eladi Baños, J.; Vivas, N.M.; Barril, X.; Orozco, M.; Luque, F.J. New tacrine-Huperzine A hybrids (huprines):

highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4657-4666.

Camps, P.; Muñoz-Torrero D. Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 11-25.

Camps, P.; Gómez, E.; Muñoz-Torrero, D.; Font-Bardia, M.; Solans, X. Synthesis of diastereomeric 13-amido-substituted huprines as potential high affinity acetylcholinesterase inhibitors. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4143-4151.

Camps, P.; Formosa, X.; Muñoz-Torrero, D.; Petriguet, J.; Badia, A.; Clos, V. Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers: subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1701-1704.

Carrier, P.R.; Chow, E.S.H.; Han, Y.; Liu, Y.; El Yazal, J.; Pang, Y.P. Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: investigating ligand-peripheral site interactions. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4225-4231.

Castro, A.; Conde S.; Rodríguez-Franco, M.I.; Martínez, A. Non-cholinergic pharmacotherapy approaches to the future treatment of Alzheimer's disease. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 37-50.

Castro, A.; Martínez, A. Targeting Beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4377-4387.

Colletier, J.P.; Fournier, D.; Greenblatt, H.M.; Stojan, J.; Sussman, J.L.; Zaccari, G.; Silman, I.; Weik, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* **2006a**, *25*, 2746-2756.

Colletier, J.P.; Sanson, B.; Nachon, F.; Gabellieri, E.; Fattorusso, C.; Campiani, G.; Weik, M. Conformational flexibility in the peripheral site of *Torpedo californica* acetylcholinesterase revealed by the complex structure with a bifunctional inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2006b**, *128*, 4526-4527.

Contreras, J.M.; Parrot, I.; Sippi, W.; Rival, Y.M.; Wermuch, C.F. Design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of 3-[2-(1-benzylpiperidin-4-yl)ethylamino] pyridazine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2707-2718.

Cygler, M.; Schrag, J.D.; Sussman, J.L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M.K.; Doctor, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 366-382.

Da Silva, C.H.T.P.; Leiria Campo, V.; Carvalho, I.; Taft, C.A. Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Graphics Modell.* **2006**, *25*, 169-175.

Da Silva, K.A.; Aubert I.; McLaurin J. Vaccine development for Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4283-4293.

Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665-W667.

- Doucet-Personeni C.; Bentley, P.D.; Fletcher, R.J.; Kinkaid, A.; Kryger, G.; Pirard, B.; Taylor, A.; Taylor, R.; Taylor, J.; Viner, R.; Silman, I.; Sussman, J.L.; Greenblatt, H.M.; Lewis, T. A structure-based design approach to the development of novel, reversible AChE inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3203-3215.
- Dundas, J.; Ouyang, Z.; Tseng, J.; Binkowski, A.; Turpaz, Y.; Liang, J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W116-W118.
- Dvir, H.; Jiang, H.L.; Wong, D.M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X.C.; Jin, G.Y.; Yu, G.L.; Tang, X.C.; Silman, I.; Bai, D.L.; Sussman, J.L. X-ray structures of *Torpedo californica* acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (-)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10810-10818.
- Dvir, H.; Harel, M.; Bon, W.; Liu W.; Vidal, M.; Garbay, C.; Sussman, J.L.; Massoulié, J.; Silman, I. The synaptic acetylcholinesterase tetramer assembles around a polyproline II helix. *EMBO J.* **2004**, *23*, 4394-4405.
- Egan, M.E.; Pearson, M.; Weiner, S.A.; Rajendran, V.; Rubin, D.; Glökner-Pagel, J.; Canny, S.; Du, K.; Lukacs, G.L.; Caplan M.J. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* **2004**, *304*, 600-602.
- Felder, C.E.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of a complex of the potent and specific inhibitor BW284C51 with *Torpedo californica* acetylcholinesterase. *Acta Crystallog., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1765-1771.
- Fink, D.M.; Bores, G.M.; Effland, R.C.; Huger, F.P.; Kurys, B.E.; Rush, D.K.; Selk, D.E. Synthesis and evaluation of 5-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinolinones as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3645-3651.
- Florez, J. Transmisión colinérgica. Fármacos agonistas colinérgicos. En *Farmacología humana*; Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A. Eds; Masson, S.A.: Barcelona, 1992; pp 187-199.
- Giles, K. Interactions underlying subunit association in cholinesterases. *Protein Eng., Des. Sel.* **1997**, *10*, 677-685.
- Greenblatt, H.M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galantamine at 2.3 resolution. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321-326.
- Greenblatt, H.M.; Dvir, H.; Silman, I.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2003**, *20*, 369-383.
- Greenblatt, H.M.; Guillou, C.; Guénard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J.L. The complex of a bivalent derivative of galanthamine with *Torpedo* acetylcholinesterase displays drastic deformations of the active-site gorge: implications for structure-based drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15405-15411.
- Gregor, V.E.; Emmerling, M.R.; Lee, C.; Moore, C.J. The synthesis and *in vitro* acetylcholinesterase and butirilcholinesterase inhibitory activity of tacrine (Cognex) derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 861-864.

- Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D.Z.; Gras, E.; Thal, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *10*, 637-639.
- Han, L.Y.; Lin, H.H.; Li, Z.R.; Zheng, C.J.; Cao, Z.W.; Xie, B.; Chen Y.Z. PEARLS: program for energetic analysis of receptor-ligand system. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 445-450.
- Hardy, J.; Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353-356.
- Harel, M.; Weik, M.; Silman, I.; Sussman, J.L. Native acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) from *Torpedo californica* at 1.8Å resolution. Código PDB: 1EA5.
- Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 9031-9035.
- Harel, M.; Quinn, D.M.; Nair, H.K.; Silman, I.; Sussman, J.L. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origin of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2340-2346.
- Harel, M.; Hyatt, J.L.; Brumshtein, B.; Morton, C.L.; Yoon, K.J.; Wadkins, R.M.; Silman, I.; Sussman, J.L.; Potter, P.M. The crystal structure of the complex of the anticancer prodrug 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) with *Torpedo californica* acetylcholinesterase provides a molecular explanation for its cholinergic action. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1874-1881.
- Haviv, H.; Wong, D.M.; Greenblatt, H.M.; Carlier, P.R.; Pang, Y.P.; Silman, I.; Sussman, J.L. Crystal packing mediates enantioselective ligand recognition at the peripheral site of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11029-11036.
- Hellström-Lindahl, E. Modulation of  $\beta$ -amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 255-263.
- Högenauer, K.; Baumann, K.; Enz, A.; y Mulzer, J. Synthesis and acetylcholinesterase inhibition of 5-desamino Huperzine A derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2627-2630.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics Modell.* **1996**, *14*, 33-38.
- Ishihara, Y.; Goto, G.; Miyamoto, M. Central selective acetylcholinesterase inhibitor with neurotrophic activity: structure-activity relationships of TAK-147 and related compounds. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *78*, 341-354.
- Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
- Kang, S.Y.; Lee, K.Y.; Sung, S.H.; Park, M.J.; Kim, Y.C. Coumarins isolated from *Angelica gigas* inhibit acetylcholinesterase: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 683-685.

