



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**MALBRANQUEAMIDAS: OBTENCIÓN A PARTIR DEL CRUDO ALCALOIDEO
DEL EXTRACTO FÚNGICO DEL HONGO *MALBRANCHEA AURANTIACA* Y
EVIDENCIAS ADICIONALES DE SU INTERACCIÓN CON LA CALMODULINA
UTILIZANDO MÉTODOS ENZIMÁTICOS Y ESPECTROSCÓPICOS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
AÑO:2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal:	Dra. Adela Rodríguez Romero
Secretario:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Primer Suplente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Segundo Suplente:	Dr. Francisco Hernández Luis

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Q.F.B. Abraham Madariaga Mazón
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Posgrado en Ciencias Químicas, que me a través de sus profesores y tutores he podido ampliar mis horizontes académicos y profesionales.

Al CONACyT por el apoyo otorgado a través de mi beca de Maestría.

Al CONACyT (Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología), y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado para la realización del presente proyecto.

Al Dr. Martín González Andrade, por su valioso apoyo en la realización de los estudios en fluorescencia, así como introducirme al mundo de la química computacional. Gracias Martín.

A la Dra. María del Carmen González, por proporcionar el material fúngico para trabajar en este proyecto, así como su asesoría en todo momento. Gracias.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez y a la M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz, por su asesoramiento técnico brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del jurado, por las revisiones y observaciones hechas sobre el escrito, valiosas críticas que sirvieron para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio 124, y a los que alguna vez estuvieron, Martha, Erika, Krutzkaya, Lupita, Viridiana, Karina, Magda, Fernando, Gerardo, Martín, Pepe, Sol y Paquito, que de alguna u otra forma estuvieron en todo momento y también forman parte del desarrollo de este proyecto.

A mis amigos de la facultad, que fueron y serán una gran parte de mi vida académica y de mis logros. Gracias.

Finalmente, y con un agradecimiento especial, a la Dra. Rachel Mata Essayag, por darme la oportunidad de seguir siendo parte de su equipo de trabajo, por las valiosas enseñanzas y experiencia que ha sabido expresar en todo momento y por todo el apoyo otorgado a lo largo del proyecto. Gracias.

DEDICATORIAS

Índice		Página
Lista de Figuras		iv
Lista de Cuadros y Tablas		vi
Lista de Abreviaturas		vii
1. Resumen		1
1.1 Abstract		3
2. Introducción		5
3. Antecedentes		7
3.1 Importancia de la proteína calmodulina		7
3.2 Antecedentes de la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i>		18
4. Objetivos		28
5. Hipótesis		29
6. Parte Experimental		30
6.1 Material fúngico		30
6.2 Análisis cromatográficos		30
6.3 Fermentación de la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i>		32
6.4 Estudio químico de la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i>		32
6.4.1 Preparación de los extractos orgánicos de <i>Malbranchea aurantiaca</i>		32
6.4.1.1 Fraccionamiento del extracto orgánico por CCA		33
6.4.1.2 Preparación del crudo alcaloideo del extracto orgánico		33
6.4.2 Separación y purificación de las malbranqueamidas presentes en el crudo alcaloideo		33
6.5 Cuantificación de malbranqueamida en distintos crudos alcaloideos por CLAE		34

6.5.1	Preparación del material fúngico	34
6.5.2	Extracción y preparación de los crudos alcaloideos	34
6.5.3	Cuantificación de la malbranqueamida por CLAE	34
6.6	Apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor fluorescente (<i>hCaM M124C-mBBr</i>)	35
6.6.1	Determinación de la interacción proteína-ligando mediante Dicroísmo Circular (DC)	36
6.7	Cálculos de acoplamiento molecular	37
6.7.1	Preparación de las estructuras para los cálculos	37
6.7.2	Optimización geométrica	37
6.7.3	Acoplamiento molecular	38
6.8	Ensayos biológicos	42
6.8.1	Determinación del potencial antimicrobiano de la malbranqueamida	42
6.8.1.1	Material biológico	42
6.8.1.2	Método de microdilución	42
6.8.1.3	Interpretación de los resultados	43
7.	Resultados y discusión	45
7.1	Procedimientos alternativos para mejorar el rendimiento y la producción de la malbranqueamida y sus análogos naturales	45
7.2	Fermentación de <i>M. aurantiaca</i> en presencia de la especie fúngica <i>Paecilomyces</i> 26014	48
7.3	Determinación de la interacción de las malbranqueamidas con la CaM	53
7.3.1	Mediante un método espectrofluorimétrico, utilizando el biosensor fluorescente <i>hCaM124C-mBBr</i>	53
7.3.2	Dicroísmo circular	56
7.3.3	Evaluación de la interacción proteína-proteína-ligando con el biosensor fluorescente	58

7.4 Estudios de Acoplamiento Molecular	61
7.5 Ensayos biológicos	81
7.5.1 Susceptibilidad antimicrobiana	81
8. Conclusiones	82
9. Perspectivas	84
10. Bibliografía	85

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Enzimas y proteínas reguladas por CaM en diferentes procesos fisiológicos (Tomado de Sharma 2003).	8
Figura 2. Las diferentes conformaciones tomadas por la proteína CaM: a) sin calcio (Apo CaM, PDB 1CFD), b) unida a Ca ²⁺ (CaM-Ca ²⁺ , PDB 1CLL), c) unido a un inhibidor clásico, la Trifluoperazina (TPZ, CaM-Ca ²⁺ -TPZ, 1A29), y d) formando un complejo con el péptido de la Cinasa de Cadena Ligera de la Miosina (Ca ²⁺ -CaM-MLCK, PDB 2K0F).	9
Figura 3. Modelo <i>in silico</i> de la mutación del residuo de cisteína y la unión del bimano. Las líneas rojas muestran los residuos de aminoácidos del sitio de unión en el complejo CaM-TFP, en verde se muestra el mBBr, en naranja a la TFP y en las esferas amarillas muestran los iones de calcio (Tomado de (Gonzalez-Andrade, Figueroa et al. 2009).	16
Figura 4. <i>Malbranchea aurantiaca</i> (Myxotrichaceae).	18
Figura 5. Biosíntesis de las malbranqueamidas propuesta por Ding y colaboradores (Ding, Greshock et al. 2008).	21
Figura 6. Análogos de la malbranqueamida sintetizados por Williams y colaboradores.	23
Figura 7. Modelo propuesto por AM con residuos flexibles para la interacción de la malbranqueamida con la CaM, mostrando a las Met de la proteína y los cambios conformacionales observados en éstos residuos en presencia del inhibidor (Figueroa 2009).	24
Figura 8. Cultivos de los hongos <i>Malbranchea aurantiaca</i> ^B , <i>Paecilomyces</i> 26014. ^C , y la mezcla de ambos ^A .	31
Figura 9. Esquema de la placa de 96 pozos empleada para el ensayo de la microdilución en caldo.	44
Figura 10. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo generado por una partición ácido-base de los extractos del medio de cultivo y micelio de <i>M. aurantiaca</i> .	46
Figura 11. Cromatograma de la mezcla de la malbranqueamida B (2) e isomalbranqueamida B (3), en una columna Nucleosil C ₁₈ Phenomenex®, empleando como fase móvil MeOH.	47
Figura 12. Cuantificación de la malbranqueamida (1) en cada uno de los CA en presencia del estándar interno emericelina. En el cultivo puro de <i>M. aurantiaca</i> : micelio (A) y medio de cultivo (B); en la mezcla fúngica: micelio (C) y medio de cultivo (D); y en <i>Paecilomyces</i> 26014: micelio (E) y medio de cultivo (D).	51

Figura 13. Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de Ca^{2+} - <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> en presencia de la clorpromazina (a), así como de los compuestos 1 (b), 2 (c), 3 (d) y 4 (e).	54
Figura 14. Dicroísmo circular en el UV-lejano de <i>hCaM</i> M124C- <i>mBBR</i> en presencia de Ca^{2+} (1 mM de CaCl_2). Amortiguador (■); Ca^{2+} : <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> -CPZ (●); Ca^{2+} : <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> : 1 (▲); Ca^{2+} : <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> : 2 (▼); Ca^{2+} : <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> : 3 (◆); Ca^{2+} : <i>hCaM</i> -M124C- <i>mBBR</i> : 4 (◀).	57
Figura 15 Formación del complejo CaM-Proteína al adicionar cantidades a saturación de las proteínas PDE1 (izquierda) y MLCK (derecha) al biosensor <i>hCaM</i> 124C- <i>mBBR</i> .	58
Figura 16. Titulación en fluorescencia de los complejos CaM- Ca^{2+} -PDE1 y CaM- Ca^{2+} -MLCK con la malbranqueamida (1) (a y c, respectivamente) y con la CPZ (b y d, respectivamente). La gráfica central muestra el apagamiento de la fluorescencia y el ajuste realizado se muestra en la gráfica interna.	59
Figura 17. Sitio de interacción con la CaM de los ligandos analizados (A), residuos de aminoácidos involucrados (B) y superposición de la TFP en el pocket (C) (PDB ID 1a29).	74
Figura 18. Superposición de los compuestos 8a (bastones naranjas) y 10a (bastones amarillos) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde), destacando los puentes de hidrógeno (líneas punteadas) con los residuos GLU12 y 7MET124, respectivamente.	75
Figura 19. (A) Estructura de la CaM mostrando el Potencial de Superficie (calculado mediante el software APBS) en donde colores rojos indican densidad negativa, blancos neutra, y azules positiva. (B) Amplificación del sitio de unión, mostrando el Potencial de Superficie y la sobreposición de los compuestos 11a (bastones amarillos), 8a (bastones naranjas) y 13a (bastones azules).	77
Figura 20. (A) Superposición de los compuestos 1 (bastones naranjas), 14a (bastones rojos), 15a (bastones morados) y 16a (bastones amarillos) en el sitio de unión a la CaM.	78
Figura 21. Superposición de la malbranqueamida (1 , bastones amarillos) con los análogos 15a (bastones azul) y la 16a (bastones naranjas).	79
Figura 22. Comparación del arreglo espacial de los compuestos 14a (bastones rojos) y el 8a (bastones amarillos).	79

Lista de Cuadros y Tablas

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Malbranchea aurantiaca</i> .	19
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de otras especies fúngicas del género <i>Malbranchea</i> .	25
Cuadro 3. Algunos de los alcaloides aislados de especies de <i>Paecilomyces</i> (Cheng, Schneider et al. 2004).	52
Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM.	13
Tabla 2. Análogos de la malbranqueamida estudiadas por acoplamiento molecular.	39
Tabla 3. Comparación entre los rendimientos de los productos 1-4 obtenidos por el método inicial y por el método de partición ácido-base.	48
Tabla 4. Rendimientos de los crudos alcaloides y extractos orgánicos de los medios de cultivo y micelio.	49
Tabla 5. Resultados del ensayo de fluorescencia, con el cálculo de los parámetros K_d y estequiometría para los compuestos 1-4 y CPZ. A manera de comparación, se muestran los resultados del Bioensayo Funcional (CaM-PDE1).	55
Tabla 6. Porcentaje de estructura secundaria (α -hélice) calculada para los complejos CaM-(1-4).	57
Tabla 7. Resultados del ensayo de fluorescencia, mostrando los parámetros K_d y estequiometría para los complejos CaM-PDE1 y CaM-MLCK con la malbranqueamida (1) y la CPZ.	60
Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces.	63
Tabla 9. Resultados del ensayo antimicrobiano para la malbranqueamida.	82

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
HCl	Ácido Clorhídrico
AM	Acoplamiento molecular
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
PDA	Agar Papa-Dextrosa
LGA	Algoritmo genético Lamarckiano
AAA	Arilalquilamida
ADT	AutoDock Tools
PDB	Banco de información de proteínas (Protein Data Bank)
CNA	Calcineurina
CaM	Calmodulina
MLCK	Cinasa de cadena ligera de la miocina
CPZ	Clorpromazina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CV	Coefficiente de variación
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
MIC	Concentración mínima inhibitoria
K_d	Constante de afinidad
K_i	Constante de inhibición
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CA	Crudo Alcaloideo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido

EFEB	Energía libre de unión estimada
PDE1	Enzima fosfodiesterasa del AMP cíclico
EE	Error Estándar
g	Gramos
GMPc	Guanosin Monofosfato cíclico
Hex	Hexano
kcal	kilocalorías
L	Litros
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
MH	Medio de cultivo Müeller Hinton
MeOH	Metanol
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
mBBr	Monobromobirmano
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
ppm	Partes Por Millón
PN	Producto natural
HB	Puentes de hidrógeno
FRET	Resonancia de Fluorescencia de Transferencia de Energía
RMN	Resonancia magnética nuclear
SSI	Solución salina estéril
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta

1. Resumen

Los objetivos principales de este trabajo fueron, por una parte, generar información adicional sobre la interacción de la malbranqueamida (1), la malbranqueamida B (2), isomalbranqueamida B (3) y premalbranqueamida (4), alcaloides aislados de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*, con la proteína calmodulina (CaM) misma que juega un papel importante en la transducción de señales del calcio y regula un número importante de procesos fisiológicos y patológicos. Así mismo, se pretendía desarrollar una estrategia de extracción que permitiera separar los productos 1-4 a partir del medio de cultivo y micelio del hongo con mejores rendimientos, y así contar con material suficiente para los estudios de interacción ligando-proteína *in vitro*.

Para mejorar los rendimientos de los alcaloides se optó por fraccionar los extractos derivados del micelio y medio de cultivo mediante un proceso de partición ácido base. Posteriormente, los alcaloides se separaron del crudo alcaloideo mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución. El método desarrollado permitió duplicar los rendimientos de los alcaloides. Así mismo, con la finalidad de estimular el aumento en la producción de las malbranqueamidas (1-4), se exploró la co-fermentación de *M. aurantiaca* en presencia del hongo *Paecilomyces* 26014, aislado del mismo de hábitat que el primero. Los resultados indicaron que la producción de los alcaloides característicos de *M. aurantiaca* no se ve alterada cuando crece en presencia del otro hongo. Sin embargo, se logró determinar la presencia de uno o más compuestos de naturaleza alcaloidea en el extracto orgánico de *Paecilomyces* 26014. Estos resultados parecen indicar que *M. aurantiaca* y *Paecilomyces* 26014 presentan una relación mutualista.

Para el análisis de la interacción proteína-ligando de las malbranqueamidas (1-4) con la proteína calmodulina, se realizaron experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca, dicroísmo circular, y de interacción proteína-proteína-ligando. El empleo del biosensor fluorescente *hCaMM124C-mBBr* permitió establecer que los

productos **1-3** se comportan como inhibidores clásicos de la CaM ya que apagaron de manera significativa la fluorescencia extrínseca de la proteína, en tanto que el producto **4** no provocó cambio alguno. Los resultados de estos experimentos fueron congruentes con las mediciones de dicroísmo ya que el tratamiento de la CaM con premalbranqueamida (**4**) no indujo modificaciones en el espectro de la proteína en contraste con los espectros en presencia de los productos **1-3** y la clorpromazina (CPZ).

Se demostró que la malbranqueamida (**1**) interacciona con dos complejos CaM-proteína: CaM-Ca²⁺-PDE1 y CaM-Ca²⁺-MLCK. El producto fúngico fue más afín al complejo CaM-Ca²⁺-PDE1 ($K_d=0.287\pm 0.088$ μ M), que al complejo CaM-Ca²⁺-MLCK ($K_d=0.550\pm 0.087$ μ M). Incluso la afinidad del alcaloide por el primer complejo fue mayor que la demostrada hacia la CaM-Ca²⁺ ($K_d=1.11\pm 0.08$ μ M). Esta selectividad podría tener implicaciones en el tratamiento trastornos en los que impliquen la participación de la CaM-Ca²⁺-PDE1.

Con el objetivo de establecer una relación estructura-afinidad de la malbranqueamida (**1**) y congéneres con la proteína CaM, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (AM). Se examinaron diferentes análogos sintéticos (**5a-11**) y propuestos (**12-14**) que diferían en el grado de cloración y posición de los halógenos en el anillo carbocíclico; grado de oxigenación en el biciclo[2.2.2]diazactano y en la estereoquímica relativa del H en C-12 (α vs β). También se analizó el impacto de la electronegatividad de los sustituyente en C-7 y C-8 (Br, F, y OH vs Cl) en la actividad de la malbranqueamida (**1**). Los resultados globales del análisis *in silico* y la comparación con los resultados de los ensayos *in vitro*, permitieron concluir que la malbranqueamida y sus análogos interaccionan en el mismo sitio de unión que el reportado para los inhibidores clásicos; y que la mejor afinidad se obtiene con los derivados biclorados que poseen un carbonilo en C-5 y que presentan una configuración relativa α en C-12.

1.1 Abstract

The present investigation was undertaken to generate additional information about the interaction of malbrancheamide (**1**), malbrancheamide B (**2**), isomalbrancheamide B (**3**) and premalbrancheamide (**4**), alkaloids from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, with the protein calmodulin (CaM): This protein serves as a ubiquitous intracellular receptor for Ca^{2+} . The Ca^{2+} /CaM complex initiates a plethora of signaling cascades through the regulation of different enzymes and ion channels that culminate in alteration of the cellular functions.

The second goal of this study was to develop an alternative strategy to obtain compounds **1-4** from the culture media and mycelia with better yields. In this endeavor, an acid-base partition of the mycelia and culture media organic extracts was explored. Afterward, the alkaloids were resolved through high performance liquid chromatography. By this methodology, the yields of the alkaloids were duplicated.

In an attempt to stimulate the biosynthesis of malbrancheamides, a co-fermentation of *M. aurantiaca* and *Paecilomyces* 26014, a fungus isolated from the same habitat that of *M. aurantiaca*, was also carried out. The results showed that the production of alkaloids in *M. aurantiaca* was not modified in the presence of *Paecilomyces* 26014. Nevertheless, one or more alkaloid-like compounds were detected in the organic extract of *Paecilomyces* 26014. Thus, *M. aurantiaca* and *Paecilomyces* 26014 seem to have a mutualist relationship.

Next, to evaluate the direct interaction of malbrancheamides (**1-4**) with CaM a series of experiments were completed. These included quenching of the extrinsic fluorescence, circular dichroism (CD) and enzymatic measurements. By using the fluorescent biosensor *hCaMM124C-mBBr*, it was concluded that compounds **1-3** behave as classical inhibitors of the protein. These results were confirmed by CD; this technique revealed that compound **4** did not induce any change in the secondary structure of the protein.

The affinity studies of malbrancheamide (**1**) with two different CaM-protein complexes (CaM-Ca²⁺-PDE1 and CaM-Ca²⁺-MLCK) indicated that **1** has higher affinity for the complex CaM-Ca²⁺-PDE1 ($K_d=0.287\pm 0.088$ μ M).

Finally, docking analysis of malbrancheamide (**1**) and some synthetic and designed analogs (**5a-14**) generated some important information regarding structure-affinity relationship. The best affinity is achieved with those bi-chlorinated derivatives possessing a carbonyl on C-5 and a relative α configuration in C-12 as in the case of compounds **8a**, **10a**, **5a** y **6a**.

2. Introducción

Un estudio reciente demuestra que el número de productos naturales aprobados y empleados *per sé* en la terapéutica ha incrementado en los últimos años. Así mismo los productos naturales (PN's) son la fuente más exitosa de moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos. Estos productos proporcionan mayor diversidad estructural que la química combinatoria estándar, y por lo tanto ofrecen mayores oportunidades para encontrar fármacos novedosos de bajo peso molecular y activos en contra de un amplio rango de blancos moleculares (Harvey 2000). De tal forma que el empleo de PN's como fuentes de moléculas líderes ha aumentado sensiblemente en las últimas décadas. Así por ejemplo, en el periodo de 1940 hasta 2006, de las 155 moléculas pequeñas aprobadas para el tratamiento del cáncer, el 47% son de origen natural o directamente derivados de estos (Newman and Cragg 2007).

Las fuentes biológicas de donde se pueden obtener estos productos son muy diversas, incluyendo plantas, animales y microorganismos, y en particular aquellas de hábitats poco explorados. Así, con menos del 10 % de la biodiversidad global analizada con miras a la obtención de nuevas entidades bioactivas, es factible que el número de moléculas activas, cabezas de serie o no, aumenten considerablemente en el futuro, en particular si se consideran los avances tecnológicos de las herramientas más utilizadas en el desarrollo de nuevos fármacos.

Los microorganismos han jugado un papel muy importante en el desarrollo de fármacos y moléculas líderes ya que producen una gran diversidad de metabolitos secundarios biodinámicos, muchos de los cuales representan la mitad de los productos de mayor uso comercial como agentes terapéuticos (Demain and Sanchez 2009).

Desde el descubrimiento de la penicilina y la estreptomicina, un gran número de antibióticos han sido aislados de microorganismos. Cerca del 70% de estos metabolitos bioactivos novedosos derivan de hongos y actinomicetos (Miyadoh 1993). Estas moléculas presentan estructuras originales y son inhibidores selectos de un gran

número de macromoléculas y rutas metabólicas de importancia en numerosos procesos patológicos (Donadio, Monciardini et al. 2002).