- Kempaiyah, R.K.; Srinivasan, K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 471-478.
- Kim, D.S.H.L.; Park S.Y.; Kim J.Y. Curcuminoids from *Curcuma longa* L.(Zinigeraceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from  $\beta$ A(1-42) insult. *Neurosci. Lett.* **2001**, *303*, 57-61.
- Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C.B.; Silman, I.; Sussman, J.L.; Steiner, T. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 713-735.
- Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **1999**, *7*, 297-307.
- Laskowski, R.A.; Chistyakov, V.V.; Thornton, J.M. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D266-D268.
- Leuchtenberger, S.; Beher, D.; Weggen S. Selective modulation of A $\beta$ 42 production in Alzheimer's disease; non-steroidal anti-inflammatory drugs and beyond. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4337-4355.
- Li, H.; Robertson, A.D.; Jensen, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2005**, *61*, 704-721.
- Lozada, M.C.; Enriquez, R.G.; Lobato, C.E.; Ortiz, B.; Gnecco, D.; Reynolds, W.F.; Soriano-Garía, M. Crystal structure of the curcumin derivative, acetic acid 4-[7-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-3,5-dioxoheptyl]-2-methoxyphenyl ester. *Anal. Sci.: X-Ray Struct. Anal. Online* **2004**, *20*, x91-92.
- Lozada M.C.; Enríquez, R.G.; Lobato, C.E.; Ortiz, B.; Soriano, M.; Gnecco, D.; Reynolds, W.F. Synthesis and structure of new heterocyclic derivatives of curcumin. *Heterocycles* **2005**, *65*, 49-58.
- Lozada, M.C.; Enríquez, R.G.; Gnecco, D.; Reynolds, W.F.; Soriano-García, M. Heterocyclic derivatives of curcumin: crystal structure of 3,5-bis[ $\beta$ -(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)ethyl]isoxazol. *Anal. Sci.: X-Ray Struct. Anal. Online* **2006**, *22*, x165-166.
- Martin-Santramaría, S.; Muñoz-Muriedas, J.; Luque, F.J.; Gago, F. Modulation of binding strength in several classes of active site inhibitors of acetylcholinesterase studied by comparative binding energy analysis. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4471-4482.
- Mary, A.; Renko, D.Z.; Guillou, C.; Thal, C. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationship of bis-interacting ligands in the galantamine series. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1835-1850.
- Mattson, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **2004**, *430*, 631-639.
- McKenna, M.T.; Proctor, G.R.; Young, L.C.; Harvey, A.L. Novel tacrine analogues for potential use against Alzheimer's disease: Potent and selective acetylcholinesterase inhibitors and 5-HT uptake inhibitors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3516-3523.

- Morel, N.; Leroy, J.; Ayon, A.; Massoulié, J.; Bon, S. Acetylcholinesterase H and T dimers are associated through the same contact. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37379-37389.
- Mukherjee, P.K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 289-300.
- Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palmiero, E.; Dorronsoro, I.; del Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usán, R.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F.J.; Medina, M.; Martínez, A. Design, synthesis and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7223-7233.
- Muñoz-Torrero, D.; Camps, P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 399-422.
- Nguyen, J.T.; Yamani, A.; Kiso Y. Views on amyloid hypothesis and secretase inhibitors for treating Alzheimer's disease: Progress and problems. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4295-4312.
- Nicholls, A.; Sharp, K.A.; Honig, B. Protein folding and association: Insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins: Struct. Funct. and Genet.* **1991**, *11*, 281-296.
- Ono, K.; Naiki, H.; Yamada, M. The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the formation of  $\beta$ -amyloid fibrils (fA $\beta$ ), as well as destabilize preformed fA $\beta$ . *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4357-4375.
- Organización Panamericana de la Salud. *Perfiles Básicos de Salud de Países en las Américas-México*. [http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp\\_484.htm](http://www.paho.org/Spanish/DD/AIS/cp_484.htm) (Consultado en abril, 2007).
- Palin, R.; Clark, J. K.; Cowley, P.; Muir, A. W.; Pow, E.; Prosser, A. B.; Taylor, R.; Zhang, M. Q. Novel piperidinium and piperidinium agents as water-soluble acetylcholinesterase inhibitors for the reversal of neuromuscular blockade. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2569-2572.
- Pang, Y.P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F.; Brimijoin, S. Highly potent, selective and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 23646-23649.
- Park, S.Y.; Kim, D.S.H.L. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1227-1231.
- Petitjean, M. On the analytical calculation of van der Waals surfaces and volumes: some numerical aspects. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 507-523.
- Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Belluti, F.; Cavalli, A.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Valenti, P.; Recanatini, M. 3-(4-[[benzyl(methyl)amino]methyl]-phenyl)-6,6-dimethoxy-2H-2-chromenone (AP2238) inhibits both acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced  $\beta$ -amyloid aggregation: a dual function lead for Alzheimer's disease therapy. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2279-2282.

- Proaño Narváez, J.; Aguilar Rebolledo, F. Enfermedad de Alzheimer. Clínica, diagnóstico y neuropatología. *Plast. y Rest. Neurol.* **2004**, *3*, 95-105.
- Ravelli, R.B.; Raves, M.L.; Ren, Z.; Bourgeois, D.; Roth, M.; Kroon, J.; Silman, I.; Sussman, J.L. Static Laue diffraction studies on acetylcholinesterase. *Acta Crystallog., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 1359-1366.
- Raves, M.L.; Harel, M.; Pang, Y.P.; Silman, I.; Kozikowski, A.P.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57-63.
- Recanatini, M.; Cavalli, A.; Belluti, F.; Piazzini, L.; Rampa, A.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Valenti, P.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Cabrini, V. SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2007-2018.
- Rodriguez-Franco, M.I.; Fernández-Bachiller, M.I.; Pérez, C.; Castro, A.; Martínez A. Design and synthesis of N-benzylpiperidine-purine derivatives as new dual inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6795-6802.
- Rodriguez-Franco, M.I.; Fernández-Bachiller, M.I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer's disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459-462.
- Rosenberry, T.L.; Jonson, J.L.; Cusack, B.; Thomas, J.L.; Emani, S.; Venkatasubban, K.S. Interactions between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase. *Chem.-Biol. Interact.* **2005**, *157-158*, 181-189.
- Rydberg, E.H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H.M.; Wong, D.M.; Shaya, D.; Williams, L.D.; Carlier, P.R.; Pang, Y.P.; Silman, I.; Sussman, J.L. Complexed of alkylene-linked tacrine dimmers with *Torpedo californica* acetylcholinesterase: binding of bis(5)-tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500.
- Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiano, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. Specific targeting of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase recognition sites. Rational design of novel, selective and highly potent cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1-4.
- Secretaría de Salud. *Indicadores de resultados 2001-2005*; México, D.F., 2006.
- Shao, D.; Zou, C.; Luo, C.; Tang, X.; Li Y. Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4639-4642.
- Silman, I.; Sussman J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 293-302.
- Skovronsky, D.M.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J.Q. Neurodegenerative Diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2006**, *1*, 151-170.

- Sussman, J.I.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872-879.
- Tabarrini, O.; Cecchetti, V.; Temperini, A.; Filipponi, E.; Lamperti, M.G.; Fravolini, A. Velnacrine thiaanalogue as potential agents for treating Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2921-2928.
- Toda, N.; Iwata, Y.; Tago, K.; Kogen, H.; Kaneko, T.; Miyamoto S. Conformational analysis and docking study of potent acetylcholinesterase inhibitors having a benzylamine moiety. *Chem.-Biol. Informatics J.* **2003**, *3*, 46-57.
- Tsou, T.L.; Ho, S.N.; Cang, L.R. Semisynthetic  $\beta$ -lactam antibiotics. Synthesis and antibacterial activity. *Zhonghua Yaoxue Zazhi* **1993**, *45*, 563-572.
- Vas, C. J.; Rajkumar, S.; Tanyakitpisal, P.; Chandra, V. *Alzheimer's Disease: The brain killer*; World Health Organization. Regional Office for South-East Asia: 2001.
- Viegas, C.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro E.J.; Manssour Fraga, C.A. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 915-926.
- Vidaluc, J.L.; Calmel, F.; Bigg, D.; Carrilla, E.; Stenger, A.; Chopin, P.; Briley, M. Novel [2-(4-piperidinyl)ethyl](thio)ureas: synthesis and antiacetylcholinesterase activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 689-695.
- Vidaluc, J.L.; Calmel, F.; Bigg, D.C.H.; Carrilla, E.; Briley, M. Flexible 1-[(2-aminoethoxy)alkyl]-3-aryl(thio)ureas as novel acetylcholinesterase inhibitors. Synthesis and biochemical evaluation. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2969-2973.
- Villalobos, A.; Blake, J.F.; Biggers, C.K.; Butler, T. W.; Chapin, D.S.; Chen, Y.L.; Ives, J.L.; Jones, S.B.; Liston, D.R.; Nagel, A.A.; Nason, D.M.; Nielsen, J.A.; Shalaby, I.A.; White W.F. Novel benzisoxazole derivatives as potent and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2721-2734.
- Villalobos, A.; Butler, T.W.; Chapin, D.S.; Chen, Y.L.; DeMattos, S.B.; Ives J.L.; Jones, S.B.; Liston, D.R.; Nagel, A.A.; Nason, D.M.; Nielsen, J.A.; Ramírez, A.D.; Shalaby, I.A.; White, W.F. 5,7-dihydro-3-[2-[1,(phenylmethyl)-4-piperidinyl]ethyl]-6H-pyrrolo[3,2-f]1,2-benzisoxazol-6-one: a potent and centrally-selective inhibitor of acetylcholinesterase with an improved margin of safety. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2802-2808.
- Wong, D.M.; Greenblatt, H.M.; Dvir, H.; Carlier, P.R.; Han, Y.; Pang, Y.; Silman, I.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase complexed with bivalent ligands related to Huperzine A: experimental evidence for species-dependent protein-ligand complementarity. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 363-373.
- World Health Organization. *Fact Sheet No. 310. The Top Ten Causes of Death.* 2007.
- Yang, F.; Lim, G.P.; Begum, A.N.; Ubeda, O.J.; Simmons, M.R.; Ambegaokar, S.S.; Chen, P.; Kaye, R.; Glabe, C.G.; Frautschy, S.A.; Cole G.M. Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaque, and reduces amyloid *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5892-5901.

Yu, Q.S.; Holloway, H.W.; Flippen-Andersen, J.L.; Hoffman, B.; Brossi, A.; Greig, N.H. Methyl analogues of the experimental Alzheimer drug phenserine: synthesis and structure/activity relationships for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory action. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4062-4071.

Yu, Q.X.; Zhu, X.; Holloway, H.; Whittaker, N.F.; Brossi, A.; Greig, N.H. Anticholinesterase activity of compounds related to genserine tautomers. N-oxides and 1,2-oxazines. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3684-3691.

Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572-10577.

Zhou, G.C.; Zhu, D.Y. Synthesis of 5-substituted analogues of Huperzine A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2055-2057.

Zhu, D.Y.; Tan, C.H.; Li, Y.M. The overview of studies on Huperzine A: a natural drug for the treatment of Alzheimer's disease. In *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*; Liang, X.T.; Fang, W.S., Eds; John Wiley & Sons: New Jersey, 2006; pp 143-182.

## 10. Anexos

### 10.1. El método PM3

La ecuación de Schrödinger puede representarse como  $\mathcal{H}\Psi = E\Psi$  donde  $\mathcal{H}$  es el operador Hamiltoniano. Según esta ecuación, al aplicar el operador Hamiltoniano sobre la función de onda de una partícula obtendremos la misma función multiplicada por un escalar, que será la energía de nuestra partícula. Para resolver esta ecuación se busca encontrar valores de energía y funciones que cumplan estas condiciones. No es posible obtener una solución exacta para los sistemas polielectrónicos, por lo que la función de onda obtenida será solo una aproximación. Esta se construye como el producto de funciones de onda de un solo electrón, a las que se le imponen ciertas restricciones: ortogonalidad y normalidad (Leach, 2001).

Para moléculas se utiliza la aproximación de Born-Oppenheimer, donde se considera que los núcleos están fijos y la energía depende únicamente del movimiento de los electrones y de la atracción y repulsión entre las partículas cargadas. Así mismo se considera que los orbitales moleculares se construyen mediante la combinación lineal de orbitales atómicos

(también conocidos como funciones base):  $\psi_i = \sum_{v=1}^K c_{vi} \phi_v$  para K orbitales atómicos. En un

sistema de N electrones donde todos están apareados existirán N/2 orbitales, y puede definirse la matriz de densidad de carga  $\mathbf{P}$  como  $P_{\mu\nu} = 2 \sum_{i=1}^{N/2} c_{\mu i} c_{\nu i}$ , a partir de la cual será

posible calcular las energías debidas a la repulsión entre pares de electrones y los efectos debidos al spin. Mediante el operador  $H^{\text{core}}$  se calcula la energía potencial y cinética del electrón en el campo del núcleo. Estos términos son utilizados en las ecuaciones de Hartree-Fock, que producen una solución aproximada a la ecuación de Schrödinger mediante un método de campo autoconsistente, tomando en cuenta el teorema variacional (la energía calculada para las aproximaciones de la función de onda siempre será mayor a la energía de la función de onda real). La mejor función de onda será aquella de mínima energía (Leach, 2001).