En este sentido, existen diversos blancos de acción que pueden ser explorados y por medio de los cuáles se pueden encontrar fármacos novedosos de origen natural con una potente actividad. Uno de esos blancos de acción es la calmodulina, una proteína ubicua que juega un papel importante en la transducción de señales de Ca^{2+} , y que recientemente se le ha implicado un papel importante en enfermedades degenerativas como el cáncer. De ahí la necesidad de tener un mejor entendimiento sobre su regulación y la interacción con sus ligandos (Jagadeesh, Padma et al. 2006).

En este marco de referencia, el presente trabajo se planteó con la finalidad de estudiar con mayor detalle la interacción proteína-ligando de las malbranqueamidas (**1-4**) con la calmodulina mediante diversas técnicas, incluyendo el dicroísmo circular, espectrofluorimetría y acoplamiento molecular. Las malbranqueamidas representan un nuevo grupo de alcaloides indólicos con un biciclo[2.2.2]diazaoctano inusual aislados de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*. En estudios funcionales previos se comprobó que inhiben el complejo CaM-PDE1 de manera importante. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios de interacción directa proteína ligando. Una limitante para ello han sido los bajos rendimientos de los alcaloides, motivo por el cual en el presente estudio se desarrolló un método para la obtención de los mismos en mayor cantidad.

3. Antecedentes

3.1 Importancia de la proteína calmodulina

Las vías metabólicas que dan lugar a eventos tan diversos como la liberación de hormonas o la contracción muscular, tienen en común la entrada de calcio a la célula. El calcio es uno de los segundos mensajeros a través de los cuales la célula puede traducir las señales, tanto eléctricas como químicas, que convergen en la membrana celular. La señal del calcio activa cascadas bioquímicas específicas, cuya finalidad es la de responder a los cambios en el medio ambiente para mantener la homeostasis celular (Carafoli and Penniston 1985; Brini and Carafoli 2000). Sin embargo, las concentraciones de calcio también deben ser reguladas. Para ello existen varias proteínas capaces de unirse a este catión para modular la transmisión y recepción de los mensajeros intracelulares. De estas proteínas posiblemente la más estudiada y mejor caracterizada es la calmodulina (CaM), una proteína ubicua, cuya función es la de regular diversos eventos celulares dependientes de Ca^{2+} , interactuando con un grupo heterogéneo de proteínas blanco tanto en células animales, como vegetales (Carafoli 1987).

Aunque la CaM carece de actividad enzimática, actúa como mediadora en el proceso de señalización por Ca^{2+} de muchas enzimas y canales iónicos presentes en las células. Se estima que la CaM puede interactuar con cerca de 100 diferentes enzimas (**Figura 1**), para así regular numerosas funciones celulares como son la secreción o liberación de sustancias, metabolismo, motilidad, transducción de señales, y crecimiento celular, entre otras (Chin and Means 2000). La CaM es una proteína pequeña (16-18 kD) compuesta por ~148 aminoácidos organizados en dos diferentes dominios globulares C- y N-terminales, conectados por una región relativamente flexible. Cuando la CaM interactúa con el Ca^{2+} , generalmente, su estructura cuaternaria cambia a un estado conformacional en donde expone sus sitios más hidrofóbicos ricos en metioninas, en la superficie interior de cada uno de sus dominios globulares EF (Chin and Means 2000; Martinez-Luis, Perez-Vasquez et al. 2007).

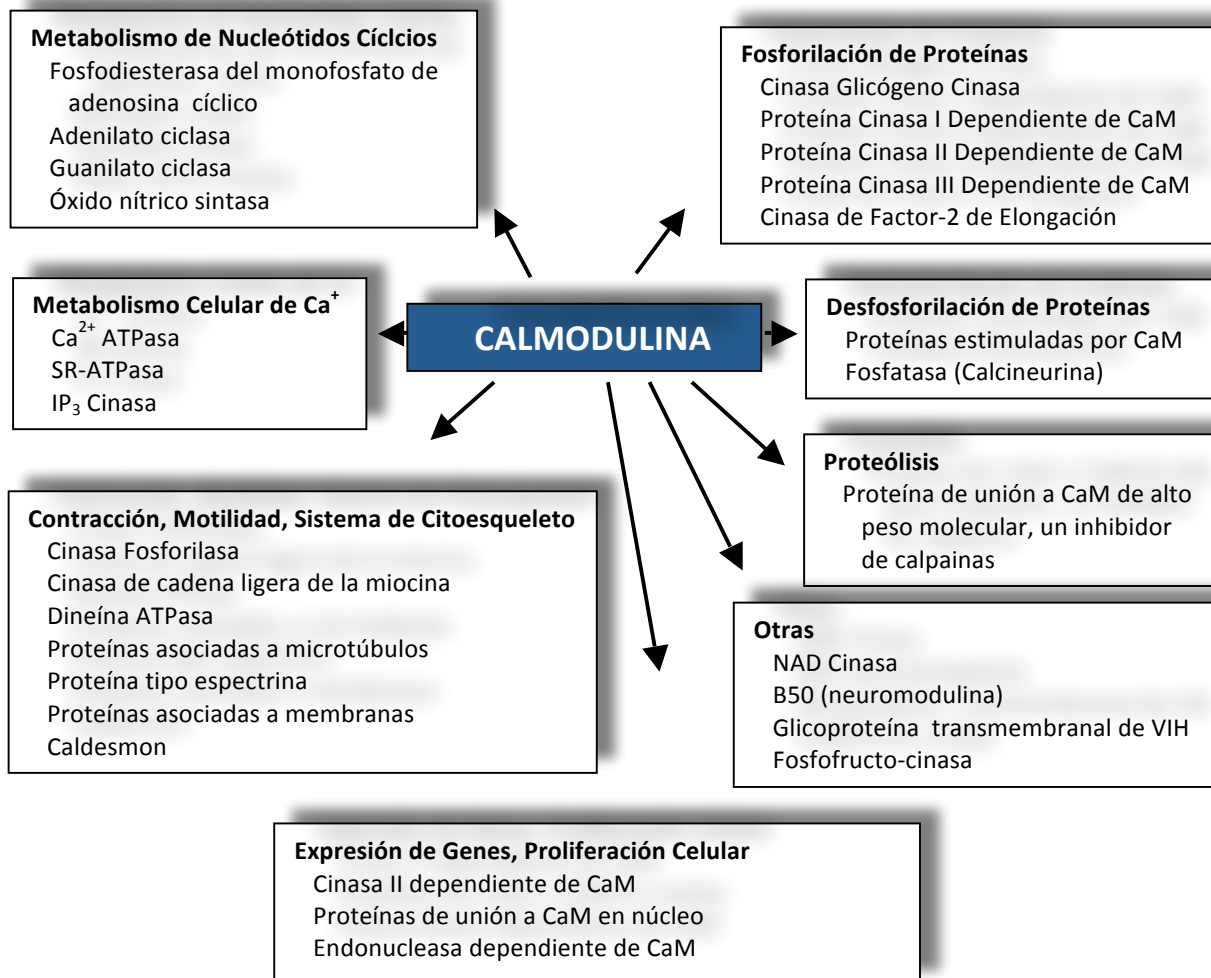


Figura 1. Enzimas y proteínas reguladas por CaM en diferentes procesos fisiológicos (Tomado de Sharma 2003).

Las áreas hidrofóbicas, ricas en residuos de metionina y con 12 a 30 aminoácidos contiguos cargados positivamente, componen la superficie principal para las interacciones con sus proteínas blanco. La estabilidad del complejo CaM-proteína es también debida a interacciones electrostáticas. De acuerdo a estudios en rayos X, los dos dominios globulares de CaM envuelven a la proteína blanco formando una estructura globular (**Figura 2**).

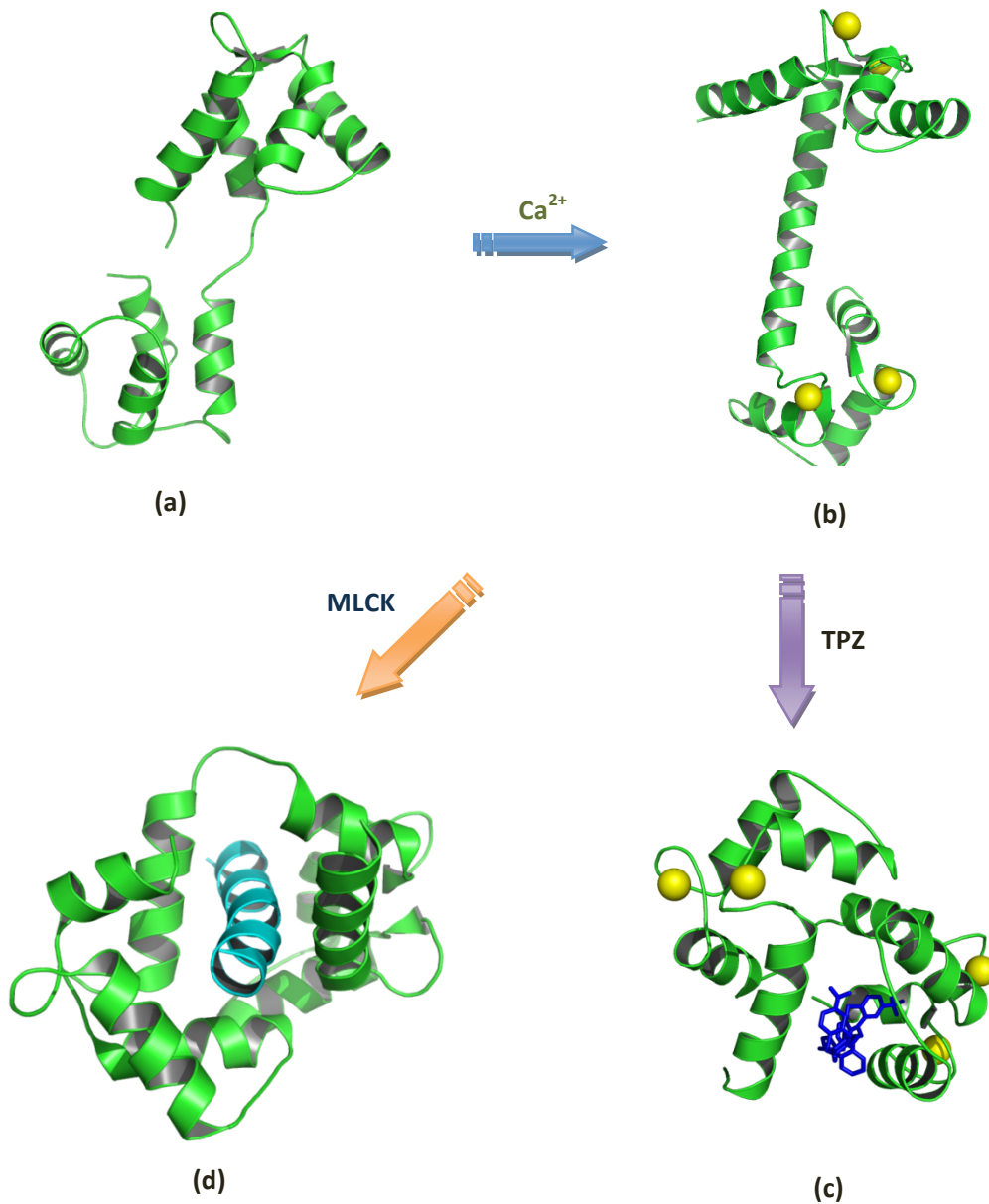


Figura 2. Las diferentes conformaciones tomadas por la proteína CaM: a) sin calcio (Apo CaM, PDB 1CFD), b) unida a Ca^{2+} (CaM- Ca^{2+} , PDB 1CLL), c) unido a un inhibidor clásico, la Trifluoperazina (TPZ, CaM- Ca^{2+} -TPZ, 1A29), y d) formando un complejo con el péptido de la Cinasa de Cadena Ligera de la Miosina (Ca²⁺-CaM-MLCK, PDB 2K0F).

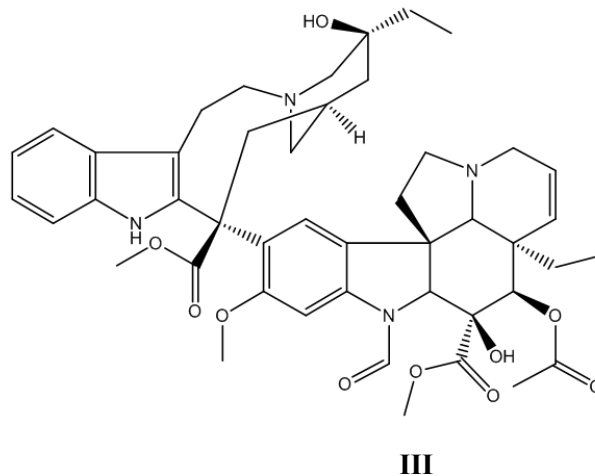
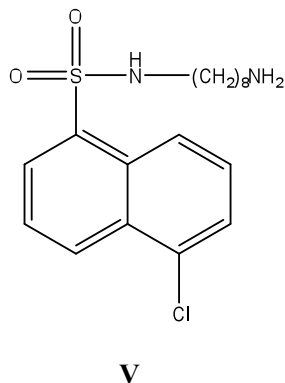
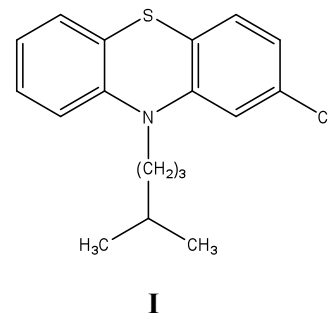
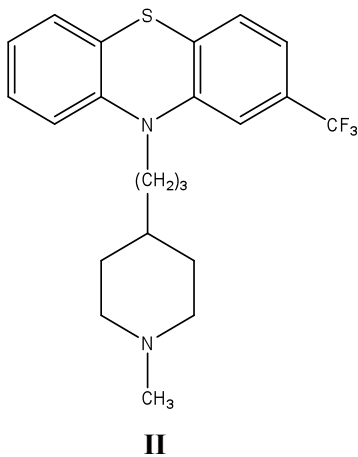
Las proteínas blanco de la CaM, comprenden un grupo diverso y con base en sus requerimientos del ion calcio, se dividen en tres categorías: aquellas que son dependientes de Ca^{2+} , incluyendo a la Calcineurina (CNA), la Óxido Nítrico Sintasa (NOS), adenilato ciclasa y la MLCK, localizadas principalmente en el citosol y citoesquelto; aquellas que son independientes del ion Ca^{2+} , entre las que destacan las MLCK tipo II presentes en el citoesqueleto, las neuromodulinas y las neurograninas; y por último, aquellas proteínas que son inhibidas por Ca^{2+} , de las cuáles se tiene poco conocimiento (O'Day 2003).

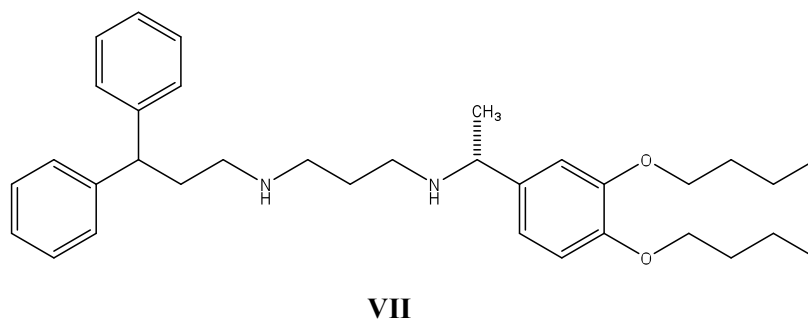
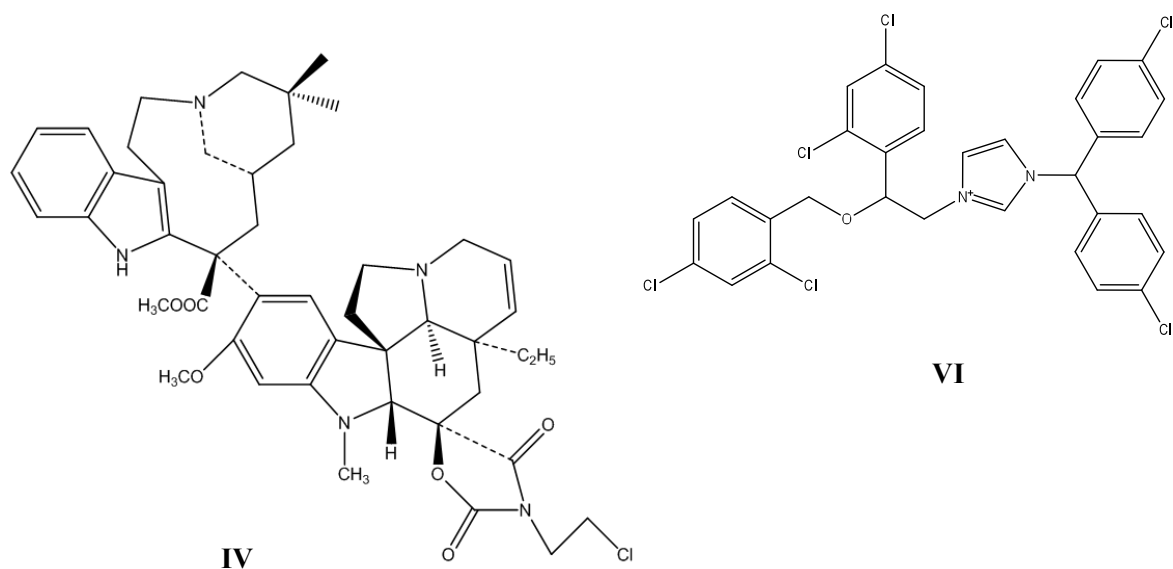
Entre las enzimas que interactúan con la CaM se encuentran las Fosfodiesterasas de Nucleótidos Cíclicos (PDE) que son responsables de finalizar la señalización de AMPc y GMPc intracelular; estas convierten los nucleótidos a sus formas inactivas 5'AMP y 5'GMP. Su expresión ubicua en organismos tan distintos como *Trypanosoma*, *Dictyostelium*, *Saccharomyces*, *Drosophila* y *Homo sapiens* destaca su importancia en la transducción de señales (Goraya and Cooper 2005).

Se han identificado hasta ahora 11 miembros de la superfamilia de las PDE, en las que pequeñas diferencias estructurales en sus dominios catalíticos determinan si la PDE es AMPc-específica (PDE5, PDE6, PDE9), GMPc-específica (PDE5, PDE6, PDE9) o actúa sobre los dos sustratos (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, PDE11). Desde los estudios de Kakiuchi y Yamazaki (Kakiuchi 1970), es bien conocido que la PDE1 está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos y otros eucariotas. Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad y está bien caracterizada en términos de sus propiedades moleculares. (Kakkar, Raju et al. 1999). De estas enzimas la PDE1 y la PDE2 son dependientes de CaM. En particular la PDE1 es de importancia para el presente trabajo ya que es la más usada para detectar inhibidores de la CaM mediante ensayos funcionales.

Debido a la gran importancia que tiene la CaM como proteína moduladora de enzimas con actividades fisiológicas de gran importancia, se han estudiado diversos compuestos que presentan actividad anti-CaM. Entre los fármacos más importantes que inhiben a la CaM se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina: clorpromazina (I) y trifluoperazina (II), un grupo de tranquilizantes altamente

conocidos, así como los antitumorales vincristina (III) y KAR-2 (IV). El compuesto W7 (V) y el calmidazolio (VI) son otros inhibidores de la calmodulina ampliamente utilizados como herramientas de investigación en procesos en los que participa la CaM. De igual manera, se cuenta con los inhibidores de la CaM pertenecientes a las arilalquilamidas, naftalensulfonamidas y felodipinas. Con excepción de los fármacos calmidazolio y la arilalquilamida AAA (VII), todos los antagonistas se unen a la CaM con una constante de afinidad menor que la observada para la interacción de la CaM con algunos de sus péptidos blanco a nivel molecular (K_d micromolar vs K_d nanomolar).





Los inhibidores de la CaM pueden actuar en diferentes formas, ya sea uniéndose directamente a la proteína, o bien al complejo CaM-enzima. Los inhibidores de la calmodulina han sido detectados por diferentes métodos, la mayoría de ellos *in vitro*. Algunos de los métodos más utilizados para este fin, se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM.

Método	Descripción	Referencias
Cromatografía de afinidad	Es un método específico, sin embargo es de alto costo y laborioso.	(Yurimoto, Hatano et al. 2009)
Electroforesis nativa en gel	Siguió el cambio en la movilidad electroforética del complejo CaM-ligando. Es una buena herramienta para detectar eventos de unión. Es cualitativa, relativamente simple, pero poco robusta.	(Charpentreau, Jaworski et al. 2004)
Espectroscopía UV	Los cambios conformacionales que afectan el ambiente de los residuos aromáticos de la CaM debidos a su interacción con cualquier ligando se pueden medir por espectroscopía de absorción en el UV. Es muy simple, pero poco sensible porque la CaM carece de triptófano.	(Crouch and Klee 1980; Jaren, Harmon et al. 2000)
Espectroscopía diferencial UV-DC	La espectroscopía de DC en longitud de onda cercana al UV es considerada uno de los métodos más sensibles para seguir pequeños cambios en la conformación de la proteína inducida por unión de ligandos en solución. Una de las desventajas, es la gran cantidad de proteína requerida, así como la necesidad de sistemas acuosos para la medición, ya que absorben en el mismo rango en donde las características estructurales exhiben absorción diferencial de la luz polarizada circularmente.	(Masino, Martin et al. 2000; Horvath, Harmat et al. 2005)
Fluorescencia intrínseca	La CaM contiene dos residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina y fenilalanina) que contribuyen a su fluorescencia intrínseca. Ésta requiere poca cantidad de material (proteína y ligando). La respuesta es muy sensible a cambios locales estructurales promovidos por la unión del ligando. Las principales ventajas experimentales son: alto rango de concentración, tiempos de medición rápidos y diferentes configuraciones del equipo instrumental.	(VanScyoc and Shea 2001)

Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM (Continuación).