Para poder resolver las ecuaciones de Hartree-Fock es conveniente expresarlas en forma de matrices, resultando en la ecuación de Roothaan-Hall. Esta puede escribirse como  $\mathbf{FC}=\mathbf{SCE}$ .  $\mathbf{F}$  es la matriz de Fock, cuyos términos describen la energía total de cada electrón:  $F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^{core} + \sum_{\lambda=1}^K \sum_{\sigma=1}^K P_{\lambda\sigma} [(\mu\nu | \lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\lambda | \nu\sigma)]$ .  $\mathbf{C}$  es la matriz de coeficientes  $c_{\nu i}$ ,  $\mathbf{E}$  es una matriz diagonal cuyos elementos  $\epsilon_i$  son las energías de los orbitales y  $\mathbf{S}$  es la matriz de superposición que restringe que las funciones base sean ortonormales. Calculando  $\mathbf{F}$ ,  $\mathbf{S}$ ,  $\mathbf{P}$  y  $\mathbf{C}$  iterativamente hasta encontrar un valor mínimo de energía podemos encontrar la ecuación que mejor defina nuestra función de onda (Leach, 2001). A partir de la misma es posible calcular propiedades de nuestra molécula que dependan de su distribución electrónica.

Para los métodos semiempíricos, la matriz de superposición  $\mathbf{S}=\mathbf{I}$  (matriz identidad), por lo que la ecuación de Roothaan-Hall queda en la forma  $\mathbf{FC}=\mathbf{CE}$ , simplificando su resolución. Otra de las diferencias con los métodos *ab initio* consiste en que los métodos semiempíricos consideran explícitamente sólo los electrones de valencia, agrupando los electrones internos con el núcleo como un solo potencial (llamado core). Por ello el cálculo de las interacciones core-core es distinto, siendo necesario definir ecuaciones especiales para los enlaces OH y NH. Estos métodos utilizan funciones base de tipo Slater con orbitales s, p y ocasionalmente d especialmente optimizados. Los diferentes métodos semiempíricos varían en el modo en que se considera el traslape. PM3 se basa en el modelo NDDO (neglect of diatomic differential overlap) donde se desprecia el traslape de funciones base centradas en distintos átomos (Stewart, 2002). La matriz de Fock está formada entonces por los siguientes elementos:

$$F_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} - \sum_B [-Z_B(\mu_A\mu_A | s_B s_B)] + \sum_\nu [P_{\nu\nu}(\mu\mu | \nu\nu) - \frac{1}{2}P_{\nu\nu}(\mu\nu | \mu\nu)] + \sum_B \sum_\lambda \sum_\sigma P_{\lambda\sigma}(\mu\mu | \lambda\sigma)$$

para los elementos diagonales,

$$F_{\mu\nu} = -\sum_B -Z_B(\mu_A\nu_A | s_B s_B) + \frac{3}{2}P_{\mu\nu}(\mu\nu | \mu\nu) - \frac{1}{2}P_{\mu\nu}(\mu\mu | \nu\nu) + \sum_B \sum_\lambda \sum_\sigma P_{\lambda\sigma}(\mu\nu | \lambda\sigma)$$

para  $\mu$  y  $\nu$  en A,

$$F_{\mu\nu} = \frac{1}{2} S_{\mu\nu} (\beta_{\mu} + \beta_{\nu}) - \frac{1}{2} \sum_{\lambda}^B \sum_{\sigma}^A P_{\lambda\sigma} (\mu\sigma | \nu\lambda) \text{ para } \mu \text{ en A y } \nu \text{ en B (Leach 2001)}.$$

La denominación de métodos semiempíricos estriba en la inclusión de algunos parámetros para cada átomo, cuyos valores fueron optimizados para reproducir distintas propiedades moleculares medidas experimentalmente. Algunos ejemplos son: parámetros para las integrales de un electrón en uno o dos centros, para las integrales electrónicas de dos electrones en un centro, parámetros para las integrales de dos electrones en dos centros, y los términos de repulsión core-core. Una vez que se han calculado todas las integrales (que incluyen a los parámetros dados), se realiza un cálculo de campo autoconsistente. Se construye una matriz **P** de prueba a partir de la cual se calcula una matriz **F**, que al diagonalizarse produce la matriz **E** a partir de la cual se construye una nueva matriz **P** y así sucesivamente hasta que la evaluación de energía nos indique que se ha alcanzado el mínimo (o el límite especificado) (Stewart, 2002).

La inclusión de estos valores numéricos simplifica significativamente los cálculos a realizar, haciéndolos más rápidos. Esta es la principal ventaja de los métodos semiempíricos sobre los *ab initio*, pues permite realizar cálculos de moléculas grandes. La calidad de los resultados dependerá de la parametrización del método, que en el caso de PM3 fue para reproducir gran cantidad de propiedades de moléculas orgánicas, por lo que para este tipo de cálculos produce buenos resultados.

Leach, A.R. *Molecular Modelling. Principles and applications*. 2a ed.; Prentice-Hall: Essex, 2001; pp 26-107.

Stewart, J.J.P. *MOPAC 2002 Manual*. Fujitsu LTD: 2001. <http://www.cachesoftware.com/mopac/Mopac2002manual/index.html> (Consultado en julio, 2007).

## 10.2.El campo de fuerza CHARMM

Los métodos de mecánica molecular nos permiten estudiar el comportamiento de macromoléculas cuyo tamaño haría prohibitivo el realizar cálculos cuánticos. Estos se

basan en tres principios: la hipótesis termodinámica que sostiene que las macromoléculas llegan a su conformación nativa en mayor parte debido a sus propiedades termodinámicas; el principio de aditividad según el cuál la energía molecular puede expresarse como la suma de distintas energías potenciales (van der Waals, electrostática, etc.); y el principio de transferencia, que supone que es posible desarrollar potenciales que incorporen los datos experimentales para ciertos grupos representativos, y que puedan ser aplicados a otras moléculas compuestas de los mismos grupos químicos (Schlick, 2002).

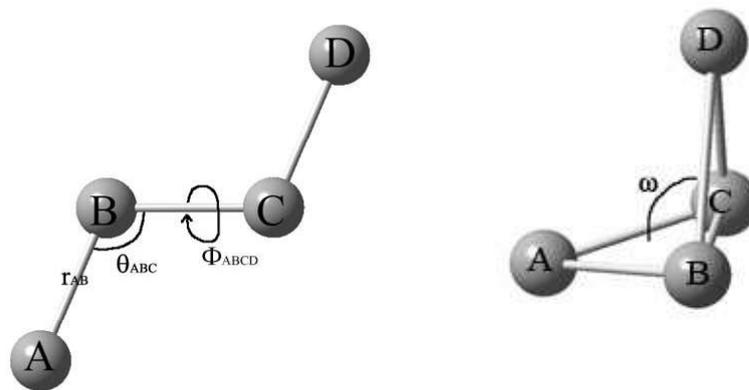
Se considera que la energía del sistema es una función de las posiciones de los núcleos (según la aproximación de Born-Openheimer) y se define mediante una serie de ecuaciones basadas en los principios de la física clásica. A fin de poder utilizar los mismos parámetros para una serie de moléculas, se definen distintos tipos de átomos que describen a un núcleo de acuerdo al elemento en cuestión y a su ambiente (hibridación, tipo de enlaces, carga formal). Los distintos campos de fuerza existentes difieren en las ecuaciones que describen la energía potencial y en los parámetros utilizados para relacionar dichas ecuaciones con los tipos de átomo a fin de poder reproducir datos experimentales. Es necesario proveer las coordenadas iniciales del sistema, generalmente en coordenadas cartesianas, y definir los tipos de átomos que conforman nuestra molécula (Leach, 2001).

El campo de fuerza CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) fue desarrollado por el equipo del Dr. Karplus con la capacidad de simular desde moléculas pequeñas hasta macromoléculas solvatadas. La función de energía está compuesta por un conjunto de términos que describen las interacciones entre átomos enlazados y otro conjunto de términos describiendo las interacciones entre átomos no-enlazados. La energía total del sistema será la suma de cada uno de estos términos aplicados a todos los átomos: 
$$\text{Energía potencial} = E_{\text{enlace}} + E_{\theta} + E_{\phi} + E_{\text{impr}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{otro}}$$
 (Accelrys, 2001).

Los cuatro primeros términos dependen de los enlaces entre átomos. Se aplica una penalización cuando los valores de longitud de enlace o de los ángulos se desvían de los valores de referencia. Los primeros dos términos describen la energía de vibración normal de las moléculas, el tercero representa las barreras de rotación alrededor de un enlace

mientras que el último ayuda a mejorar la descripción de la energía cerca del mínimo de energía.

- La variación en la longitud del enlace con respecto a su longitud de referencia  $r_0$ , se calcula a partir de la ley de Hooke:  $E_{enlace} = \sum k_e (r - r_0)^2$
- Las variaciones en el ángulo theta ( $\theta$ ) (Figura 9.1) también se describen mediante un potencial armónico:  $E_\theta = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2$
- La energía de rotación alrededor de un enlace se describe con respecto al ángulo diedro phi ( $\Phi$ ):  $E_\Phi = \sum |k_\Phi| - k_\Phi \cos(n\Phi)$
- Las torsiones impropias, o de torsión fuera del plano se definen para cuatro átomos que no necesariamente están unidos en secuencia. En la Figura 9.1 se representa al ángulo  $\omega$  formado entre los planos ABC y BCD. Están diseñados para mantener la quiralidad en átomos tetraédricos, y para mantener la planaridad de una molécula con átomos con hibridación  $sp^2$ :  $E_{impr} = \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2$



**Figura 9.1** Representación esquemática de los ángulos  $\theta$ ,  $\Phi$  y  $\omega$ , y la distancia de enlace

Los términos quinto y sexto de la ecuación de energía potencial se refieren a las interacciones de no-enlace. Para su cálculo se genera una lista que contiene todos los pares de átomos a considerar, excluyendo aquellos pares que se encuentran a una distancia mayor al rango establecido o si se encuentran conectados directamente. La lista se actualiza periódicamente durante una dinámica o minimización para considerar los cambios en la posición de los átomos.

- Las interacciones electrostáticas se miden mediante un potencial de Coulomb entre dos

cargas puntuales  $q_i$  y  $q_j$ :  $E_{elec} = \sum_{excl(i,j)} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}$

- Las interacciones de van der Waals se modelan mediante una función de tipo Lennard-Jones, donde el término de atracción  $r^{-6}$  se toma de la mecánica cuántica, mientras que su cuadrado modela la repulsión entre dos moléculas muy cercanas:

$$E_{vdW} = \sum_{excl(i,j)=1} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) sw(r_{ij}^2, r_{on}^2, r_{off}^2)$$

Es posible modificar la forma de la función cerca de la distancia de corte determinada, especificando una región de transición entre las distancias  $r_{on}$  y  $r_{off}$ , en la que se multiplica el término de van der Waals por una constante que depende del valor de  $r_{ij}$ .

El campo de fuerza permite definir restricciones energéticas según las necesidades del usuario, ya sea fijando algunos átomos o ángulos diedros, o mediante rutinas programadas individualmente. Todos estos términos se agrupan como la contribución  $E_{otro}$ , el séptimo término en la ecuación de energía potencial. También es posible especificar la constante dieléctrica del medio, o utilizar una constante dieléctrica dependiente de la distancia (Accelerys, 2001).

Accelerys Inc. *CHARMm Principles*; 2001. Disponible en <http://scv.bu.edu/Graphics/quantadocs/> (Consultado en julio, 2007)

Leach, A.R. *Molecular Modelling. Principles and applications*. 2a ed.; Prentice-Hall: Essex, 2001; pp 165- 252.

Schlick, T. *Molecular Modeling and Simulation. An interdisciplinary guide*; Interdisciplinary Applied Mathematics; Springer-Verlag: New York, 2002; pp 211- 258.

### 10.3.Dinámica Molecular

Un cálculo de dinámica molecular nos permite simular el comportamiento dinámico de macromoléculas a fin de poder calcular algunas de sus propiedades como: fluctuaciones locales en su geometría, unión de ligandos o energías libres. La molécula se coloca en un

campo de fuerza y se calcula su energía potencial, que al derivarse nos reporta la fuerza sobre cada átomo. Aplicando la segunda ley de Newton se calcula su aceleración

$\left(\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F x_i}{m_i}\right)$ . La masa y aceleración del átomo se relacionan con el gradiente del campo

de energía potencial calculando una velocidad aproximada y permitiendo predecir los cambios en la posición de los átomos. Estos cálculos repetidos permiten crear una trayectoria que describe la variación en las posiciones y velocidades atómicas dependiendo del tiempo, por lo que se dice que éste es un método determinístico (Leach, 2001).

Al encontrarse en un campo de potencial continuo, la fuerza en cada partícula cambia con respecto a su posición, o con la posición de los átomos con los que interactúa. Por ello la ecuación del movimiento debe resolverse numéricamente. CHARMM utiliza el método de Verlet, donde la integración se divide en etapas separadas por  $\delta t$ . La fuerza de cada partícula en el tiempo  $t$  se calcula como la suma vectorial de sus interacciones con otras partículas. A partir de la fuerza es posible calcular la aceleración, y al combinarla con las posiciones en el tiempo  $t$  y en  $t-\delta t$  nos permitirán calcular la posición en el tiempo  $t+\delta t$ , asumiendo que la fuerza permanece constante en el intervalo de tiempo. Si consideramos a  $\mathbf{r}$  como el vector de posición, y  $\mathbf{a}$  como la aceleración, las nuevas coordenadas pueden calcularse como:  $\mathbf{r}(t + \delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \mathbf{a}(t)$  (Accelerys, 2001; Leach, 2001).