Método	Descripción	Referencias
Resonancia de Fluorescencia de Transferencia de Energía (FRET)	FRET es una técnica que monitorea la distancia entre diferentes sondas fluorescentes que son unidas a CaM. Involucra la transferencia de energía de un estado excitado del donador al estado excitado del aceptor. Esta técnica puede ser utilizada para monitorear ya sea las interacciones de unión entre diferentes moléculas o los cambios conformacionales en la misma molécula. Es usada tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . Es un método poderoso y sensible para investigar distancias moleculares y cambios conformacionales en complejos CaM-ligando. Puede ser cualitativa (viendo si una molécula es cercana a otra) o cuantitativa (midiendo el equilibrio de unión o la cinética de unión).	(Allen, Urbauer et al. 2004; Gangopadhyay, Grabarek et al. 2004)
Resonancia Magnética Nuclear	Los métodos de RMN multidimensional heteronuclear proveen información estructural detallada sobre las interacciones proteína-ligando en solución. En estos procedimientos, la CaM marcada con ^{15}N y ^{13}C es titulada con los ligandos. La técnica provee una herramienta eficiente que describe detalles estructurales sobre los complejos proteína-ligando. También es posible determinar el sitio de unión y conformaciones de los ligandos, receptores y complejos, con la ayuda de experimentos de RMN como tr-NOESY y HSQC.	(Chou, Li et al. 2000; Lalor, Schnyder et al. 2003)
Difracción de Rayos X	La cristalografía de Rayos X es un método poderoso para estudiar las estructuras de las proteínas y sus ligandos. Esta técnica provee detalles de aproximación atómica de los complejos proteína-ligando y ofrece una vista detallada de su arreglo espacial y sus interacciones. Las principales limitantes de éste método son las muestras de proteína cristalina apropiadas y el hecho de que la proteína puede tener una conformación significativamente diferente en el cristal que en solución.	(Babu, Sack et al. 1985; Babu, Bugg et al. 1988; Okubo and Okada 1998; Vertessy, Harmat et al. 1998; Acharya and Lloyd 2005)

Tabla 1. Algunos métodos útiles en la detección de inhibidores de la CaM (Continuación).

Método	Descripción	Referencias
Métodos enzimáticos funcionales	Los métodos enzimáticos funcionales miden la inhibición de la actividad enzimática modulada por la CaM, siendo la Fosfodiesterasa del AMPc dependiente de CaM, la más utilizada. La MLCK, la Ca ²⁺ -ATPasa y la calcineurina, son otras enzimas reguladas por CaM empleadas para detectar antagonistas de la CaM.	(Sharma and Wang 1979; Chock and Huang 1984; Harmon, Jarrett et al. 1984; Mata, Bye et al. 2003)
Mutagénesis sitio-dirigida	Esta técnica proporciona un medio para obtener información sobre sitios de unión a CaM, así como determinar si una región está involucrada en unión a CaM.	(Odom, Del Poeta et al. 1997)
Métodos computacionales	Los métodos computacionales son usados para la caracterización de sitios de unión de proteínas efectoras, especialmente ahora que la información estructural sobre proteínas está disponible en bancos de datos (PDB). En el diseño de fármacos en general, las estrategias de modelado para optimizar la afinidad de unión receptor-ligante están principalmente enfocadas en la detección del sitio funcional, esto es, en localizar los sitios de unión de una superficie en la proteína, seguido de la consideración de la similitud del sitio funcional, y su validación, a través de acoplamiento molecular (<i>docking</i>).	(Gabdoulline and Wade 2002; Ladbury and Williams 2004)
Biosensores de fluorescencia	Se basa en el uso de biomoléculas que transducen eventos de unión en señales fluorescentes detectables y que recientemente demostraron ser herramientas útiles para detectar inhibidores de la CaM.	(Allen, Urbauer et al. 2004; Gonzalez-Andrade, Figueroa et al. 2009)

De los métodos mencionados en la **Tabla 1**, aquellos basados en fluorescencia son altamente específicos, de bajo costo, selectivos, y con tiempos de reacción relativamente rápidos, aunque algunas veces la preparación del elemento sensible puede ser laboriosa. Entre los métodos basados en fluorescencia, el uso de CaM marcada con fluoróforos en uno o más sitios específicos ha ganado gran popularidad. Uno de los procedimientos más usados incluye la unión covalente a la CaM de un fluoróforo tiol-reactivo estratégicamente localizado a través de un proceso de mutagénesis de cisteína sitio-dirigidas. De esta manera, es posible correlacionar los cambios conformacionales con la unión de ligandos por el cambio en las propiedades de emisión de las proteínas marcadas.

Recientemente, González-Andrade y colaboradores (Gonzalez-Andrade, Figueroa et al. 2009) diseñaron una proteína marcada con un fluoróforo, la calmodulina *hCaMM124C-mBBr*, útil para la identificación de inhibidores de la CaM. Esto se realizó reemplazando la Met124 por cisteína, empleando mutagénesis sitio-dirigida; la proteína resultante, *hCaMM124C*, se purificó y posteriormente se le introdujo covalentemente el fluoróforo monobromobirmano (mBBr) en la posición correspondiente a la Cys124 de la nueva proteína.

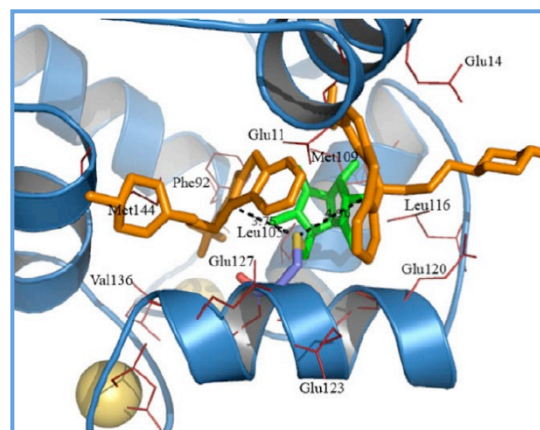
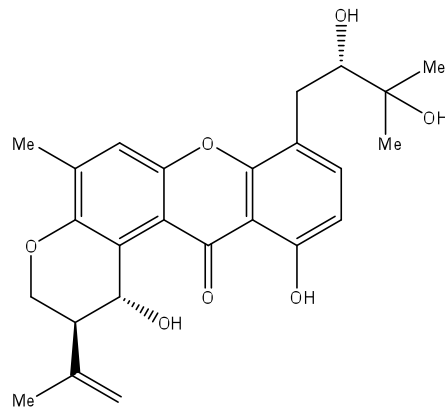


Figura 3. Modelo *in silico* de la mutación del residuo de cisteína y la unión del bimanio. Las líneas rojas muestran los residuos de aminoácidos del sitio de unión en el complejo CaM-TFP, en verde se muestra el mBBr, en naranja a la TFP y en las esferas amarillas muestran los iones de calcio (Tomado de (Gonzalez-Andrade, Figueroa et al. 2009).

Este biosensor fue utilizado exitosamente para medir las propiedades inhibitorias de la CaM de la CPZ (**I**), un inhibidor clásico de la CaM, y de dos productos naturales, la malbranqueamida (**1**) y el hidrato de tajixantona (**VIII**, Figueroa, Gonzalez Mdel et al 2009) que previamente habían demostrado propiedades inhibitorias del complejo CaM-PDE1.



(VIII)

Los resultados demostraron que estos productos se unieron a la proteína marcada, y que los valores de IC_{50} fueron comparables a aquellos obtenidos para la proteína en su forma nativa. Estos resultados permitieron validar el uso de la *hCaM* M124C-mBBR como un biosensor de fluorescencia, el cual representa una herramienta analítica poderosa útil en la búsqueda de nuevos fármacos con un efecto sobre la CaM.

3.2 Antecedentes de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* (Myxotrichaceae) Sigler & Carmichel

Malbranchea aurantiaca (**Figura 4**) es un ascomiceto descrito taxonómicamente por Sigler y Carmichel en 1976. La especie se ha aislado del suelo, polvo casero, hospitales y excremento de animales en la India, Centro América, Australia, Estados Unidos de Norteamérica y Bélgica. Estas cepas pueden ser moderadamente o marcadamente queratolíticas (Singh, Mishra et al. 2009).

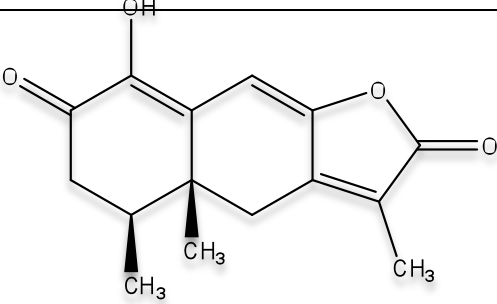
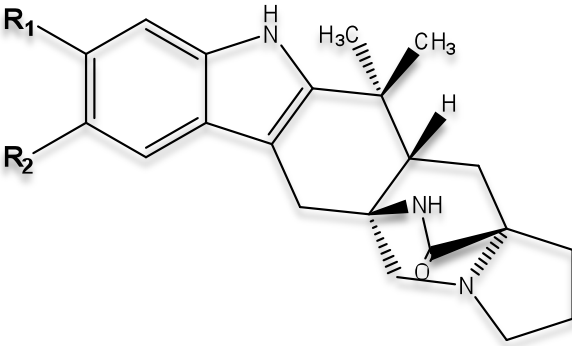


Figura 4. *Malbranchea aurantiaca* (Myxotrichaceae).

La especie *M. aurantiaca*, aislada de guano de murciélago en las Cuevas de Guerrero, México, ha sido objeto de varios estudios químicos, mismos que permitieron el aislamiento de un eremofilano (**IX**), el ácido penicilínico y cuatro alcaloides indolmonoterpenoides (**1-4**) que contienen un núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano (**Cuadro 1**). Los alcaloides se designaron con los nombres triviales de malbranqueamida (**1**), malbranqueamida B (**2**), isomalbranqueamida (**3**) y premalbranqueamida (**4**); sus estructuras se establecieron por métodos espectroscópicos, espectrométricos y, en el caso de **1** hasta por difracción de rayos X (Figuroa, Gonzalez Mdel et al. 2008; Madariaga-Mazón 2008). Por último, Ding y colaboradores (Ding, Greshock et al. 2008) detectaron la premalbranqueamida (**4**), el análogo no halogenado de la malbranqueamida en el medio de cultivo de *M. aurantiaca*. En el estudio de Ding se propone que la premalbranqueamida es el precursor de las otras malbranqueamidas y de hecho la incorporación de la premalbranqueamida marcada isotópicamente con ^{13}C a la malbranqueamida B (**2**) da sustento a esta propuesta. Desafortunadamente el precursor no se incorporó eficientemente en la malbranqueamida. La biosíntesis de las malbranqueamidas propuesta por Ding se esquematiza en la **Figura 5**. Los autores proponen también, que el biciclo [2.2.2] diazaoctano de los las malbranqueamidas, al igual que para otros alcaloides similares, se genera a través de una reacción intramolecular de Diels-Alder entre un azadieno intermediario y una unidad de isopreno tal como se ilustra en la **Figura 5**.

Entonces, las malbranqueamidas están relacionadas, no sólo estructuralmente, sino también biogenéticamente, con las parahercuamidas, brevianamidas, notamidas y estefacidinas. Los alcaloides pertenecientes a estos cuatro grupos se generan también a partir del triptófano, una o más unidades de isopreno, y prolina (Williams and Cox 2003).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de *Malbranchea aurantiaca*

Especie	Compuesto															
	 <p data-bbox="646 726 1292 762">1-hidroxi-2-oxoeremofil-1,7,8-trien-12-olida (IX)^a</p>															
<p data-bbox="318 877 509 909"><i>M. aurantiaca</i></p> <p data-bbox="305 919 522 1035">^a(Martinez-Luis, Rodriguez et al. 2006)</p> <p data-bbox="298 1045 529 1161">^b(Figuroa, Gonzalez Mdel et al. 2008)</p> <p data-bbox="302 1171 526 1245">^c(Ding, Greshock et al. 2008)</p>	 <table data-bbox="711 1360 1256 1623"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Malbranqueamida (1)^a</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Malbranqueamida B (2)^b</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Isomalbranqueamida B (3)^b</td> <td>H</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>Premalbranqueamida (4)^c</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R₁	R₂	Malbranqueamida (1) ^a	Cl	Cl	Malbranqueamida B (2) ^b	Cl	H	Isomalbranqueamida B (3) ^b	H	Cl	Premalbranqueamida (4) ^c	H	H
	R₁	R₂														
Malbranqueamida (1) ^a	Cl	Cl														
Malbranqueamida B (2) ^b	Cl	H														
Isomalbranqueamida B (3) ^b	H	Cl														
Premalbranqueamida (4) ^c	H	H														

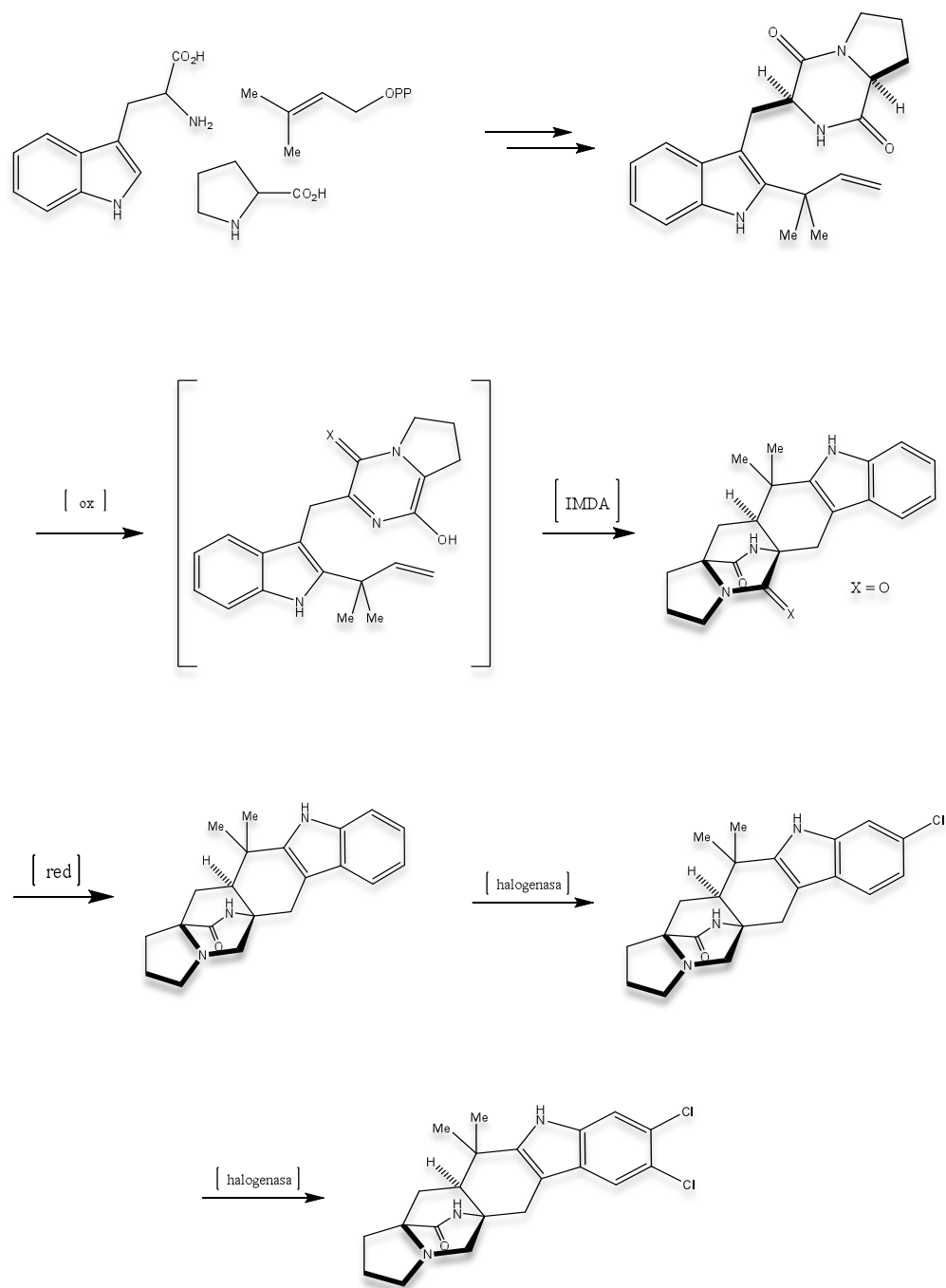


Figura 5. Biosíntesis de las malbrancheamidas propuesta por Ding y colaboradores (Ding, Greshock et al. 2008).

La malbranqueamida (**1**) inhibe de manera significativa la germinación y el crecimiento radicular de semillas de amaranto; su actividad inhibitoria se encuentra en el mismo rango de concentración que la del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (**1** $CI_{50} = 0.37\mu\text{M}$ para **1**; 2,4-D $CI_{50} = 0.18\mu\text{M}$). Además, presenta un marcado efecto anti-CaM el cual se estableció mediante un ensayo funcional enzimático, utilizando a la PDE-1 como enzima monitora. Los resultados demostraron que la malbranqueamida inhibía de manera dependiente de la concentración el complejo CaM-Ca^{2+} -PDE1 de manera comparable a la clorpromazina, un antagonista bien caracterizado de la CaM (Martínez-Luis 2007).

Posteriormente se determinó el efecto de una serie de análogos sintéticos de la malbranqueamida (**1**) (Miller, Figueroa et al. 2008) sobre la actividad enzimática de la PDE1 en presencia de CaM. Los productos químicos fueron proporcionados por el Dr. Robert Williams de la Universidad de Colorado, USA. Los resultados proporcionaron información valiosa acerca de la influencia de la presencia de los átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol, la configuración relativa en C-12a y el grado de oxidación del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano en la actividad anti-CaM de estos compuestos. Así, la mejor actividad inhibitoria del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 se observó en los compuestos con dos átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol como en el caso de la malbranqueamida (**1**) y la mezcla racémica del producto obtenido por síntesis (**1a**). La actividad de los productos que no presentan átomos de cloro, como en el caso de la premalbarnaqueamida sintética y los análogos **5a**, **6a**, **11a**, **12a** y **13a**, fue mucho menor. En el caso de los isómeros estructurales **2**, *epi-2*, **3** y *epi-3* que presentan un sólo átomo de cloro en su estructura, la actividad inhibitoria sobre el complejo CaM-PDE1 también disminuye de manera significativa, obteniéndose valores de potencias relativas menores a 0.5. Por otro lado, es importante destacar que en todos los casos la potencia relativa de los racematos de **1** y **2**, obtenidos por síntesis, fue mayor a la presentada por el correspondiente enantiómero natural. Estos resultados parecen indicar que los enantiómeros levorrotatorios son más activos que los dextrógiros

naturales. Los derivados del análogo *epi*-malbranqueamida (**1b**) fueron esencialmente inactivos, indicando la importancia de la configuración del centro asimétrico C-12a. Por último, la falta de actividad de los compuestos **1b** y **9a** indica que además de la estereoquímica en C-12a, la presencia de los residuos amida en C-5 y C-14 son importantes para una mejor actividad (**Figura 6**).