Un cálculo estándar generalmente se realiza en el siguiente orden: Inicialmente se suministran las coordenadas cartesianas de nuestro sistema y se calcula su energía total. Si la estructura utilizada proviene de datos experimentales, se recomienda minimizar la energía a fin de relajar las conformaciones tensionadas y eliminar contactos desfavorables. Esta conformación minimizada se encontraría a una temperatura cercana al cero absoluto, por lo que para realizar una dinámica a temperatura ambiente es necesario calentar el sistema. Para ello se asignan velocidades iniciales a los átomos mediante un método aleatorio que sigue una distribución Gaussiana apropiada para dicha temperatura, y se ejecuta la dinámica. La temperatura aumenta gradualmente al asignar velocidades aleatorias mayores para cada átomo en determinados intervalos de tiempo. Tras alcanzar la temperatura deseada, es necesario que el sistema evolucione espontáneamente por un

periodo de tiempo hasta que la temperatura y la estructura se estabilicen. Para ello se reasignan las velocidades a la temperatura deseada cada cierto tiempo. Finalmente, la estructura equilibrada se toma como punto inicial para la simulación, guardando la trayectoria de los átomos durante un periodo de tiempo, típicamente entre decenas y cientos de picosegundos. Esta trayectoria puede ser analizada para medir fluctuaciones en los parámetros geométricos, propiedades termodinámica o procesos moleculares dependientes del tiempo. En algunos casos, el sistema puede enfriarse en una manera inversa a la etapa de calentamiento hasta obtener una temperatura de 0 K (Accelerys, 2001).

Leach, A.R. *Molecular Modelling. Principles and applications*. 2a ed.; Prentice-Hall: Essex, 2001; pp 303- 409.

Accelerys Inc. *CHARMm Principles*; 2001. Disponible en <http://scv.bu.edu/Graphics/quantadocs/> (Consultado en julio, 2007)

#### **10.4. GOLD y SILVER**

GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking) es un programa que permite generar acoplamientos entre proteínas y un ligando flexible mediante un algoritmo genético. La estructura de la proteína debe encontrarse en formato PDB o MOL2 y tener asignados los hidrógenos para definir las ionizaciones correctas de los aminoácidos, además que en caso de archivos en MOL2 la asignación de tipo de átomo debe ser la adecuada (el programa usa la nomenclatura de SYBYL). El archivo con las coordenadas del ligando debe tener formato MOL o MOL2 e incluir los enlaces y átomos de hidrógeno asignados adecuadamente para permitir al programa deducir las cargas correctas. Es también necesario que la conformación del ligando esté minimizada.

Las moléculas de agua, en muchos casos, son importantes para la unión de una proteína con su ligando, pues forman puentes de hidrógeno entre ellos. El programa permite especificar las aguas que serán incluidas en el cálculo y definir si estas pueden ser manipuladas (rotar y desplazarse). También es posible dejar que el programa decida automáticamente si las aguas estarán o no unidas al sitio activo. Esto se logra mediante el cálculo del costo

energético de transferir una molécula de agua desde el solvente hasta el sitio de unión de la proteína, mediante la fórmula  $\Delta G_b(W) = \Delta G_p(W) + \Delta G_i(W)$ , donde el primer término es una penalización por cada molécula de agua “encendida” que representa la pérdida de entropía por la unión de la molécula y el segundo término representa la afinidad intrínseca de la molécula con el sitio activo según las interacciones que ésta forma (CCDC, 2006a).

El algoritmo del programa no modifica las longitudes de enlace, ángulos del ligando ni ángulos de torsión de enlaces rígidos, únicamente realiza rotaciones de enlaces sencillos. Es posible permitir específicamente la inversión de ciclos, de enlaces amida, de nitrógenos planos y piramidales y la rotación de funciones carboxílicas. A fin de limitar el espacio a muestrear, el programa posee una biblioteca de ángulos de torsión observados cristalográficamente, pudiendo también generar un archivo extrayendo los datos del CSD (Cambridge Structural Database).

El programa cuenta con dos funciones de evaluación, GoldScore y ChemScore, además de ser posible utilizar una función definida por el usuario. La primera consiste de cuatro contribuciones energéticas: puentes de hidrógeno proteína-ligando, interacciones de van der Waals proteína-ligando, energía interna del ligando y energía de torsión del ligando. ChemScore (Baxter y cols., 1998; Eldridge y cols., 1997) por su parte calcula el cambio en energía libre por la unión del ligando como la suma de las contribuciones por: puentes de hidrógeno proteína-ligando, enlaces entre un metal en la proteína y su aceptor en el ligando, energía de interacción lipofílica proteína-ligando y la pérdida de entropía de un enlace rotatable al quedar rígido ante su unión con la proteína. El valor final se obtiene al sumar penalizaciones por colisiones y por tensiones de torsión internas al valor de energía libre. En ambos casos, un valor mayor para la evaluación implica una mejor unión con la proteína (CCDC, 2006a).

El algoritmo genético es un método que permite realizar de manera eficiente la búsqueda de la solución con el mejor valor de evaluación (el individuo más apto). La información se maneja de manera análoga al comportamiento de los genes en la evolución, donde la información que representa a un individuo puede mutar, recombinarse y reproducirse.

Brevemente, el cálculo se inicia definiendo una población inicial de manera aleatoria (posibles orientaciones del ligando). Cada individuo se define como un cromosoma, que contiene la información de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y conformación de enlaces flexibles. Mediante la función de evaluación se le asigna un valor de puntuación (fitness) a cada individuo, y se ordenan de acuerdo al mismo. La probabilidad de que un individuo se reproduzca es proporcional a su puntuación en cada generación, y depende de los operadores de mutación, recombinación o migración que se aplican aleatoriamente. Los nuevos individuos reemplazan a los peores miembros de la población, que es nuevamente evaluada seleccionando los individuos más aptos para reproducirse en esta ocasión (CCDC, 2006a).

El ciclo se repite hasta cumplir el número de operaciones especificadas. A continuación de enlistarán algunos de los parámetros que definen al algoritmo especificando sus valores por defecto entre paréntesis: el tamaño de población (100 individuos), presión selectiva (razón de las probabilidades de reproducción del mejor miembro de la población respecto a un miembro promedio, 1.1), número total de operaciones (100,000), número de islas (conjuntos de poblaciones cuyos individuos pueden migrar entre si mediante una operación, 5), peso de cada operador (mutación 95, recombinación 95, migración 10). Finalmente, es posible repetir el acoplamiento varias veces, iniciando cada una con una población aleatoria distinta a fin de explorar el mayor número de conformaciones posibles (CCDC, 2006a).

GOLD genera un archivo con las coordenadas para la mejor solución de cada ensayo de acoplamiento, incluyendo la posición de las moléculas de agua (en su caso) y los valores de la función de evaluación. Estos archivos pueden ser analizados mediante el programa SILVER, que además de permitir visualizar los resultados del acoplamiento, calcula una serie de descriptores: puentes de hidrógeno proteína-ligando, contactos proteína-ligando, superficie no accesible del ligando, por ejemplo. Los puentes de hidrógeno se calculan entre un hidrógeno y un átomo aceptor (oxígeno o nitrógeno) si la distancia entre ellos es menor a la suma de sus radios de van der Waals y el ángulo entre donador-hidrógeno-aceptor es mayor a  $90^\circ$ . Los contactos se definen entre átomos del ligando y átomos de la

proteína cuya distancia sea al menos  $0.5 \text{ \AA}$  menor que la suma de sus radios de van der Waals (CCDC, 2006b).

Baxter, C.A.; Murray, C.W.; Clark, D.E.; Westead, D.R.; Elridge, M.D. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins* **1998**, *33*, 367-382.

Cambridge Crystallographic Data Centre. *GOLD User Guide & Tutorials*. CCDC Software Ltd.: 2006a.