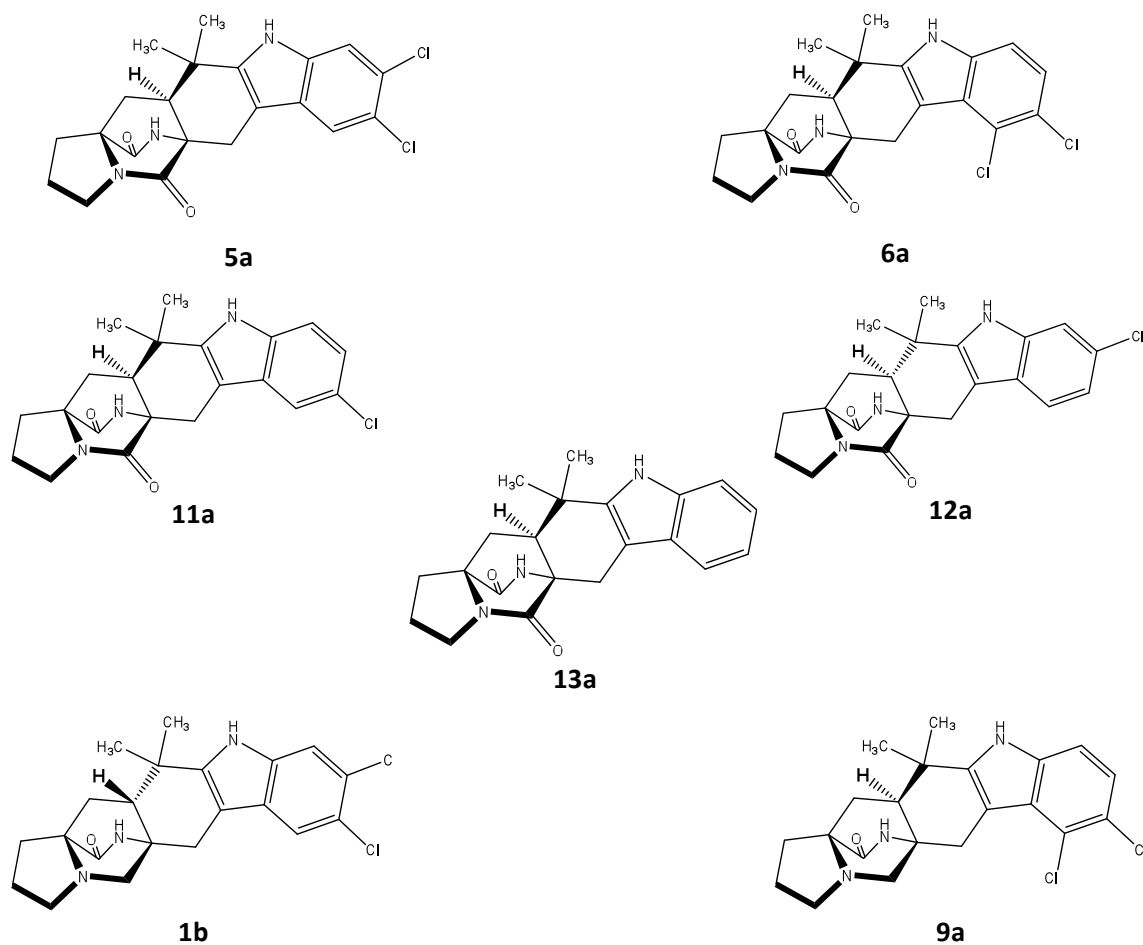


Figura 6. Análogos de la malbranqueamida sintetizados por Williams y colaboradores.

Como parte de un estudio complementario acerca de la interacción de la malbrancheamida con la proteína calmodulina, Figueroa (Figueroa 2009) realizó estudios de acoplamiento molecular (AM) empleando una estructura cristalográfica de la proteína obtenida del Protein Data Bank (PDB, código 1a29). De este estudio, se logró obtener el modelo que muestra los residuos de aminoácido (Metioninas 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145) como sitio de unión de la malbrancheamida a la proteína (**Figura 7**).

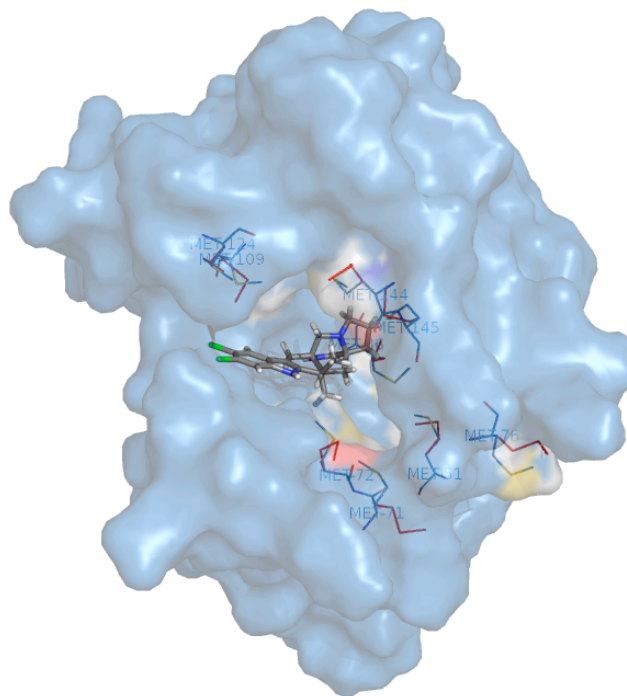


Figura 7. Modelo propuesto por AM con residuos flexibles para la interacción de la malbrancheamida con la CaM, mostrando a las Met de la proteína y los cambios conformacionales observados en éstos residuos en presencia del inhibidor (Figueroa 2009).

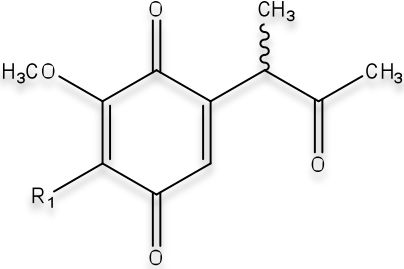
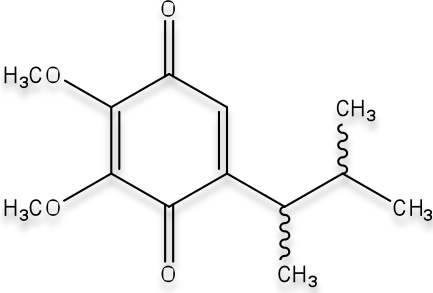
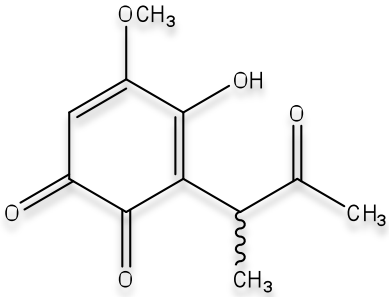
Finalmente, cabe señalar que a partir de otras especies del género *Malbranchea* se han aislado otros metabolitos pertenecientes a las categorías de las benzoquinonas, hidroquinonas, benzofuranos, γ -pironas y otros compuestos aromáticos. En el **Cuadro 2** se presentan ejemplos selectos de metabolitos aislados y caracterizados de *M. sulfurea*, *M. pulchella*, *M. cinnamomea* y *M. filamentosa*. Algunos de los compuestos

presentan actividad biológica, tales como antioxidantes (XI), antibacterianos (X, XI y XIII), vasodilatadores (XII).

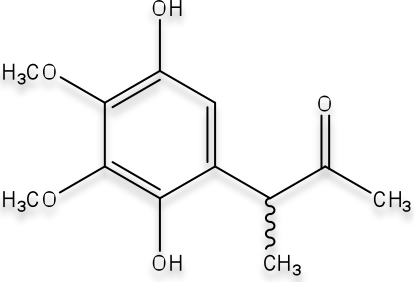
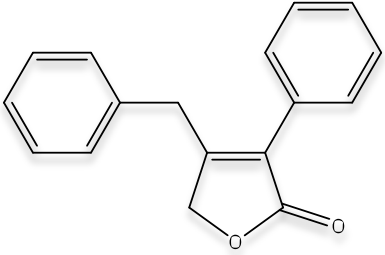
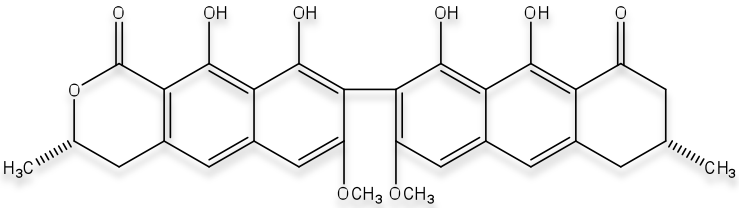
Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de otras especies fúngicas del género *Malbranchea*.

Especie	Compuesto
<p><i>M. sulfurea</i> (Yang, Liao et al. 2009)</p>	<p> $R_1, R_3 = \text{CH}_3$, Malbranpirrol A $R_2, R_3 = \text{CH}_3$, Malbranpirrol C $R_2, R_3 = \text{H}$, Malbranpirrol E </p>
	<p> $R_5, R_6 = \text{CH}_3$, Malbranpirrol B $R_4, R_6 = \text{CH}_3$, Malbranpirrol D $R_4, R_3 = \text{H}$, Malbranpirrol F </p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de otras especies fúngicas del género *Malbranchea* (continuación).

Especie	Compuesto
<p><i>M. cinnamomea</i> (Schlegel, Hanel et al. 2003)</p>	 <p>$R_1 = H$ Malbranicina (X) $R_1 = CH_3$ 7-Metoximalbranicina I (XI)</p>
	 <p>7-Metoximalbranicina II (XII)</p>
	 <p>7-Metoximalbranicina III (XIII)</p>

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de otras especies fúngicas del género *Malbranchea* (continuación).

Especie	Compuesto
<p><i>M. cinnamomea</i> (Schlegel, Hanel et al. 2003)</p>	 <p>7-Metoximalbrancina IV (XIV)</p>
<p><i>M. filamentosa</i> (Hosoe, Iizuka et al. 2005)</p>	 <p>4-Benzil-3-fenil-5H-furan-2-ona (XV)</p>
<p><i>M. pulchella</i> (Saito, Matsuura et al. 1979)</p>	 <p>TF-26VX (XVI)</p>

4. Objetivos

Generales

- Generar información adicional sobre el efecto de la malbranqueamida y sus análogos sobre la proteína calmodulina con la finalidad de completar los estudios de la interacción proteína-ligando mediante la aplicación de ensayos no funcionales y así explorar con mayor detalle el potencial de estos productos fúngicos como fármacos y/o herramientas de investigación.
- Desarrollar un método de obtención y purificación de las malbranqueamidas, a partir del medio de fermentación de *Malbranchea aurantiaca* con la finalidad de mejorar los rendimientos.

Particulares

- Determinar la interacción potencial de las malbranqueamidas con la proteína calmodulina utilizando las técnicas de dicroísmo circular y espectrofluorimetría con la finalidad de establecer si los productos interaccionan directamente con la proteína o sus complejos proteicos.
- Determinar las constantes de afinidad y la estequiometría del complejo CaM-ligando de las malbranqueamidas con la finalidad de establecer su actividad en relación con la de la clorpromazina, un inhibidor clásico de la CaM.
- Realizar estudios de Acoplamiento Molecular (AM) de la malbranqueamida y diferentes análogos para determinar su sitio de unión probable a la proteína, así como obtener información relevante acerca de la relación estructura-afinidad en la interacción proteína-ligando de esos productos.
- Valorar si la aplicación del procedimiento general de extracción de alcaloides mediante una partición ácido base mejora el rendimiento de las malbranqueamidas.
- Determinar la influencia en la cantidad de malbranqueamida producida en una fermentación conjunta de *M. aurantiaca* y *Paecilomyces* 26014.

5. Hipótesis

- La aplicación de métodos de extracción basados en una reacción química reversible podría incidir en la extracción selectiva de un grupo de productos químicamente definidos y con ello incrementar su rendimiento.

- La co-fermentación de dos organismos fúngicos puede alterar la producción en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

- La interacción directa de las malbranqueamidas con la CaM modificarán la conformación de la proteína lo cual se podrá establecer mediante el análisis espectroscópico de los complejos resultantes.

- El estudio teórico de la malbranqueamida y sus análogos permitirá establecer el sitio probable de unión así como las principales características estructurales necesarias para una mayor afinidad por la proteína calmodulina.

6. Parte Experimental

6.1 Material Fúngico

La especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* (Myxotrichaceae) se aisló en forma pura a partir de una mezcla de dos hongos separada de guano de murciélago en las Cuevas de Juxtlahuaca, localizadas en el Ramal del Infierno, estado de Guerrero, México, en el año 1998. La segunda especie de la mezcla original de dos hongos se caracterizó como un ascomiceto miembro del género *Paecilomyces* (*Paecilomyces* 26014) y se aisló en forma pura durante el transcurso del presente trabajo. La **Figura 8** muestra estas dos especies fúngicas, tanto en mezcla, como aisladas.

La identidad y clasificación de las especie fue establecida por la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM). En la colección de Micopatología, Instituto de Biología, UNAM se mantiene un cultivo de referencia de cada especie (No. de referencia de *Malbranchea aurantiaca*: 24428; No. de referencia de *Paecilomyces* 26014).

6.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones, empleando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon soluciones de sulfato cérico amoniacal, Dragendorff y Ehrlich.

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron utilizando como fase estacionaria gel de sílice (gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck®), y empleando diferentes sistemas de elución como eluyentes (Hex, CH₂Cl₂ y MeOH). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV Dual (2487). El control del equipo, la adquisición de

datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower® versión 2.0 (Waters). Los análisis cromatográficos se realizaron en columnas empacadas con dimetiloctadecilsilil (HCR-C₁₈) SymmetryPrep™ 7µm (Waters®) [7.8 × 300 mm, 2.0 mL/min], Symmetry® 5 µm (Waters®) [4.6 × 250 mm, 0.6 mL/min] o Nucleosil™ 5µm (Phenomenex®) [10 × 250 mm, 3.5 mL/min]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 235 nm y de 295 nm.

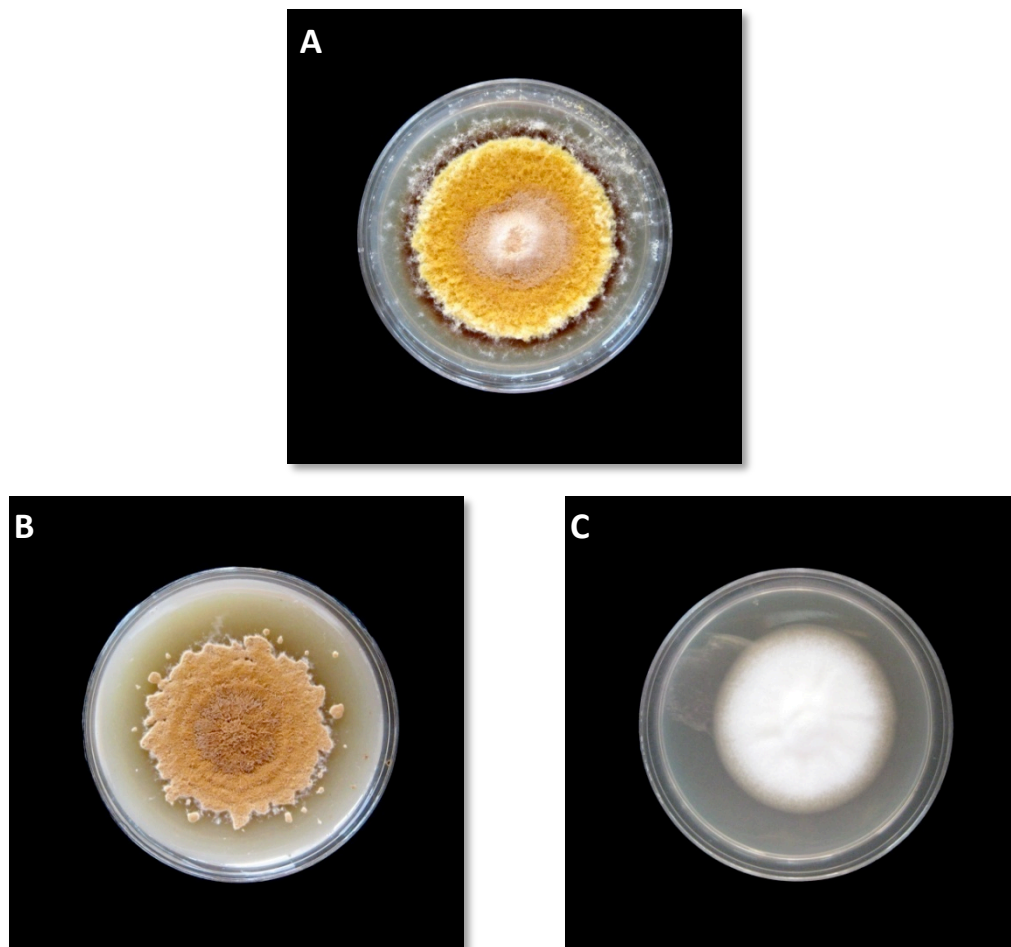


Figura 8. Cultivos de los hongos: (B) *Malbranchea aurantiaca*, (C) *Paecilomyces* 26014, y (A) la mezcla de ambos.

6.3 Fermentación de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*

La fermentación del hongo se realizó en medio de cultivo caldo papa-dextrosa (PDB) comercial (37 L; Difco®), empleando las siguientes condiciones: crecimiento estático, temperatura ambiente y ciclos de luz-oscuridad normal, durante un periodo de 30 días. Cabe destacar que estas condiciones se establecieron a través de ensayos preliminares en pequeña escala (Martínez-Luis, Rodríguez et al. 2006; Madariaga-Mazón 2008). El inóculo consistió en un cubo de agar sólido de 1 cm² conteniendo el microorganismo desarrollado con antelación por 15 días en cajas de Petri con agar papa-dextrosa (PDA).

6.4 Estudio químico de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*

6.4.1 Preparación de los extractos orgánicos de *Malbranchea aurantiaca*

Al cabo de la fermentación, el micelio (biomasa) y el medio de cultivo del hongo se separaron mediante una filtración simple a través de gasa estéril. El extracto orgánico del medio de cultivo se preparó mediante particiones sucesivas con CH₂Cl₂. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Por otro lado, el micelio se sometió a un proceso de maceración utilizando el mismo disolvente (CH₂Cl₂), por un periodo de ocho días. El extracto resultante de la maceración se filtró a través de una gasa estéril y el disolvente orgánico se eliminó al vacío. Los dos extractos resultantes (micelio y caldo de fermentación) se analizaron por CCF y se reunieron debido a su similitud cromatográfica. El rendimiento total del extracto total fue 12 g.

6.4.1.1 Fraccionamiento del extracto orgánico por CCA

Parte del extracto orgánico seco (6 g) fraccionó mediante una CCA sobre gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de disolventes (Hex, CH₂Cl₂ y MeOH) con un incremento gradual de polaridad. Se obtuvieron un total de 19 fracciones primarias. La Fracción F_{XIV} (312 mg) fue resuelta por CLAE en una columna de gel de sílice Waters® Symmetry Prep (fase reversa C₁₈), empleando como fase móvil ACN y un flujo de 2.0 mL/min. El proceso cromatográfico permitió la obtención de la malbranqueamida (**1**, 93.4 mg) y la premalbranqueamida (**4**, 8.0 mg), así como una mezcla de los compuestos **2** y **3** (47.6 mg). Ésta última fue separada en una columna Phenomenex® Nucleosil C₁₈, utilizando como fase móvil MeOH y un flujo de 3.5 mL/min. De este proceso de separación se obtuvieron a la malbranquemida B (**2**, 30.0 mg) y la isomalbranqueamida B (**3**, 5.0 mg).

6.4.1.2 Preparación del crudo alcaloideo del extracto orgánico

La porción restante del extracto orgánico (6 g) se resuspendió en CH₂Cl₂ (2 L) y fue sometido a extracciones sucesivas con HCl 1N (4x2 L). La fase ácida acuosa se alcalinizó con NH₄OH hasta obtener un pH final de 9. La solución alcalina resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (4x2 L) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y fue concentrada a presión reducida para obtener el crudo alcaloideo correspondiente (591 mg).

6.4.2 Separación y purificación de las malbranqueamidas presentes en el crudo alcaloideo

El crudo alcaloideo (CA) obtenido se analizó mediante CLAE, empleando una columna PurospherSTAR® (250x10 mm, 5µm), y como eluyente ACN a un flujo de 2 mL/min. La resolución de la fracción alcaloidea dio como resultado el aislamiento de 4 compuestos, correspondientes a la malbranqueamida (**1**, 199.2 mg), la premalbranqueamida (**4**, 12.4 mg) y una mezcla de la malbranqueamida B (**2**) y la

isomalbranqueamida B (**3**) (71.1 mg), la cual fue resuelta en una columna Nucleosil C₁₈, empleando como eluyente MeOH (2.0 mL/min), para obtener la malbranqueamida B (**2**, 19.2 mg) y la isomalbranqueamida B (**3**, 40.6 mg).

6.5 Cuantificación de malbranqueamida en distintos crudos alcaloideos por CLAE

6.5.1 Preparación del material fúngico

Para llevar a cabo la cuantificación y determinar la posible influencia de *Paecilomyces* 26014 sobre la producción de la malbranqueamida, se realizó la fermentación en pequeña escala de los hongos *Malbranchea aurantiaca* y *Paecilomyces* 26014 por separado y en mezcla. Estos cultivos fueron preparados por triplicado en medio PDB, en matraces Fernbach® de 2 litros, conteniendo 1.5 L de medio de cultivo cada uno. Se crecieron en las condiciones establecidas anteriormente. El inóculo consistió de una muestra de agar (1 cm²) con el hongo crecido previamente en medio Papa-Dextrosa.

6.5.2 Extracción y preparación de los crudos alcaloideos

Se siguieron las metodologías descritas en los puntos 6.4.1 para la extracción, y en el punto 6.4.1.2 para la obtención de los crudos alcaloideos correspondientes. Cabe mencionar que se trabajó con los extractos del micelio y del medio de cultivo por separado.

6.5.3 Cuantificación de la malbranqueamida por CLAE

La cuantificación de la malbranqueamida se llevó a cabo mediante el empleo de un estándar interno. El estándar seleccionado fue la emericelina, producto natural aislado de la especie fúngica *Emericella* 25379 (Figuroa, Cerda-Garcia-Rojas et al. 2008). El compuesto se analizó cromatográficamente por sextuplicado para asegurar su

reproducibilidad, tomando como parámetro de variación el área bajo la curva. El CA en cuestión, se pesó y preparó en una mezcla de ACN-MeOH (98:2) y combinado con 100µL de una solución stock del estándar (500 ppm), para ser analizado en el cromatógrafo en una concentración final de 0.1mg/20µL. De igual manera, se inyectó por sextuplicado para disminuir el error estándar, calculándose para este fin el coeficiente de variación (CV) en cada una de las mediciones (**Ecuación 1**). Las condiciones cromatográficas utilizadas para la resolución de la coelución Estándar-CA fueron las mismas que se describen en el punto 6.4.2.

$$CV \% = \sigma X \times 100 \quad (1)$$

en donde σ = Desviación estándar

\bar{X} = Promedio

6.6 Apagamiento de la fluorescencia extrínseca utilizando el biosensor fluorescente (*hCaM M124C-mBBr*)

El efecto de los productos **1-4** sobre la proteína calmodulina (CaM, a una concentración 5 µM en un volumen final de 2 mL), y los complejos CaM-Proteína, se determinó mediante un método espectrofluorimétrico utilizando un biosensor fluorescente (*hCaM M124C-mBBr*) de la CaM de acuerdo al procedimiento descrito por González-Andrade y colaboradores (Gonzalez-Andrade, Figueroa et al. 2009). Las proteínas utilizadas para los complejos CaM-Proteína fueron: la Cinasa de Cadena Ligera de la Miosina (MLCK) y la Fosfodiesterasa 1 Dependiente de la Calmodulina (PDE-1).

En cada caso la solución proteica en amortiguador de KAc 5 mM y 10 mM de CaCl₂ y pH final de 5.1 se tituló con una solución 2 mM de cada alcaloide. Para determinar el efecto de la malbranqueamida sobre los complejos CaM-MLCK, y CaM-PDE1 primero se formó el complejo con una estequiometria 1:1 (CaM-proteína) y posteriormente se procedió a la titulación con cada uno de los alcaloides de la misma forma que en el experimento anterior.

El cambio en la fluorescencia de la proteína o del complejo en presencia de los compuestos de prueba se registró en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, USA) a 37 °C. Los datos se adquirieron mediante el software VINCI 1.6.SP4 (Experiment & Instrument Control). La λ_{ex} para el biosensor fue de 381 nm y la λ_{em} fue adquirida en el rango de 400-550 nm, con diez integraciones y cada dos nanómetros.

Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la K_d del complejo proteína-ligando o proteína-proteína-ligando, utilizando la Ecuación 2:

$$v_0 = \frac{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0) - \sqrt{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0)^2 - 4L_0 / P_0}}{2} \quad (2)$$

en donde P_0 y L_0 son la concentración de proteína y ligando presentes respectivamente, K_d es la constante de disociación (Miller, Olson et al. 1983). Todos los datos fueron analizados utilizando el programa Origin 8.0.

6.6.1 Determinación de la interacción proteína-ligando mediante Dicroísmo Circular (DC)

Los estudios de dicroísmo circular de los alcaloides 1-4 se realizaron con la misma proteína hCaM M124C.mBBr a 37°C. La proteína se utilizó a una concentración de 5 μ M y los ligandos a saturación (100 μ M). Como solución amortiguadora se empleó acetato de potasio 100 mM, a pH 5.1. Los espectros se

registraron bajo los siguientes parámetros: rango de medición de 200 a 260 nm, resolución de 1.0 nm, ancho de banda de 1.0 nm, sensibilidad de 100 mdeg y velocidad de 8 nm·min⁻¹.

El porcentaje estructural de hélices- α /láminas- β de CaM en presencia de Ca²⁺ y los ligandos fue calculado usando el software K2D2 (Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro 2008).

6.7 Cálculos de acoplamiento molecular

6.7.1 Preparación de las estructuras para los cálculos

Las moléculas (**Tabla 2**) se construyeron con el programa Hyperchem 7.5 (HyperCube Inc., FL). En el diseño de estructuras se consideraron, además del grado de clorinación en el anillo indólico, la estereoquímica relativa en la posición C-12a, y la oxidación del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano (Miller, Figueroa et al. 2008), la presencia de F, Br e hidroxilo en el anillo indólico. Para la visualización de las estructuras utilizaron los siguientes programas: Hyperchem 7.5, Pymol (DeLano Scientific LLC, CA) y AutoDock Tools (ADT; www.autodock.scripps.edu).

6.7.2 Optimización geométrica

La optimización geométrica de todas las moléculas se llevó a cabo con el programa Hyperchem 7.5, utilizando el campo de fuerza AMBER, siguiendo un algoritmo de gradiente conjugado (Polak-Ribiere), y teniendo como condición de término un gradiente 0.01 kcal/[Å mol], o un máximo de 750 ciclos. Esta minimización de energía se llevó a cabo al vacío.

6.7.3 Acoplamiento molecular

Para realizar los cálculos de acoplamiento molecular (AM) se utilizó el programa AutoDock 4.0 -www.autodock.scripps.edu- (Morris 1998). La estructura cristalográfica de la proteína utilizada se obtuvo del Protein Data Bank (RCSB; código pdb: 1A29). La adición de los átomos de hidrógenos polares a la proteína, las cargas de Kollman, los parámetros de solvatación y volúmenes fraccionarios, se realizaron utilizando el programa ADT (AutoDock Tools). A cada ligando se le asignaron las cargas parciales de Gasteiger-Marsili, se removieron los hidrógenos no polares y se permitió la rotación de todos los ángulos de torsión permisibles.

El acoplamiento molecular consistió en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomo que participa en el mismo, en una caja de 60x60x60 Å, con un espacio de enrejamiento de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula, la cual fue construida con AutoGrid 4 (parte de la paquetería de programas de AutoDock 4). La búsqueda de las posiciones de menor energía de interacción ligando-proteína se realizó utilizando el algoritmo genético Lamarkiano (LGA;(Morris 1998), utilizando los parámetros recomendados inicialmente, los cuales consisten en: una población de 150 individuos, 2,500,000 evaluaciones energéticas y cambiando únicamente el número de corridas, que fue de 100 evaluaciones independientes.

Los programas utilizados para el acoplamiento molecular y su análisis fueron los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) y PyMOL (DeLano 2004), sobre el sistema operativo UNIX usando una supercomputadora (KANBALAM HP CP 4000), la cual contiene 1368 procesadores AMD Opteron, 3 terabyte de memoria y 160 terabyte de almacenamiento (<http://www.super.unam.mx/>).

Tabla 2. Análogos de la malbranqueamida estudiadas por acoplamiento molecular.

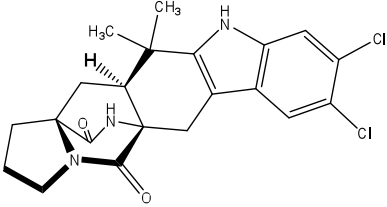
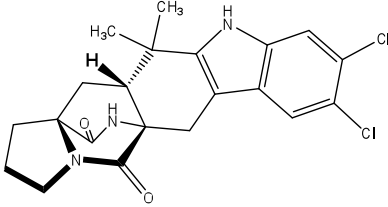
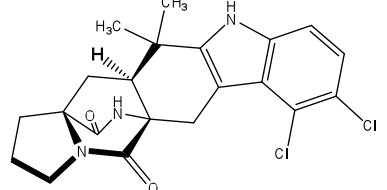
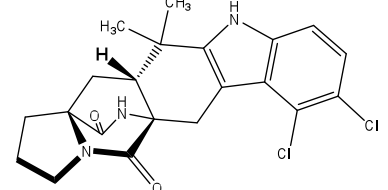
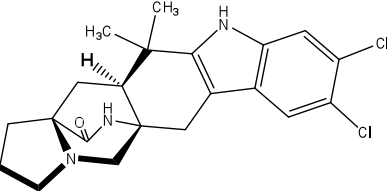
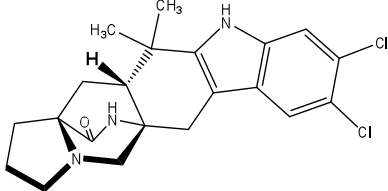
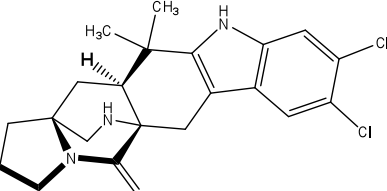
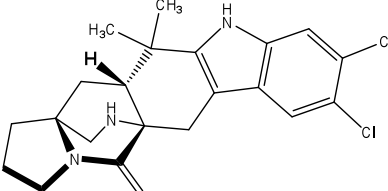
Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
5a		5b	
6a		6b	
1		1b	
8a		8b	

Tabla 2. Análogos de la malbrankeamida estudiadas por acoplamiento molecular (**continuación**).

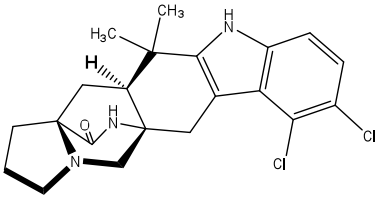
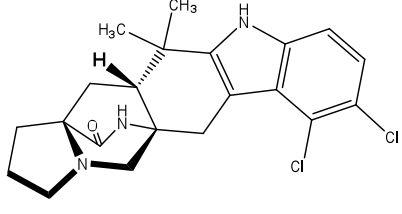
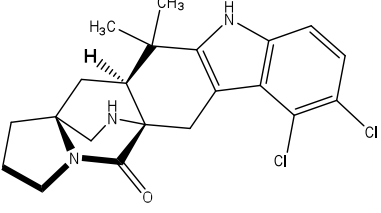
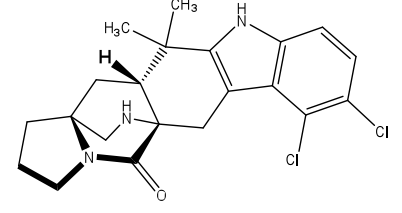
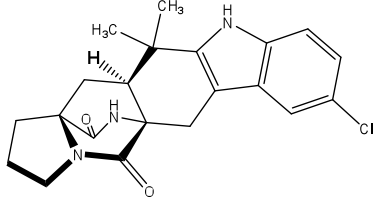
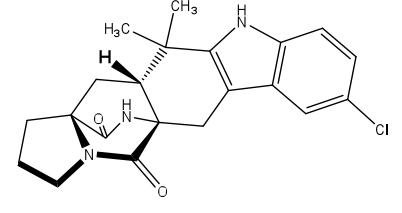
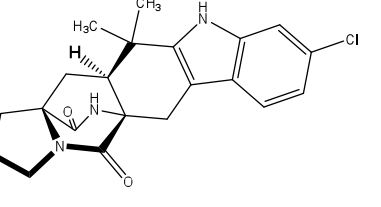
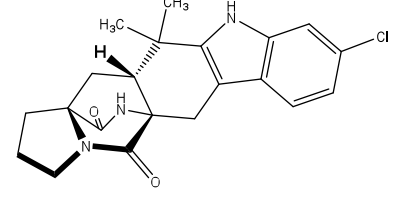
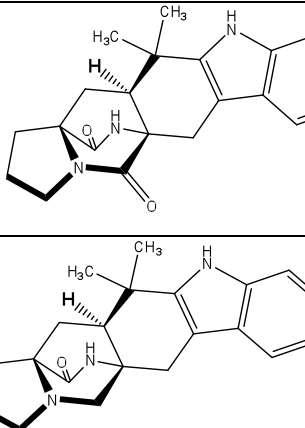
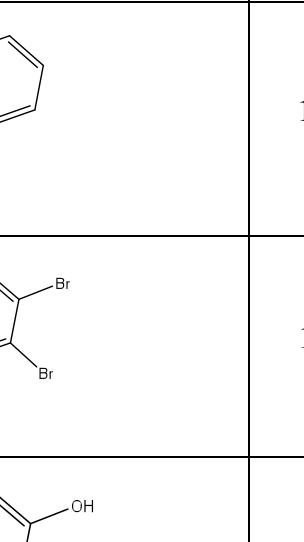
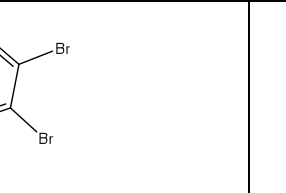
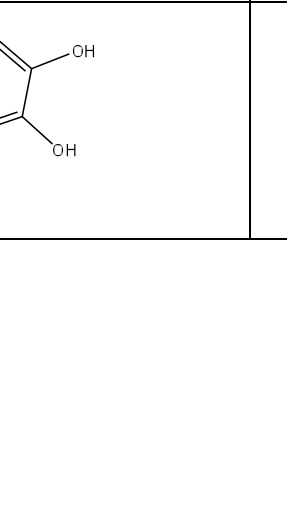
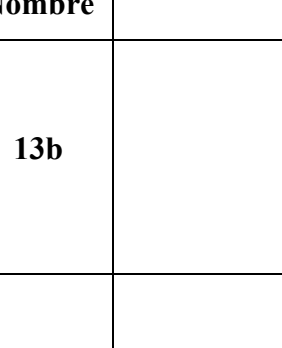
Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
9a		9b	
10a		10b	
11a		11b	
12a		12b	

Tabla 2. Análogos de la malbrancheamida estudiadas por acoplamiento molecular (**continuación**).

Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
13a		13b	
14a		15a	
16a			

6.8 Ensayos biológicos

6.8.1 Determinación del potencial antimicrobiano de la malbranqueamida

6.8.1.1 Material biológico

Para este ensayo se utilizaron cinco diferentes microorganismos representativos de bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536; *Salmonella typhi* ATCC 9992; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), y una levadura, *Candida albicans* (ATCC 10231). Las bacterias fueron resembradas en tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo Müeller-Hinton (DIFCO®, 275730) a 36°C durante un periodo de 24 horas antes de su empleo. En el caso de la levadura, la resiembra se realizó en medio Sabouraud a 36°C durante 48 horas.

6.8.1.2 Método de microdilución

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita en trabajos previos (Schwalbe 2007) placas de 96 pozos, como se detalla a continuación:

- a. El inóculo se preparó disolviendo una muestra de cada microorganismo tomada directamente del medio de cultivo en solución salina isotónica (SSI) estéril, la suspensión resultante se ajustó hasta alcanzar una turbidez comparable a la del estándar de McFarland de 0.5 (aproximadamente 1.0×10^8 UFC).
- b. La malbranqueamida (**1**) se evaluó a 10 concentraciones en el rango de 2-500 ppm. Las diluciones apropiadas se obtuvieron a partir de una solución stock (1000 ppm) que se preparó disolviendo la muestra en DMSO (3% v/v como máximo), aforando con caldo Müeller-Hinton (MH) o RPMI. Debido a la gran susceptibilidad de algunos antibióticos a la falta de cationes divalentes en el

medio empleado, es necesario estandarizar la cantidad de estos iones en el medio (20-25 mg de Ca^{2+} /L y 10-12.5 mg de Mg^{2+} /L; (Schwalbe 2007). Para este fin se prepararon soluciones stock de CaCl_2 y MgCl_2 a 10mg/mL, las cuales se añadieron al caldo MH frío 2mL y 1mL por litro, respectivamente.

- c. El control positivo fue el antibiótico ampicilina en el caso de las bacterias, y fluconazol para la levadura, los cuales fueron preparados en un rango de concentraciones de 4×10^{-3} ppm hasta 2 ppm.
- d. El ensayo consiste en colocar 125 μL de cada una de las diluciones del compuesto en los pozos de las columnas 1-10 de la placa, posteriormente el inóculo (125 μL) se sembró en los pozos correspondientes de las filas A-H. Por último, en las columnas 11 y 12 se colocaron los controles blanco (caldo MH + inóculo y caldo MH + SSI estéril). Ver **Figura 9**.
- e. Las placas inoculadas se mantuvieron en incubación a 36°C por un periodo de 18 horas en el caso de las bacterias y de 48 horas para *C. albicans*.

6.8.1.3 Interpretación de los resultados

Transcurridas las 18 o 48 horas de incubación, las placas se observaron y en todos los casos se consideró como la MIC, la menor concentración a la cual se aprecia la inhibición del crecimiento del microorganismo y se detecta por la falta de turbidez visual, comparándose con el blanco que incluye al microorganismo (caldo MH + inóculo). El resultado se expresa en ppm.

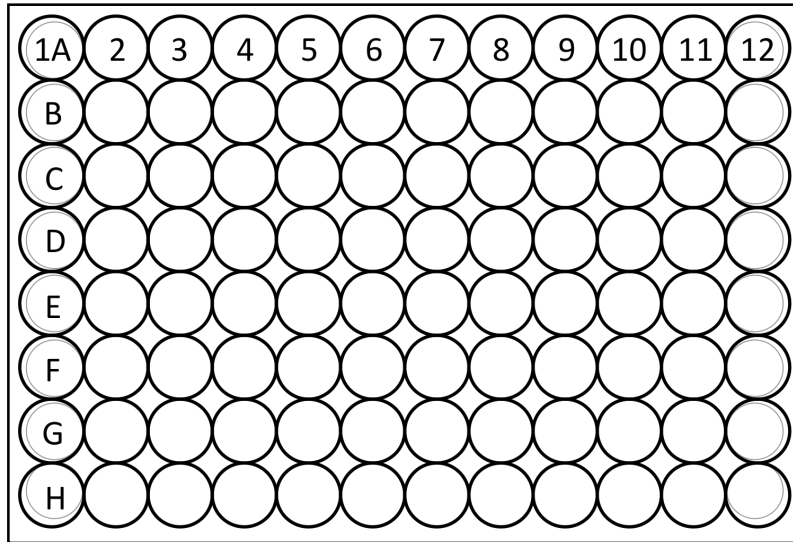


Figura 9. Esquema de la placa de 96 pozos empleada para el ensayo de la microdilución en caldo.

7. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se abordaron estudios complementarios sobre los alcaloides de *M. aurantiaca* y sus propiedades anti-CaM. Para facilitar el seguimiento de la discusión, la información se presenta en cuatro apartados: En el primero se describe el desarrollo de una estrategia alternativa para la obtención de los metabolitos **1-4**. A continuación se presenta la cuantificación de malbranqueamida (**1**) en cultivos de *M. aurantiaca*, *Paecilomyces* 26014 y la mezcla de ambas especies, empleando la metodología alterna. En el tercero se describe la determinación de la interacción de las malbranqueamidas aisladas en la primera sección por métodos espectrofluorimétricos y espectroscópicos. Por último, y con el objetivo de encontrar una relación estructura-actividad, se referirá a los estudios de acoplamiento molecular de diferentes análogos de la malbranqueamida y la proteína calmodulina.

7.1 Procedimientos alternativos para mejorar el rendimiento y la producción de la malbranqueamida y sus análogos naturales

La metodología para la obtención de la malbranqueamida (**1**) y sus análogos **2-4** descrita en trabajos previos (Martínez-Luis 2007; Madariaga-Mazón 2008) comprende las siguientes etapas: (i) extracción del material fúngico y medio de crecimiento; (ii) un fraccionamiento preliminar mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando gel de sílice como fase estacionaria; y por último, (iii) una o dos de las fracciones cromatográficas resultantes del proceso anterior se somete a sucesivas separaciones mediante CLAE utilizando las condiciones señaladas en la parte experimental.

Con la finalidad de mejorar el procedimiento de obtención de la malbranqueamida (**1**), tanto en rendimiento como en tiempo de trabajo, se decidió explorar otra alternativa. El nuevo procedimiento se desarrolló de manera simultánea al

anterior con fines comparativos. Como los productos de interés son de naturaleza alcaloidea se consideró apropiado realizar un fraccionamiento preliminar utilizando un proceso de partición ácido base. La aplicación del método permitió la obtención de un crudo alcaloideo (CA), el cual contenía la mezcla de malbranqueamidas, de acuerdo al análisis por cromatografía en capa delgada y la reacción positiva frente al reactivo de Dragendorff. El análisis mediante CLAE del CA generó el cromatograma que se ilustra en la **Figura 10**. La coelución de los compuestos **1-4** con el CA, confirmó su presencia en la fracción alcaloidea. Para la separación de los compuestos del crudo alcaloideo se aplicó la CLAE. Para la resolución del pico correspondiente a la mezcla de malbranqueamida B (**2**) e isomalbranqueamida B (**3**), fue necesario realizar una recromatografía en una columna Nucleosil C₁₈ Phenomenex® (**Figura11**).