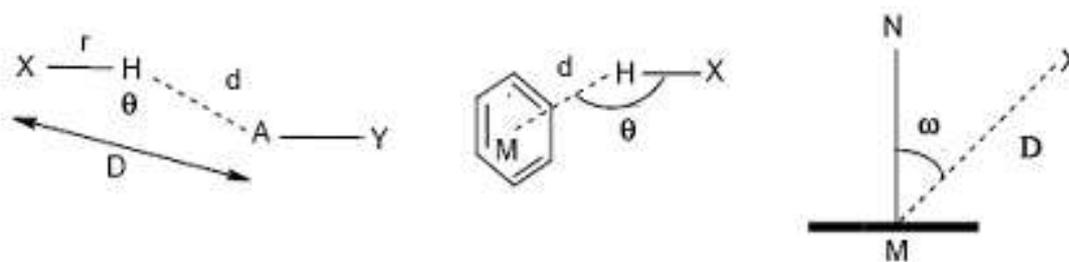
Cambridge Crystallographic Data Centre. *SILVER User Guide & Tutorials*. CCDC Software Ltd.: 2006b.

Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.V.; Mee, R.P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, *11*, 425-445.

## 10.5. Puentes de hidrógeno y HBA

Un puente de hidrógeno, representado como  $X-H\dots A$ , se define como una interacción electrostática entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo más electronegativo X, y un aceptor (A), generalmente un átomo de oxígeno o nitrógeno. Según la naturaleza de los átomos X y A, los puentes de hidrógeno pueden clasificarse como fuertes o débiles. En los puentes de hidrógeno fuertes tanto X como A son átomos más electronegativos que el H, como O o N. En los puentes de hidrógeno débiles X puede ser un carbono, fósforo o halógeno mientras que A puede ser N, O, S o un halógeno. Un caso especial son los puentes aromáticos, donde el aceptor es un sistema  $\pi$  (Desiraju, 2002).

Geoméricamente, los puentes de hidrógeno pueden describirse mediante la distancia entre el hidrógeno y el aceptor ( $d$ ), la distancia entre X y A ( $D$ ), la distancia del enlace covalente  $X-H$  ( $r$ ), y el ángulo  $XHA$  ( $\theta$ ) (Figura 9.2). En el caso de los puentes tipo  $\pi$  donde A es un sistema aromático, suelen medirse las distancias hasta el centroide del anillo ( $M$ ).  $MN$  es perpendicular al plano del anillo, y  $\omega$  describe el ángulo formado entre  $NMX$  (Tiwari y cols., 2006). Algunos de los valores característicos para estos parámetros se muestran en la Tabla 9.1.



**Figura 9.2** Representación esquemática de los parámetros que describen a un puente de hidrógeno. Tomados de Tiwari y cols., 2006.

**Tabla 9.1** Valores característicos para los puentes de hidrógeno<sup>1</sup>

	X	E (kcal/mol)	D(Å)	d(Å)	$\theta$ (°)	$\omega$ (°)	Distancias
Fuerte	O, N	4-15	2.5-3.2	1.5-2.2	130-180	--	H...A > X—H
Débil	C	<4	3.0-4.0	2.0-3.0	90-180	--	H...A >> X—H
Aromático	O, N, C	<4	3.8		120	<40	

<sup>1</sup> Desiraju, G.R.; Steiner, T. *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*; IUCr Monographs on Crystallography; Oxford Science: Oxford, 1999.

El programa de HBAAT (Hydrogen Bond Analysis Tool) calcula los puentes de hidrógeno presentes en una molécula a partir de la información de su estructura. Es necesario que la estructura esté en formato PDB, que incluya los hidrógenos y que la molécula no sea mayor a 5000 átomos. En caso de moléculas de mayor tamaño, se tiene la opción de definir una región específica a ser analizada. Para cada átomo se crea una lista de los átomos más cercanos de acuerdo a un radio de búsqueda, que por defecto es de 5 Å. En ella se analizan los puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals de acuerdo a: la suma de los radios de van der Waals de los átomos que interactúan, el valor de corte para las distancias D, d, y el ángulo  $\theta$  (valores por defecto de 4 Å, 3 Å y 90° respectivamente). En el caso de las interacciones aromáticas los valores dependen del tipo de aminoácido e interacción analizados. Los valores por defecto son de D=5 Å, d=4 Å,  $\theta=90^\circ$  y  $\omega=40$ . Para Arg y Lys, la interacción N-H... $\pi$  tiene como límite un valor de  $\theta=10^\circ$ ; para Ser, Thr y Tyr la interacción O-H... $\pi$  tiene un valor de  $\theta=4.0^\circ$ . El programa produce un listado de los puentes de hidrógeno encontrados especificando el tipo de puente, los residuos que lo forman y los valores de r, d, D,  $\theta$  y en su caso  $\omega$ . Adicionalmente produce archivos que reproducen el listado de átomos más cercanos (especificando la distancia entre ellos y la suma de sus radios de van der Waals), y enlista algunas estadísticas de los puentes de hidrógeno: la

frecuencia aparición de cada tipo de puente, la distribución por valores de  $\theta$  y la bifurcación.

Desiraju, G.F. Hydrogen bridges in crystal engineering: Interactions without borders. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 565-573.

Tiwari, A.; Panigrahi, S.K.; Thakur, T.; Aparna, V. *Hydrogen Bond Analysis Tool (HBAT) User Manual*. Disponible en <http://202.41.85.161/~grd/HBAT.html> (Consultado en abril, 2006).

## 10.6. PDB2PQR y PROPKA

El programa PDB2PQR está diseñado para convertir archivos en formato PDB al formato PQR. Ambos son muy similares, pero en el segundo se reemplaza la columna de ocupancia por valores de carga atómica, y la columna del factor de temperatura con los valores de radio atómico. De esta manera los archivos pueden ser ocupados en programas de continuo electrostático como Delphi. Inicialmente se analiza la estructura suministrada en busca de átomos pesados (no hidrógenos) faltantes. Si son más del 10% del total de átomos presentes, el programa termina. De otra manera dichos átomos se agregan a partir de una biblioteca de topologías de aminoácidos, y se varían los ángulos de las cadenas laterales para evitar que formen contactos desfavorables con otros residuos (Dolinsky, 2004).

Posteriormente se añaden los hidrógenos necesarios, buscando formar redes de puentes de hidrógeno. El algoritmo primero ajusta los ángulos  $\chi$  de His, Arg y Gln para optimizar los puentes de hidrógeno. Posteriormente se optimizan los hidrógenos unidos a las moléculas de agua. Finalmente, se protonan los residuos de His, Asp y Glu a modo de mejorar los puentes de hidrógeno y la energía local. Estos nuevos átomos también son optimizados para evitar contactos desfavorables. En base al campo de fuerza especificado por el usuario, el programa asigna cargas y radio a cada átomo y las agrega al archivo de la estructura, generando el archivo de salida (Dolinsky, 2004).