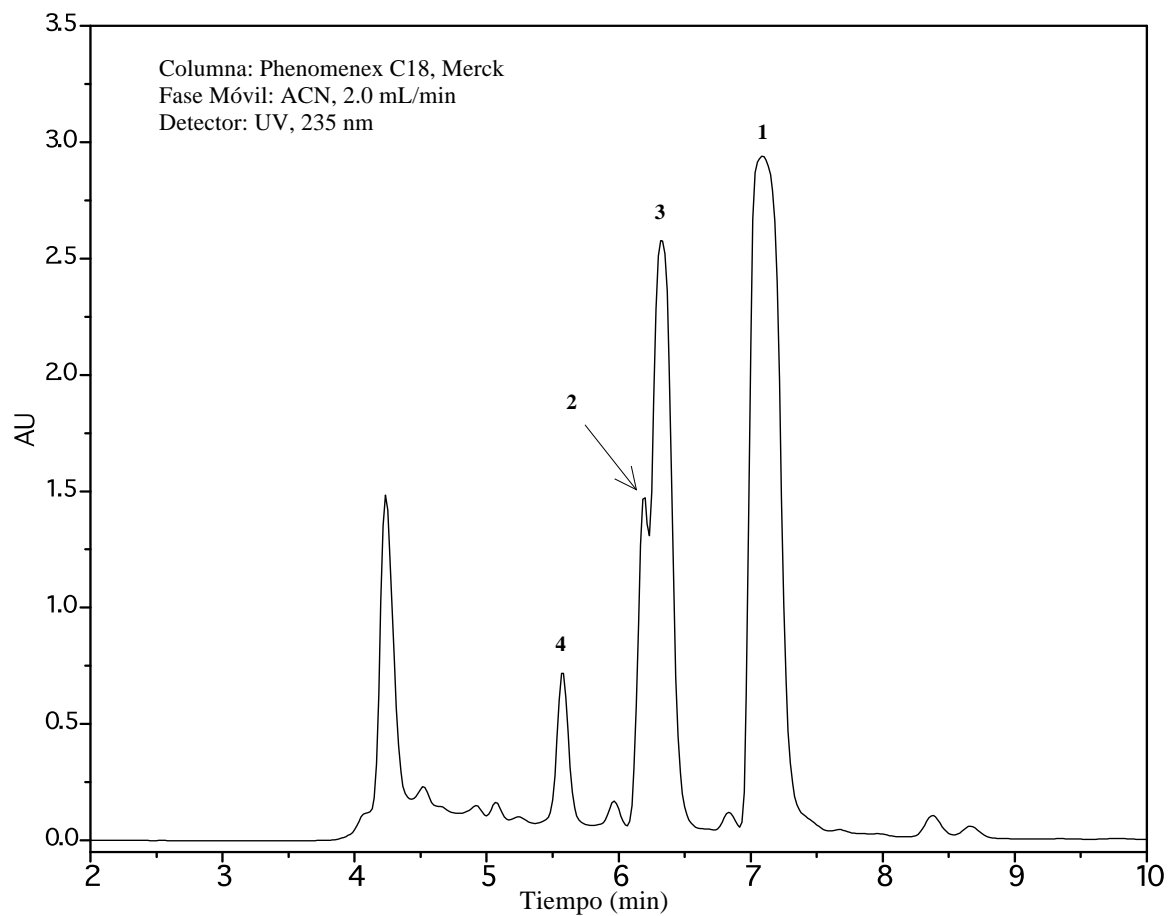


Figura10. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo generado por una partición ácido-base de los extractos del medio de cultivo y micelio de *M. aurantiaca*.

De esta manera se lograron separar y purificar los compuestos **1- 4**, a partir del CA. El objetivo de la búsqueda de una estrategia alternativa para la obtención de la malbranqueamida (**1**) y sus análogos, fue primordialmente la optimización del método, esto es, obtener mejores rendimientos de la mezcla de las malbranqueamidas, así como realizarlo por un método sencillo y eficiente.

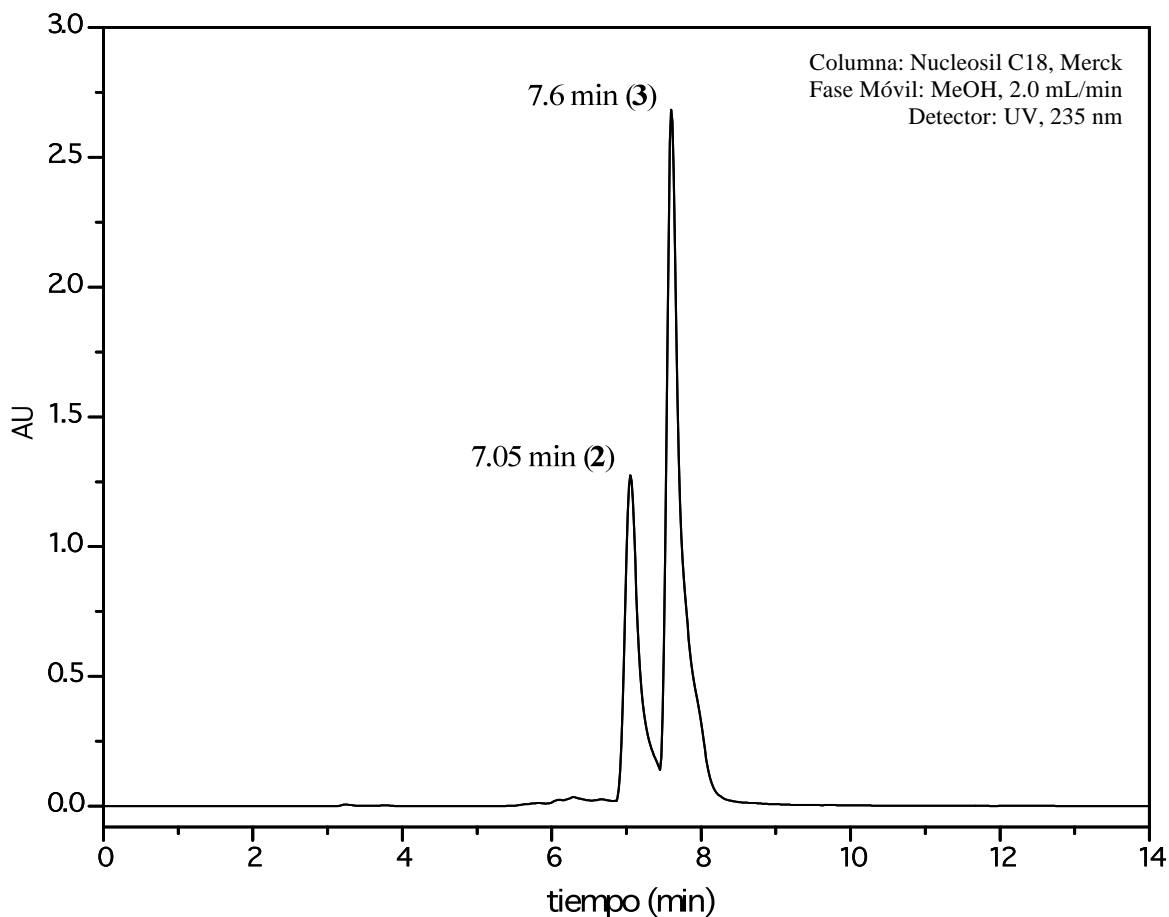


Figura 11. Cromatograma de la mezcla de la malbranqueamida B (**2**) e isomalbranqueamida B (**3**), en una columna Nucleosil C₁₈ Phenomenex®, empleando como fase móvil MeOH.

La comparación entre los rendimientos obtenidos por los dos métodos, demuestra que el método desarrollado en el presente estudio es más eficiente, ya que los rendimientos de los alcaloides incrementaron notablemente, y prácticamente se duplicaron. La **Tabla 3** resume los resultados obtenidos por ambos métodos.

Tabla 3. Comparación entre los rendimientos de los productos **1-4** obtenidos por el método inicial y por el método de partición ácido-base

	Método Inicial	Partición ácido base
Malbranqueamida (1)	93.4 mg	199.2 mg
Malbranqueamida B (2)	30.0 mg	19.2 mg
Isomalbranqueamida B (3)	5.0 mg	40.6 mg
Premalbranqueamida (4)	8.0 mg	12.4 mg
MALB's ¹ (mg)/Exto. Total (mg)	5.19 %	9.82%

¹MALB's : Mezcla de malbranqueamidas.

En síntesis, la estrategia alternativa desarrollada para la obtención de la malbranqueamida (1) resultó ser más selectiva, eficiente y más rápida que la utilizada en los trabajos iniciales (Martínez-Luis 2007; Figueroa 2009).

7.2 Fermentación de *M. aurantiaca* en presencia de la especie fúngica *Paecilomyces* 26014

Con la finalidad de incrementar la producción de malbranqueamida (1) se realizó una fermentación de *M. aurantiaca* en presencia de otro de los hongos del mismo hábitat y, que en una de las muestras de guano se logró aislar junto con la *Malbranchea*. El hongo fue separado de la mezcla fúngica y caracterizado como una especie de *Paecilomyces* sp (26014). Esta estrategia se utilizó ya que en muchas

ocasiones la co-fermentación de dos hongos influye en la biosíntesis de metabolitos secundarios de alguna o de las dos especies.

Para determinar entonces el efecto de *Paecilomyces* 26014 en la producción de malbranqueamida (**1**) se realizaron cultivos en pequeña escala de los hongos puros (*M. aurantiaca* y *Paecilomyces* 26014) y de la mezcla. Cada cultivo se realizó por triplicado en matraces conteniendo 1.5 L de medio papa-dextrosa, en las condiciones ya establecidas (ver Parte Experimental, 6.5). Una vez transcurrido el periodo de fermentación, se extrajo tanto el medio de cultivo, como el micelio. Cabe mencionar que se trabajó con ambos extractos por separado, ya que se deseaba determinar la cantidad de malbranqueamida (**1**) contenida tanto en el micelio como en el medio de cultivo. Una vez obtenidos los extractos, se preparó el crudo alcaloideo de cada uno de estos, empelando la metodología establecida en el punto 6.1.4.1 de la Parte Experimental. La **Tabla 4** muestra los resultados obtenidos de los rendimientos de los extractos de cada uno de los cultivos.

Tabla 4. Rendimientos de los crudos alcaloideos y extractos orgánicos de los medios de cultivo y micelio.

	Cantidad de Crudo Alcaloideo (mg)		Rendimiento ¹ (%)	
	Medio de Cultivo	Micelio	Medio de Cultivo	Micelio
Puro 1	18.5	8.1	61.7	27
Puro 2	12.1	12.5	40.3	41.7
Puro 3	9.9	7.3	33	24.3
Cont 1	1.4	2.2	4.7	7.3
Cont 2	4.1	4.2	11.6	14
Cont 3	5.7	7.8	19	26
Mezcla 1	6.9	4.5	23	15
Mezcla 2	15.7	12.5	52.3	41.7
Mezcla 3	11.4	9.5	38	31.7

¹El rendimiento se calcula como la cantidad (mg) obtenida de CA por cantidad (mg) de extracto sometida al proceso, expresado en porcentaje (Puro: *M. aurantiaca*; Cont: *Paecilomyces* 26014; Mezcla: *M. aurantiaca* + *Paecilomyces* 26014).

Como se puede observar en la **Tabla 4**, los rendimientos para los cultivos que contienen *M. aurantiaca* pura y la mezcla de los hongos, son muy similares. Este resultado preliminar puede ser indicativo de que la presencia del hongo *Paecilomyces* 26014 en el cultivo de *M. aurantiaca* no afecta en gran medida la producción de malbranqueamidas. Sin embargo, este análisis permitió descubrir que el hongo *Paecilomyces* 26014 produce una o más sustancias de naturaleza alcaloidea.

Para tener una certeza sobre la producción del alcaloide mayoritario en los extractos de los hongos puros y contaminados, se decidió determinar la cantidad de malbranqueamida (**1**) en estos cultivos. Para llevar a cabo esto, se propuso determinar la cantidad del producto en los CA utilizando un estándar interno (EI) y, tras haber analizado diferentes compuestos se encontró que el producto natural emericelina, aislado de la especie fúngica *Emericella* 25379 (Figuroa, Cerda-Garcia-Rojas et al. 2008), era idóneo. Este metabolito secundario, de núcleo xantona, cumple con las características de estabilidad y reproducibilidad requeridas para un estándar interno; además su factor de retención es lo suficientemente mayor que el de las malbranqueamidas, evitando así interferencia alguna con los analitos de interés.

Una vez seleccionado el estándar interno, se realizaron las coeluciones de cada uno de los CA's obtenidos (medio de cultivo y micelio); cada muestra se analizó por sextuplicado. La **Figura 12** muestra los cromatogramas obtenidos en cada uno de los casos.

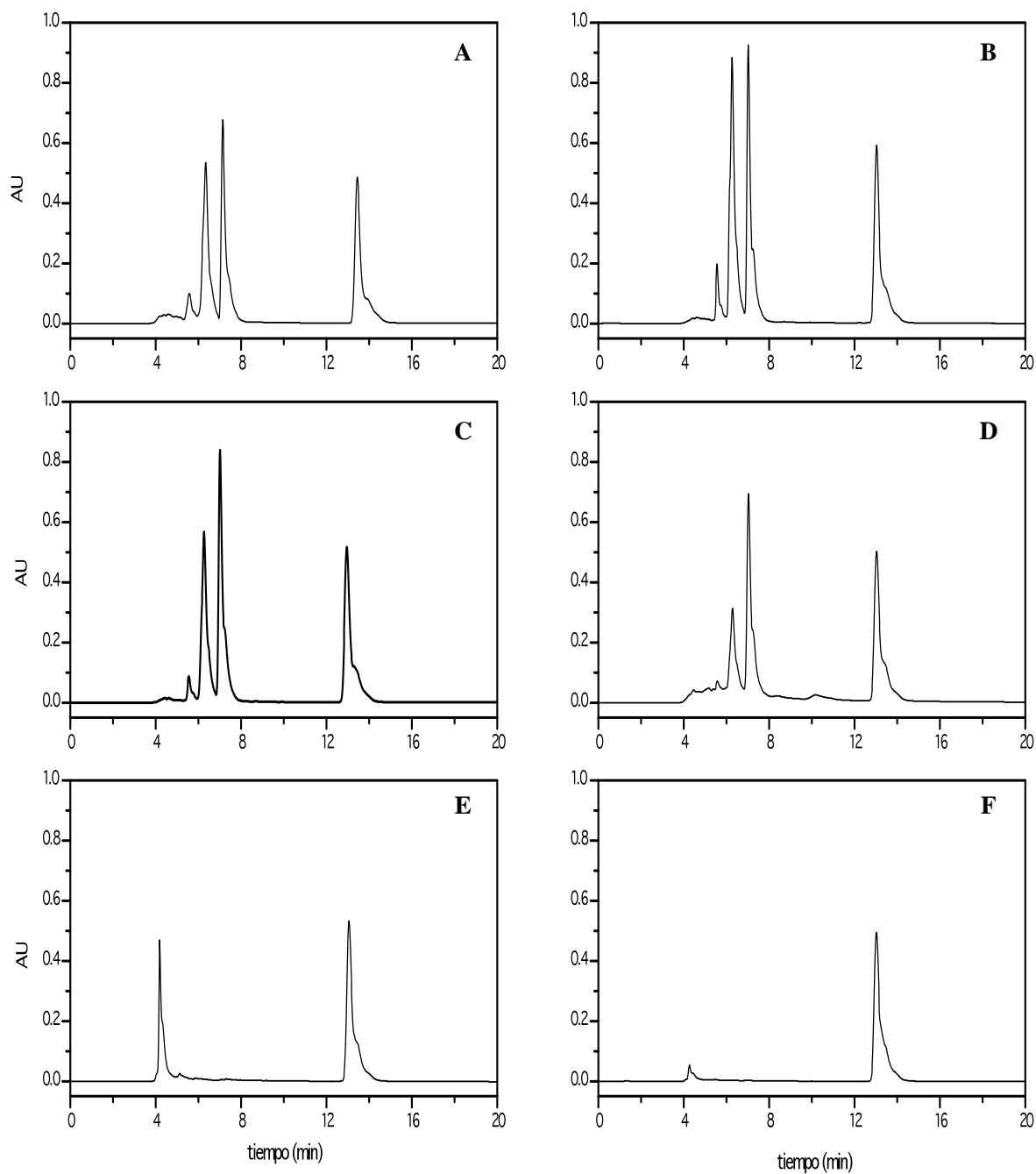
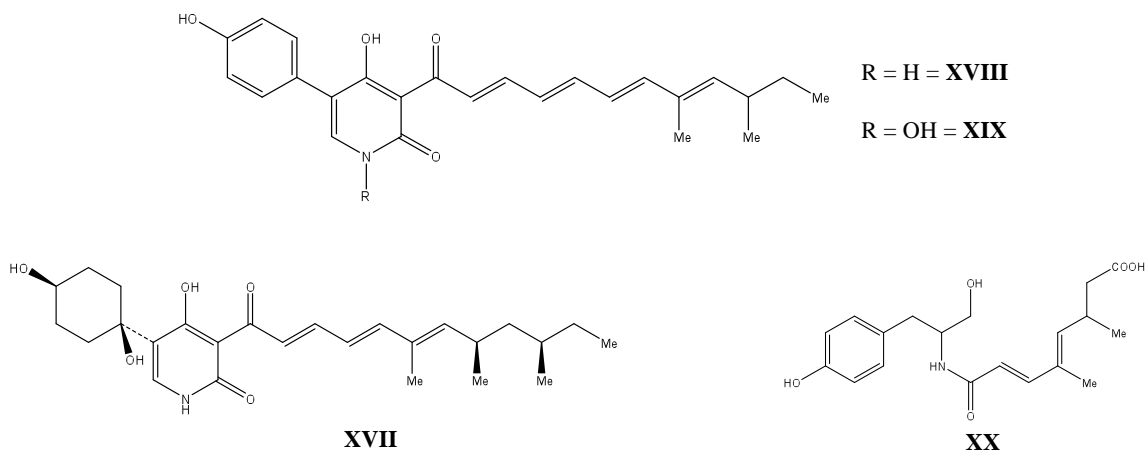


Figura 12. Cuantificación de la malbrancheamida (**1**) en cada uno de los CA en presencia del estándar interno emericelina. En el cultivo puro de *M. aurantiaca*: micelio (A) y medio de cultivo (B); en la mezcla fúngica: micelio (C) y medio de cultivo (D); y en *Paecilomyces* 26014: micelio (E) y medio de cultivo (D).

Lo que se aprecia en la **Figura 12** es consistente con los resultados expresados en la **Tabla 4**, ya que el rendimiento del CA obtenido en el caso del cultivo puro de *M. aurantiaca* es similar al del medio de cultivo y micelio del hongo *Paecilomyces* 26014. Así mismo, el rendimiento de malbranqueamida (**1**) no se modificó de manera significativa en el cultivo de la mezcla de hongos. Finalmente se encontró que el hongo *Paecilomyces* 26014 biosintetiza aparentemente un sólo alcaloide cuyo rendimiento sí se disminuye en el cultivo de la mezcla fúngica. Los resultados globales parecen indicar que *M. aurantiaca* afecta la producción de metabolitos de origen alcaloideo en *Paecilomyces* 26014, sin embargo, éste último, no afecta la producción de malbranqueamidas en *M. aurantiaca*.

Cabe hacer notar que es altamente factible que el metabolito detectado en el CA de *Paecilomyces* 26014 sea de naturaleza alcaloidea en sentido estricto, y no un compuesto meramente básico, ya que existen reportes previos sobre el género que documentan la biosíntesis de alcaloides de tipo piridona en varias especies de *Paecilomyces* (Cheng, Schneider et al. 2004; 2006). Algunas estructuras características se indican en el **Cuadro 3**, siendo entre los más representativos los alcaloides tipo piridona, las militarinonas (**XVII**) y farinosonas A (**XVIII**), B (**XIX**) y C (**XX**).



Cuadro 3. Algunos de los alcaloides aislados de especies de *Paecilomyces* (Cheng, Schneider et al. 2004).

7.3 Determinación de la interacción de las malbranqueamidas con la CaM

Como se indicó en la sección de **Antecedentes**, la malbranqueamida (**1**) y sus análogos, inhiben de manera significativa el complejo CaM-Ca²⁺-PDE1 (Figuroa 2009), en particular la malbranqueamida (**1**) (CI₅₀=19.33±1.40 μM) que presenta un efecto comparable al de la clorpromazina (CI₅₀=16.78±3.9 μM). Sin embargo, a la fecha no se determina si las malbranqueamidas son inhibidores clásicos de la CaM.

Para tal fin, en el presente estudio se realizaron experimentos de apagamiento de la fluorescencia extrínseca, dicroísmo circular, y de interacción proteína-proteína. Los resultados obtenidos se describirán en los incisos siguientes.

7.3.1 Mediante un método espectrofluorimétrico, utilizando el biosensor fluorescente *hCaM124C-mBBR*

La evaluación de la interacción directa de las malbranqueamidas con la CaM fue determinada utilizando un biosensor fluorescente (*hCaM124C-mBBR*). Este biosensor novedoso tiene la particularidad de ser específico y selectivo para la búsqueda de inhibidores clásicos de la proteína CaM. La titulación del biosensor con cantidades conocidas de cada una de las malbranqueamidas permitió establecer los cambios en los espectros de fluorescencia de la CaM (**Figura 13**) en presencia de los compuestos y los parámetros de afinidad (K_d) y unión (estequiometría, **Tabla 5**).