Es posible asignar la protonación de los aminoácidos a partir de los valores de pKa calculados mediante el programa PROPKA, y especificando el pH deseado para nuestra

proteína. Sin embargo, este programa no reconoce heteroátomos, por lo que al utilizar esta opción las moléculas de agua son ignoradas y no se incluyen en la optimización de redes de puentes de hidrógeno.

PROPKA predice el valor de pKa de un grupo ionizable al aplicar un factor de perturbación del ambiente al valor estándar de cada residuo:  $pK_a = pK_{\text{modelo}} + \Delta pK_a$ . El valor de  $pK_{\text{modelo}}$  se determinó empíricamente, considerando los efectos por la presencia de los enlaces peptídicos. El factor de perturbación  $\Delta pK_a$  se calcula a partir de tres contribuciones, cuyas ecuaciones y parámetros se calcularon empíricamente. En la primera, la presencia de puentes de hidrógeno modifica el pKa de residuos ionizables, la magnitud del efecto depende de la fuerza del puente (que a su vez depende de su geometría). Se utilizan dos ecuaciones dependientes de la distancia para obtener valores de  $\Delta pK_{\text{PH}}$ , una para los puentes de hidrógeno entre grupos ionizables y el esqueleto proteico y otra para los puentes de hidrógeno con los grupos sustituyentes. La segunda contribución describe los cambios de pKa para los grupos ionizables que se encuentran en el interior de la proteína, la cuál los autores proponen se deben a efectos de desolvatación. Los grupos C-terminal, Asp, Glu, Cys y Tyr aumentan su valor de pKa al estar desolvatados mientras que para los grupos N-terminales, His, Lys y Arg el efecto disminuye el valor de pKa. Como parámetro para calcular la desolvatación se utiliza el número de átomos que rodean al residuo en estudio (en ausencia de átomos de la proteína, el espacio estaría ocupado por agua) a dos distancias de referencia: la primera de alrededor de 5 Å y la segunda a 15.5 Å. El número de átomos multiplicado por una constante de proporcionalidad representa la contribución  $\Delta pK_{\text{des}}$ . La tercera contribución se calcula únicamente para los residuos en el interior de la proteína, pues al no estar solvatados la presencia de interacciones electrostáticas es determinante para el valor de  $\Delta pK_{\text{crg}}$ . Al ser una función dependiente de la geométrica y la distancia, se decidió aplicar la misma ecuación que para los puentes de hidrógeno de los susituyentes, modificando únicamente las constantes de proporcionalidad (Li y cols., 2005).

El cálculo de pKa se realiza mediante un procedimiento iterativo de tipo autoconsistente. Primero, se identifican los grupos ionizables del archivo PDB suministrado (no se reconocen hidrógenos ni heteroátomos). A continuación se determinan las posiciones de los

hidrógenos N-H en: el esqueleto proteico, Asn, Gln, Trp, His y Arg. Se calculan valores temporales de pKa para los grupos ionizables a partir de los valores de otros residuos que se determinan con más facilidad (por ejemplo, se considera que Lys y Arg son siempre positivos); para después recalcular iterativamente todos los valores de pKa. Cuando estos convergen, se crea un archivo conteniendo los valores de pKa predichos y sus contribuciones individuales (Li y cols., 2005).

Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665-W667.

Li, H.; Robertson, A.D.; Jensen, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2005**, *61*, 704-721.

## 10.7.GRASP

GRASP es un programa que permite visualizar potenciales electrostáticos en la superficie de macromoléculas biológicas. Las superficies calculadas pueden ser de dos tipos: molecular y accesible. La primera se define como la frontera en que una esfera de prueba no se superpone con los átomos de la molécula (considerados como esferas sólidas). La segunda se define como la suma de la superficie de los átomos más el radio de la esfera de prueba. Las superficies se construyen al asignar a cada tipo de átomo un valor para su radio, ya sea mediante bibliotecas contenidas en el programa o por datos suministrados por el usuario. Posteriormente se ubica a la esfera de prueba en la superficie de la molécula y se “rueda” sobre la misma (Nicholls).

La superficie de potencial es una representación gráfica de los valores de un mapa de potencial sobre una superficie. Estos valores se calculan mediante la ecuación de Poisson Boltzmann. Se generan dos mallas formadas por 33 cubos, una dentro de la otra. La interna es mayor que la superficie molecular por el diámetro de una molécula de agua, la segunda tiene el doble del tamaño de la primera. Se calculan primero los potenciales en la maya externa, para posteriormente ser interpolados y refinados en la malla interna. Estos

potenciales son interpolados a su vez a una malla de 65 cubos del mismo tamaño que la externa. Esta última es usada para calcular los datos requeridos, sin embargo la calidad de los datos limita su uso para análisis cualitativos. Es posible definir las constantes dieléctricas internas y externas, el radio del átomo de prueba y el radio de exclusión iónica.

El programa puede también calcular el momento dipolar para una molécula. Inicialmente calcula la suma de todas las cargas positivas y la ubicación promedio proporcional a la carga de las partículas, lo mismo que para todas las cargas negativas. Si las sumas son distintas, existe un monopolo de magnitud igual a la suma de las sumas ubicado en la posición promedio del término mayor. Existe también un dipolo cuya magnitud se determina multiplicado la suma de menor valor por la distancia entre los centros de carga proporcional..

Nicholls, A. *GRASP User Manual*. Disponible en [http://luna.bioc.columbia.edu/honiglab/software/GRASP/grasp\\_contents.html](http://luna.bioc.columbia.edu/honiglab/software/GRASP/grasp_contents.html) (Consultado en marzo, 2007)

### **10.8.CASTp**

El servidor CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins) permite calcular la superficie y volumen de regiones cóncavas (cavidades y huecos) ubicadas en una proteína. Un hueco se define como un espacio vacío en el interior de la proteína, inaccesible a una molécula de agua. Una cavidad es una caverna cóncava con un diámetro pequeño en la apertura, localizada en la superficie de la proteína, y es fácilmente accesible al agua. El programa utiliza un algoritmo de formas alfa y un método de flujo discreto. Si se dibujan líneas conectando los centros de los átomos en una molécula se obtendrá un contorno de la misma formado por tetraedros. Si se repite el proceso omitiendo aquellos tetraedros que incluyen un “espacio vacío” se obtiene una forma alfa. El método de flujo discreto se aplica sobre los tetraedros vacíos (no incluidos en la forma alfa), si estos son obtusos se dice que fluyen al tetraedro vacío contiguo. Si este es agudo, este colecta el flujo. El tamaño de la cavidad se determina sumando todos los tetraedros vacíos y restando

las fracciones de los átomos incluidas en cada tetraedro vacío. El tamaño de la boca de la cavidad será la línea que señala el límite del triángulo más externo menos el radio de los átomos que une. El programa da información sobre los átomos que forman cada cavidad, su volumen y área ya sea mediante la superficie accesible al solvente o mediante la superficie molecular. También mide el tamaño de las aperturas de las cavidades individuales.

Binkowski, A.; Naghibzadeh, S.; Liang, J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3352-3355.

Liang, J.; Edelsbrunner, H., Woodward, D. Anatomy of protein pockets and cavities: Measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1884-1897.