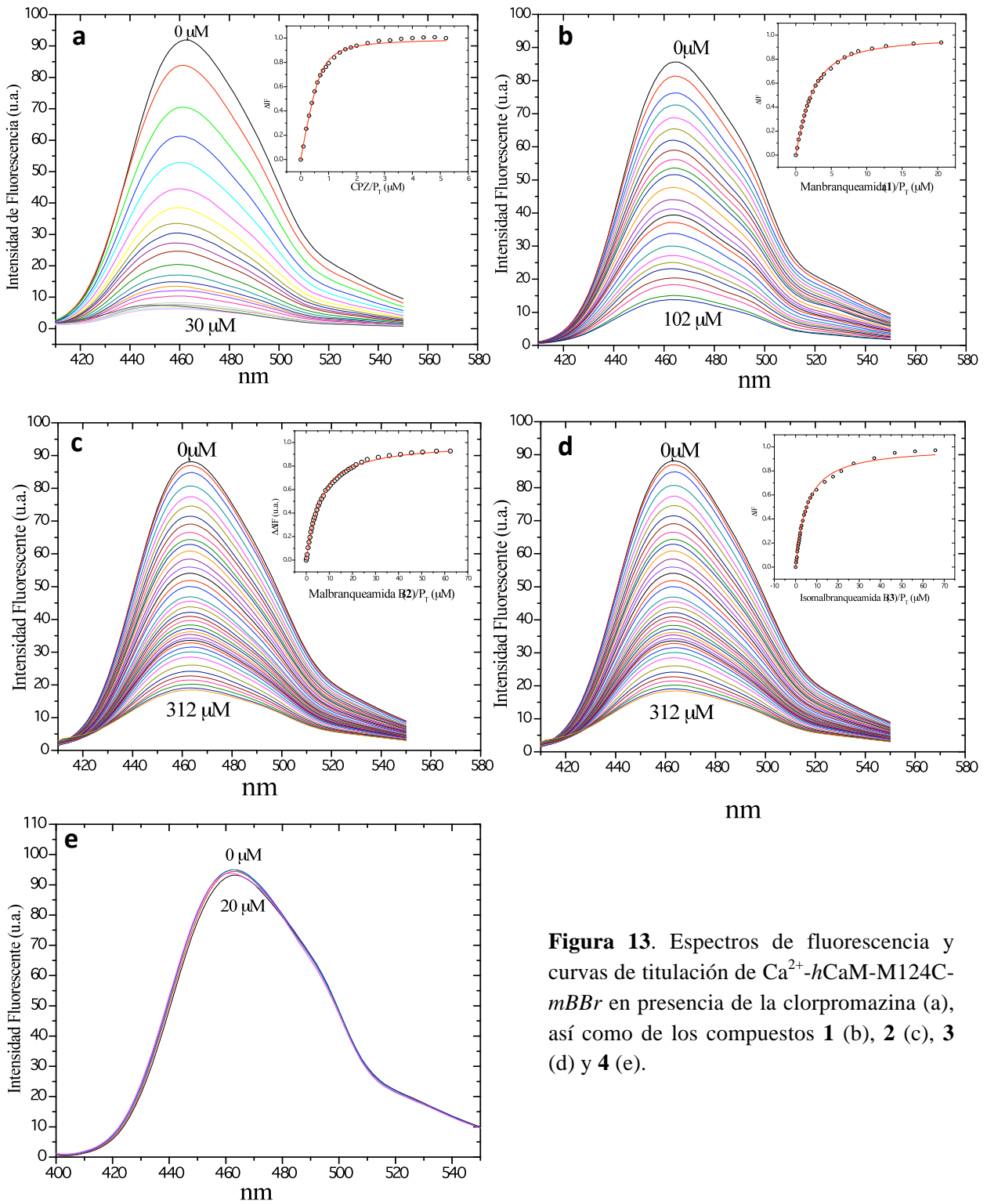


Figura 13. Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de Ca^{2+} -*hCaM*-M124C-*mBBr* en presencia de la clorpromazina (a), así como de los compuestos **1** (b), **2** (c), **3** (d) y **4** (e).

Tabla 5. Resultados del ensayo de fluorescencia, con el cálculo de los parámetros K_d y estequiometría para los compuestos **1-4** y CPZ. A manera de comparación, se muestran los resultados del Bioensayo Funcional (CaM-PDE1).

Ligando	CI ₅₀ ¹ (μM)	K_d ² (μM)	Estequiometria ²
CPZ	3.65 ± 0.5	1.43 ± 0.09	0.69 ± 0.03
Malbranqueamida (1)	19.33 ± 1.40	1.11 ± 0.08	2.08 ± 0.19
Malbranqueamida B (2)	183.28 ± 37.58	4.82 ± 0.30	2.04 ± 0.63
Isomalbranqueamida B (3)	41.56 ± 4.64	4.82 ± 0.09	2.37 ± 0.21
Premalbranqueamida (4)	35.73 ± 3.01	-	-

¹Obtenido a partir del ensayo enzimático funcional con el complejo CaM-PDE1.

²Obtenido a partir del ensayo en fluorescencia con el biosensor.

En el caso de los productos **1-3**, los resultados ilustrados en la **Figura 13** indican un claro apagamiento de la fluorescencia extrínseca de la CaM, mismo que se atribuye a la formación del complejo CaM-Ca²⁺-ligando. Sin embargo, el compuesto **4** no muestra respuesta de apagamiento de la fluorescencia del biosensor. Los valores de K_d calculados para los compuestos **1-3** fueron de 1.11±0.09, 4.82±0.30 y 4.82±0.09 μM, respectivamente y la estequiometría de unión fue de 1:2 para los tres alcaloides. Estos resultados indican claramente que las malbranqueamidas **1-3** interaccionan directamente con la proteína, y corroboran que la presencia de halógenos en la estructura indólica le confieren a los alcaloides una mayor afinidad por la proteína; así, el compuesto **4** que no posee halógenos, no interacciona directamente con la CaM, aunque sí moderadamente con el complejo CaM-Ca²⁺-PDE1; los productos **2** y **3** con un átomo de cloro en su estructura presentaron una moderada actividad tanto sobre el complejo CaM-Ca²⁺-PDE1, como sobre el apagamiento de la fluorescencia (**Tabla 5**).

Finalmente, el inhibidor clásico CPZ, utilizado como control positivo, presentó una K_d ligeramente mayor (1.43±0.09 μM) que la de la malbranqueamida (**1**), y una estequiometría de 1:1. Tanto la CPZ como la malbranqueamida (**1**) inhibieron de manera significativa la actividad enzimática de la PDE1 (**Tabla 5**). En síntesis, en este primer grupo de experimentos, la malbranqueamida (**1**) se comportó como un inhibidor clásico de la CaM.

7.3.2 Dicroísmo circular

Los espectros de Dicroísmo Circular de las proteínas en la región del ultravioleta lejano (180 a 250 nm) se deben principalmente a la absorción de los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de los enlaces amida se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β).

Con base en esta información, se decidió determinar el cambio en la estructura secundaria de la calmodulina al adicionar cantidades saturantes de ligando (**1-4**). Para ello, se registró el espectro de DC en el ultravioleta lejano (200-260nm) de los complejos Proteína-Ligando. Los espectros resultantes se ilustran en la **Figura 14**. Los porcentajes de estructura secundaria (hélices α , hojas β) fueron calculados con el programa K2D2 y se presentan en la **Tabla 6**.

El cambio en la estabilidad conformacional de la CaM en presencia de los ligandos **1-4** y la CPZ, se pueden observar en la **Tabla 6** como el cambio en el porcentaje de estructuras α -hélices obtenido a partir de los espectros de DC. El complejo CaM-Ca²⁺, sin ligandos, muestra un alto contenido de α -hélices (84.2%). Al adicionar concentraciones saturantes de la CPZ, el contenido de α -hélices decrece en un 23% (61.3% α -hélice). Los compuestos **2** y **3** (75.4% y 78.3% α -hélice, respectivamente), fueron menos efectivos, y **4** no indujo ningún cambio (84.2% α -hélice).

Estos resultados, junto con los de fluorescencia, revelan que los compuestos **1-3** interactúan directamente con la CaM, comportándose como inhibidores clásicos.

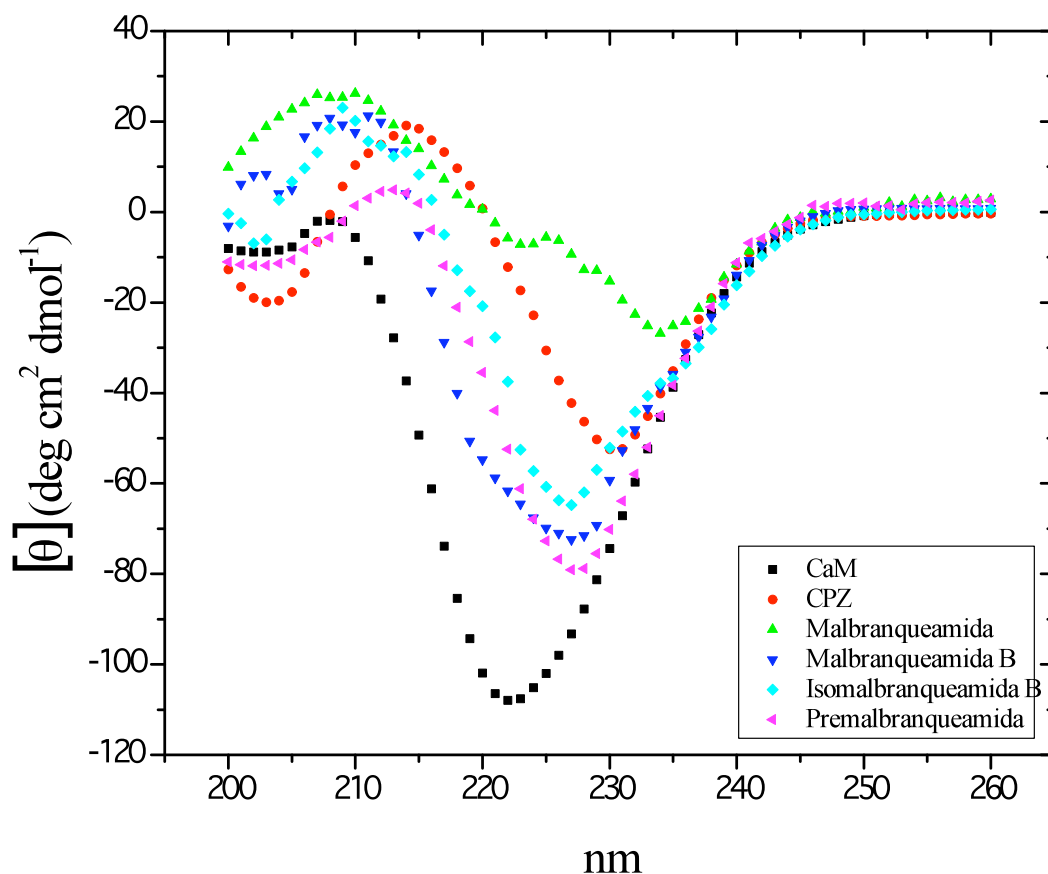


Figura 14. Dicroísmo circular en el UV-lejano de *hCaM* M124C-mBBr en presencia de Ca^{2+} (1 mM de CaCl_2). Amortiguador (■); Ca^{2+} :*hCaM*-M124C-mBBr-CPZ (●); Ca^{2+} :*hCaM*-M124C-mBBr:1 (▲); Ca^{2+} :*hCaM*-M124C-mBBr:2 (▼); Ca^{2+} :*hCaM*-M124C-mBBr:3 (◆); Ca^{2+} :*hCaM*-M124C-mBBr:4 (◀).

Tabla 6. Porcentaje de estructura secundaria (α -hélice) calculada para los complejos CaM-(1-4).

Ligando	α -hélice
CaM- Ca^{2+}	84.2 %
CaM- Ca^{2+} -1	68.1 %
CaM- Ca^{2+} -2	75.4 %
CaM- Ca^{2+} -3	78.3 %
CaM- Ca^{2+} -4	84.2 %
CaM- Ca^{2+} -CPZ	61.3 %

7.3.3 Evaluación de la interacción proteína-proteína-ligando con el biosensor fluorescente

Para determinar si la malbranqueamida (**1**) interacciona con los complejos CaM-proteína, se analizó el cambio de la fluorescencia extrínseca de la CaM en los complejos CaM-PDE1 y CaM-MLCK, en presencia de diferentes cantidades del alcaloide.

Para ello, en primer lugar, se estableció la formación del complejo proteína-proteína, adicionando al biosensor de CaM las enzimas PDE1 y MLCK, a saturación. La **Figura 15** muestra los espectros de fluorescencia de los complejos CaM-Ca²⁺-enzima, y en los dos casos, se apreció un incremento de la fluorescencia puesto que el ambiente local del fluoróforo del biosensor se encuentra menos accesible al disolvente, y por lo tanto, hay menos pérdidas energéticas de tipo radiativa. Este biosensor se escogió para monitorear la interacción proteína-proteína en este estudio debido a que Goraya y colaboradores (Goraya and Cooper 2005) reportaron que entre los residuos de aminoácidos necesarios para la unión de las enzimas PDE1 y MLCK a la CaM se encuentra la M124 (lugar de ubicación del fluoróforo) situada en el dominio C-terminal (M109, M124, M144 y M145). Estos autores también determinaron que el sitio de activación de las enzimas se ubica en la región N-terminal (M36, M51, M71 y M72).

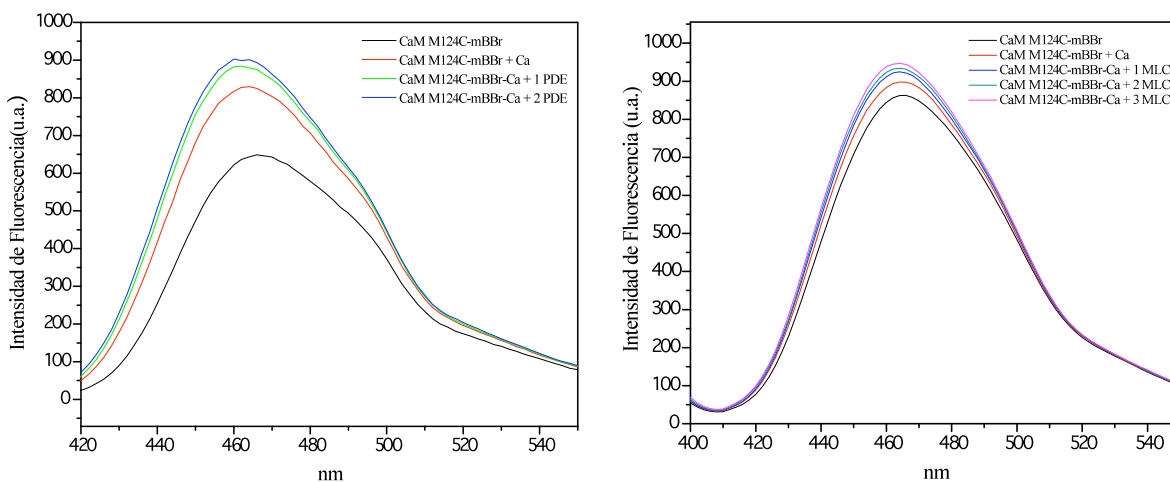


Figura 15. Formación del complejo CaM-proteína al adicionar cantidades a saturación de las proteínas PDE1 (izquierda) y MLCK (derecha) al biosensor *hCaM124C-mBBR*.

Una vez formado el complejo CaM-Ca^{2+} -proteína, se tituló con cantidades crecientes de **1**. La **Figura 16** muestra los espectros de fluorescencia resultantes de éstas titulaciones, y en la **Tabla 7** se presentan los parámetros de afinidad (K_d) y estequiometría calculados.

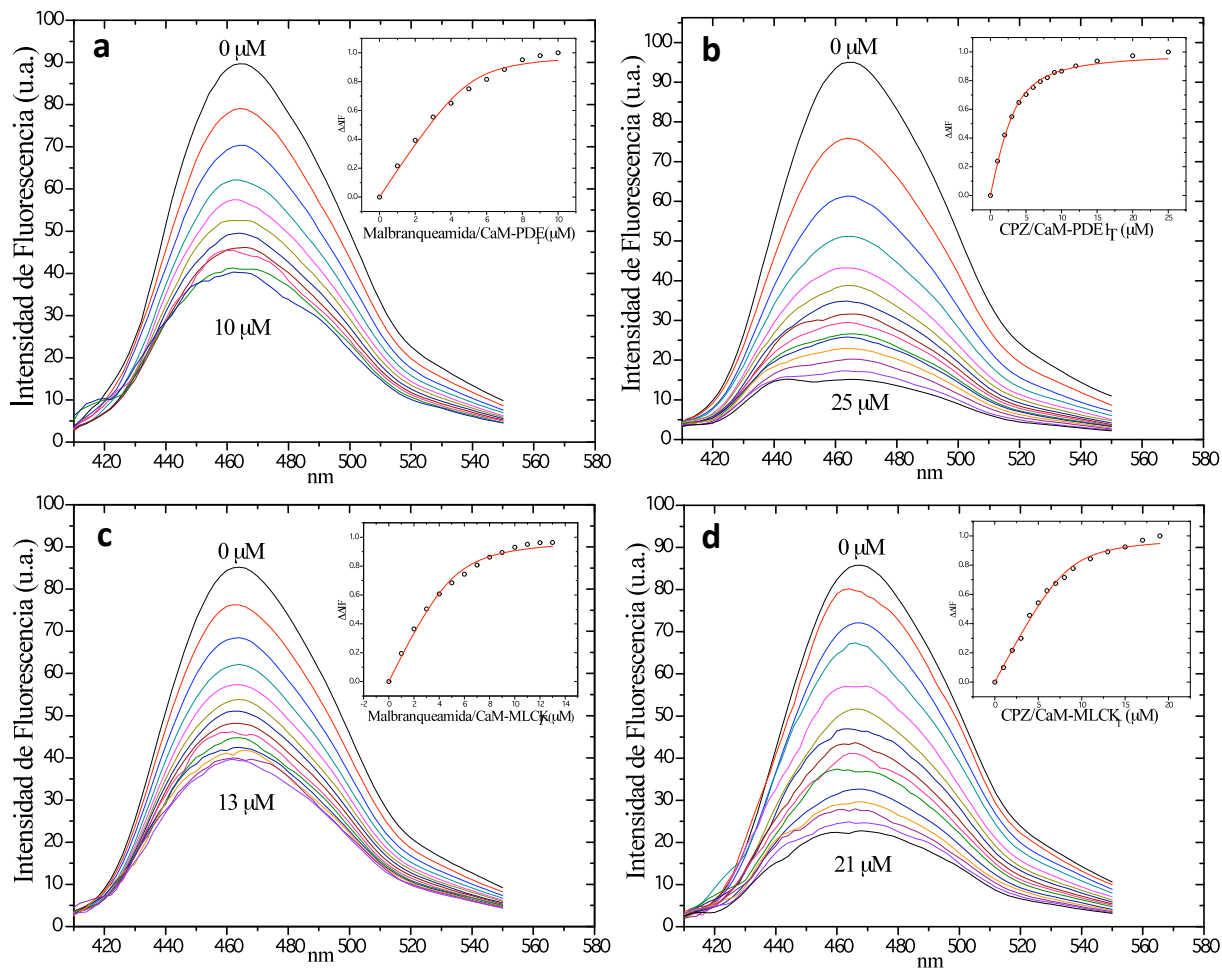


Figura 16. Titulación en fluorescencia de los complejos CaM-Ca^{2+} -PDE1 y CaM-Ca^{2+} -MLCK con la malbranqueamida (**1**) (**a** y **c**, respectivamente) y con la CPZ (**b** y **d**, respectivamente). En cada caso la gráfica principal muestra el apagamiento de la fluorescencia, y el ajuste realizado se muestra en la gráfica interna.

Tabla 7. Resultados del ensayo de fluorescencia, mostrando los parámetros K_d y estequiometría para los complejos CaM-PDE1 y CaM-MLCK con la malbranqueamida (**1**) y la CPZ.

Ligando	K_d (μM)
CaM-Ca ²⁺ -PDE1-malbranqueamida	0.287 \pm 0.088
CaM-Ca ²⁺ -PDE1-CPZ	1.105 \pm 0.098
CaM-Ca ²⁺ -MLCK-malbranqueamida	0.550 \pm 0.087
CaM-Ca ²⁺ -MLCK-CPZ	0.616 \pm 0.113
CaM-Ca ²⁺ -malbranqueamida	1.11 \pm 0.08
CaM-Ca ²⁺ -CPZ	1.43 \pm 0.09

La adición de los ligandos, apagó la fluorescencia del biosensor en los complejos CaM-Enzima, demostrando o bien, una interacción con el complejo Proteína-Proteína, o el desplazamiento de las enzimas de sus sitios de unión. En cualquier caso, el resultado neto es la inhibición de la efectividad de la enzima, como se demostró anteriormente para la PDE1.

Los valores de K_d calculados para la CPZ y **1** con los complejos CaM-Enzimas revelan diferentes grados de afinidad. El complejo CaM-Ca²⁺-PDE1-malbranqueamida presentó una K_d de 0.287 μM , cuatro veces menor que la de la CaM-Ca²⁺-malbranqueamida. En tanto que el complejo CaM-MLCK-malbranqueamida presentó una K_d de 0.55 μM , indicando que **1** es más afín al complejo CaM-Ca²⁺. La CPZ, mostró una afinidad similar por los complejos CaM-Ca²⁺ y CaM-Ca²⁺PDE1, y una mayor afinidad por CaM-Ca²⁺-MLCK, con una K_d de 0.616 μM . A su vez, la malbranqueamida (**1**) mostró una mayor afinidad por el complejo de la PDE1 que por el de la MLCK.

Estas diferencias en la afinidad observadas por los complejos CaM-proteína para un mismo inhibidor, pueden ser de relevancia fisiológica y farmacológica, ya que se podrían controlar de manera selectiva diferentes procesos patológicos.

Por último, cabe destacar que la interacción CaM-enzimas (PDE1 y MLCK) se ha comprobado mediante estudios de anisotropía, encontrándose que la formación de complejos proteicos ocasiona un incremento de la anisotropía, y por lo tanto de la fluorescencia, como se observó en el presente estudio. Además, al adicionar al complejo proteico (CaM-PDE1 o CaM-MLCK) el inhibidor clásico TFP, se observó una disminución en la anisotropía. (Orosz et al., 1988).

7.4 Estudios de Acoplamiento Molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional que permite el análisis teórico de la unión entre ligandos potenciales (generalmente moléculas pequeñas) y blancos macromoleculares (proteínas) de estructura conocida. La técnica permite estimar teóricamente la asociación ligando-proteína utilizando una parametrización energética con la cual se obtienen constantes de unión o afinidad (K_i). La técnica permite también predecir el sitio idóneo de unión molecular entre el ligando y la macromolecular.

La asociación entre moléculas biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos juega un papel central en diversas funciones celulares. De ahí, la relevancia en la predicción de estas interacciones. El acoplamiento molecular es frecuentemente utilizado para predecir la orientación y la afinidad de unión de fármacos potenciales a blancos moleculares, generalmente receptores, de interés terapéutico.

En este estudio, se realizó el acoplamiento molecular de diversos análogos sintéticos de la malbranqueamida (**1**) previamente ensayados experimentalmente como inhibidores del complejo CaM-PDE1 (Miller, Figueroa et al. 2008), y de otros diseñados en este estudio conteniendo halógenos distintos al cloro. En total se analizaron 24 compuestos, 18 sintéticos (**5a-13b**) y 6 propuestos (**6a, 8a, 9a, 14a-16a**). Todo ello con el objetivo de comparar los resultados experimentales obtenidos previamente mediante el ensayo funcional con la enzima PDE1 dependiente de CaM y proponer de manera preliminar, vía *in silico*, que características estructurales debe incorporar la malbranqueamida (**1**) para mejorar su afinidad a la CaM. Cabe destacar que solo se incorporaron en el estudio los productos sintéticos que se generaron como intermediarios de la síntesis de las malbranqueamidas y de los cuales se disponían de datos experimentales de inhibición del complejo CaM-PDE1. Las modificaciones de los propuestos consistieron por un lado en el cambio de tipo de halógenos, y por el otro

en la sustitución de los átomos de cloro de la malbranqueamida (**1**) por grupos hidroxilos.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando la estructura cristalizada de la CaM, obtenida del PDB (código 1a29). Para ello, se optimizaron geoméricamente las estructuras de los diferentes ligandos a estudiar por medio del programa HyperChem 7.0; posteriormente, se encontraron los sitios de interacción más favorables con la proteína (CaM) de acuerdo a diferentes factores energéticos empleando el programa AutoDock 4.0. Para cada ligando analizado fue posible obtener los sitios de interacción principales (grupos totales), el número de veces que el ligando interactuó en cada uno de los sitios principales (conformeros en los grupos), la energía libre de unión estimada (EFEB, kcal/mol), la constante de inhibición estimada (K_i), así como los residuos con los que interactúa y tipo de enlaces (e.g. enlaces de hidrógeno o uniones de tipo electrostáticas). En la **Tabla 8** se presentan los resultados para cada ligando analizado.

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces.

	Número total de grupos/Confórmers en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
5a	4/45	-8.27/ 867.97 nM	PHE92, ILE100, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU11, PHE12 (MET124)	
5b	2/34	-7.98/ 1.41 uM	PHE92, PHE141, ILE100, VAL136, ILE125, MET124, MET144, GLU11 (MET124)	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

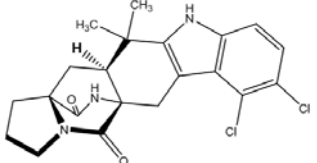
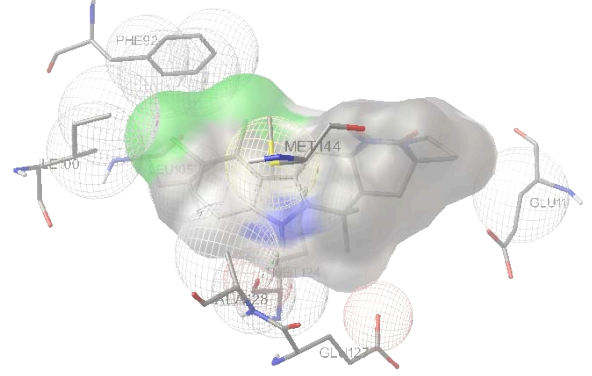
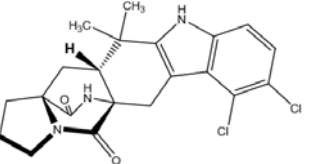
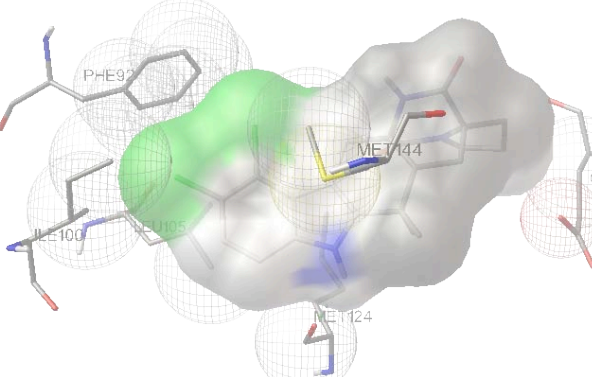
	Número total de grupos/Conformeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
6a	2:4 90	-8.31/ 807.58 nM	PHE92, ILE100, LEU105, MET144, MET124, ALA128, GLU127, GLU11 (MET124) 	
6b	2:4 42	-7.81/ 1.87 uM	PHE92, ILE100, LEU105, MET144, MET124, GLU11 (MET124) 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

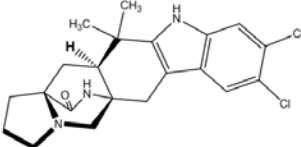
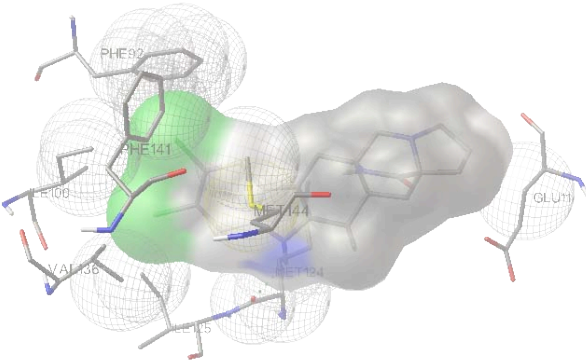
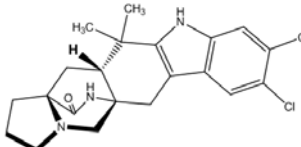
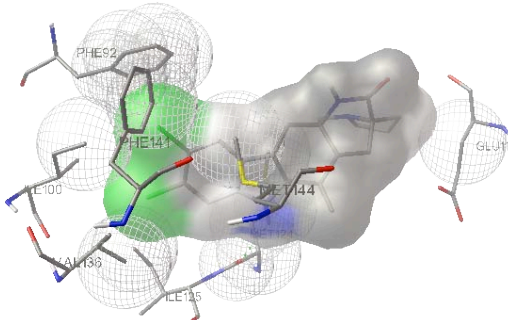
	Número total de grupos/Conformeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
7a	1/49	-8.22/ 944.56 nM	PHE92, PHE144, ILE100, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU11 (MET124) 	
7b	1/46	-8.07/ 1.27 uM	PHE92, ILE100, VAL136, PHE141, ILE125, MET144, MET124, GLU11 (MET124) 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

	Número total de grupos/Confórmeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
8a	1/76	-9.75/ 71.15 nM	LEU105, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU127, GLU11 (GLU127)	
8b	1/97	-9.59/ 93.85 nM	PHE92, LEU105, ILE100, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU127, GLU11 (GLU127)	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

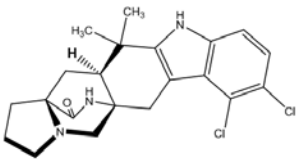
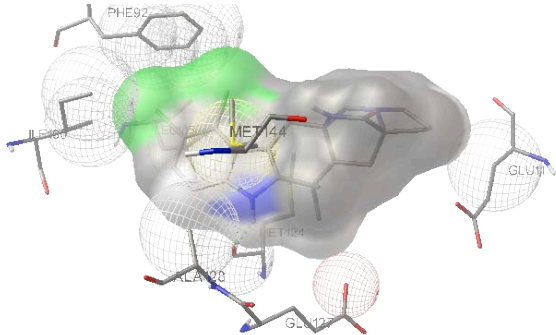
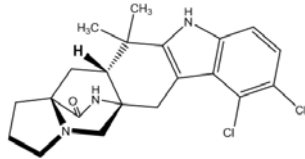
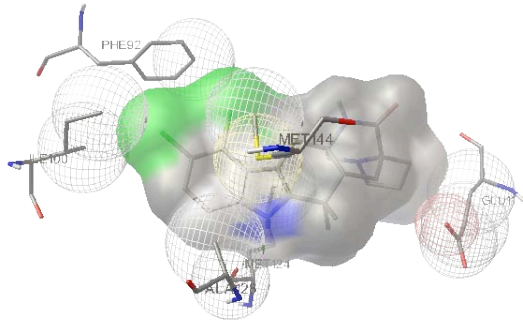
	Número total de grupos/Conformeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
9a	2/96	-8.20/ 983.58 nM	PHE92, ILE100, LEU105, MET144, MET124, ALA128, GLU127, GLU11 (MET124) 	
9b	2/77	-7.86/ 1.73 uM	PHE92, ILE100, MET144, ALA128, MET124, GLU11 (MET124) 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

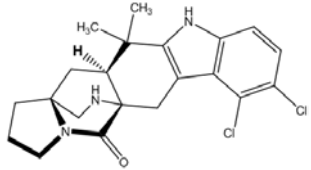
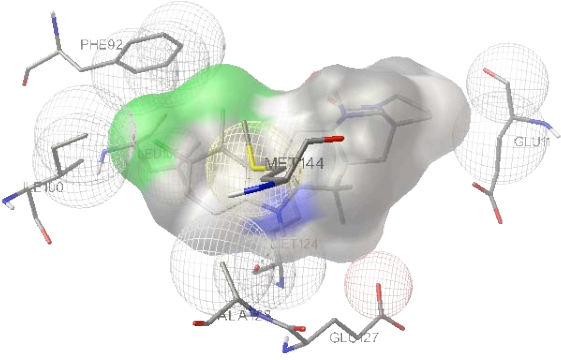
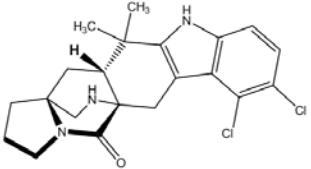
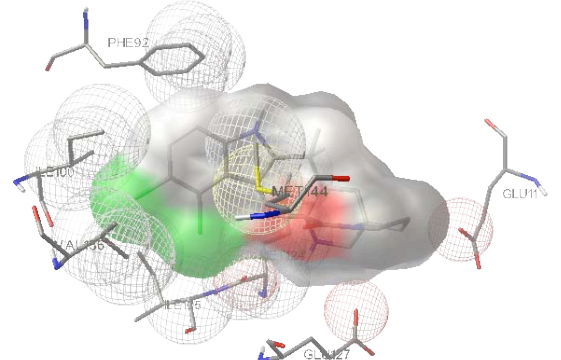
	Número total de grupos/Confórmeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
10a	3/59	-9.25/ 165.90 nM	PHE92, ILE100, LEU105, MET144, MET124, ALA128, GLU127, GLU11 (MET124) 	
10b	1/36	-9.15/ 197.26 nM	PHE92, ILE100, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU127, GLU11 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

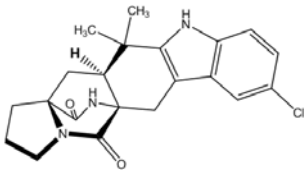
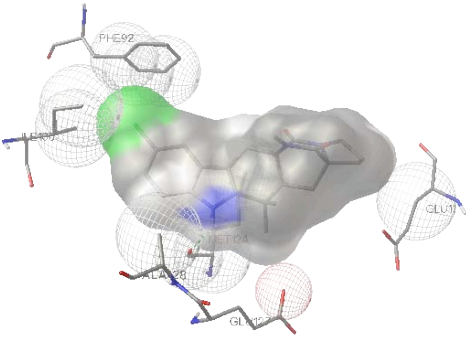
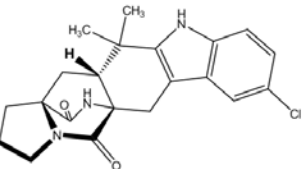
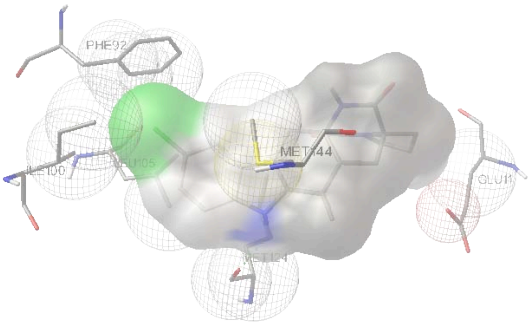
	Número total de grupos/Conformeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
11a	1/67	-7.97/ 1.43 μ M	PHE92, ILE100, ALA128, MET124, GLU127, GLU11 (MET124) 	
11b	3/33	-7.38/ 3.87 μ M	PHE92, ILE100, LEU105, MET144, MET124, GLU11 (MET124) 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

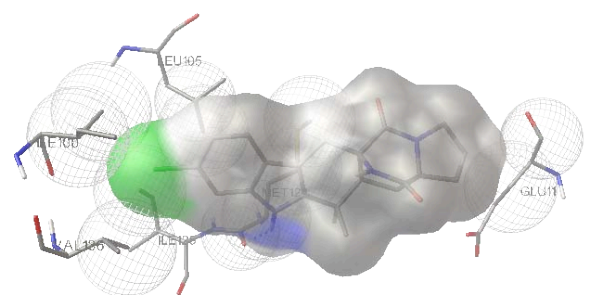
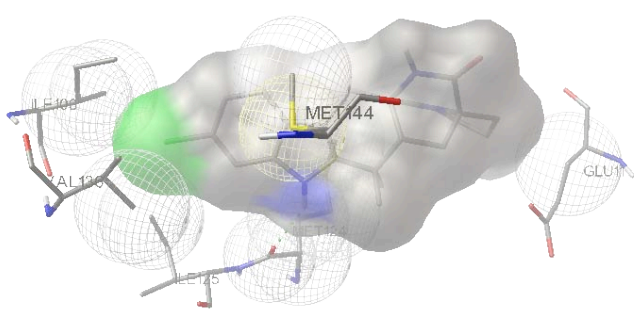
	Número total de grupos/Conformeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
12a	1/50	-7.90/ 1.63 μ M	ILE105, ILE100, VAL136, ILE125, MET124, GLU11 (MET124)	
12b	4/46	-7.44/ 3.51 μ M	ILE100, VAL136, ILE125, MET144, MET124, GLU11 (MET124)	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

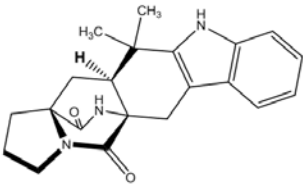
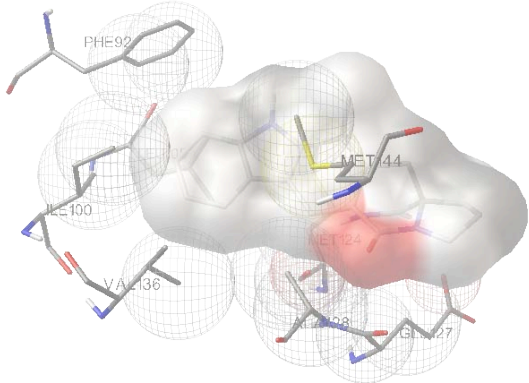
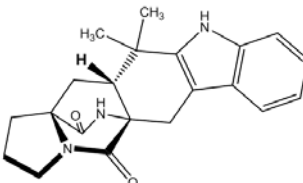
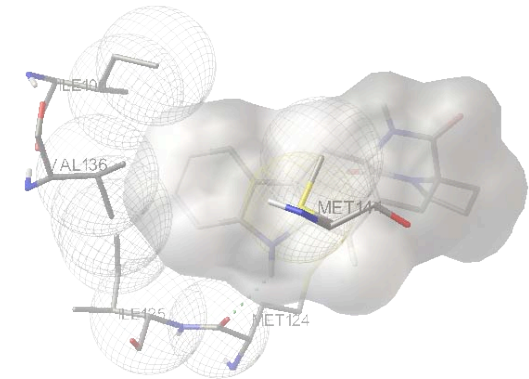
	Número total de grupos/Confórmeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
13a	1/44	-8.04/ 1.29 uM	PHE92, ILE100, VAL136, MET144, MET124, ALA128, GLU127 	
13b	4/42	-7.16/ 5.67 uM	ILE100, VAL136, ILE125, MET124, MET144 (MET124) 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

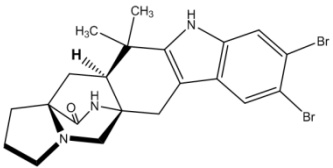
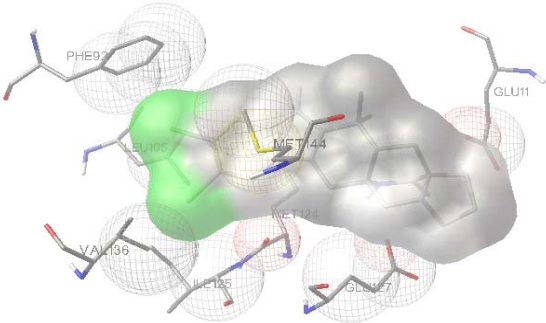
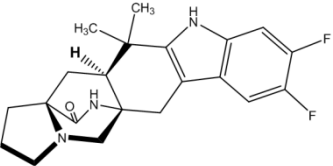
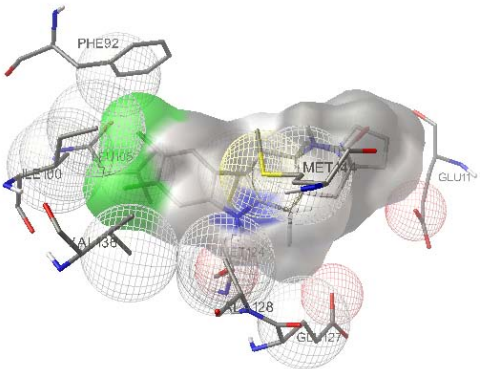
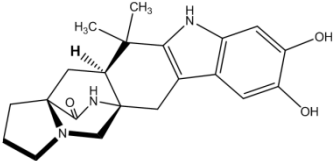
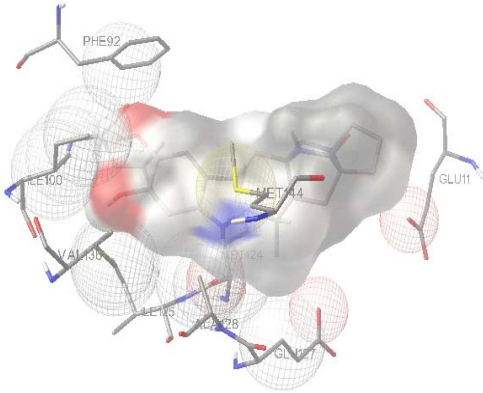
	Número total de grupos/Confórmers en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
14a	1/25	-8.76/ 379.06 nM	PHE92, MET144, LEU105, VAL136, ILE125, MET124, GLU127, GLU11 	
15a	1/100	-8.18/ 1.01 uM	PHE92, ILE100, VAL136, LEU105, MET124, MET144, ALA128, GLU127, GLU11 	

Tabla 8. Parámetros e información adicional sobre la interacción de los análogos sintéticos y propuestos de las malbranqueamidas con la proteína CaM generados mediante estudio de acoplamiento molecular: Interacción, energía libre de unión estimada (EFEB), constante de inhibición estimada (K_i), AA involucrados en el sitio de unión y tipo de enlaces (**continuación**).

	Número total de grupos/Confórmeros en grupo principal	EFEB (kcal/mol)/ K_i estimada	Residuos interactuando (HB)	
16a	3/82	-7.85/ 1.76 μ M	PHE92, ILE100, VAL136, ILE125, ALA128, MET124, MET144, GLU127, GLU11, ILE105 	

A partir de los resultados presentados en la **Tabla 8**, se modeló el sitio de unión en donde interactúan la mayoría de los compuestos analizados, considerando los AA ubicados en la región donde el ligando en la conformación bioactiva interaccionó *in silico* un mayor número de veces. El sitio generado se representa en la **Figura 17**. Los aminoácidos presentes en el sitio de unión modelado son ALA128, GLU11, GLU127, ILE100, ILE125, LEU105, MET124, MET144, PHE92 y VAL136.

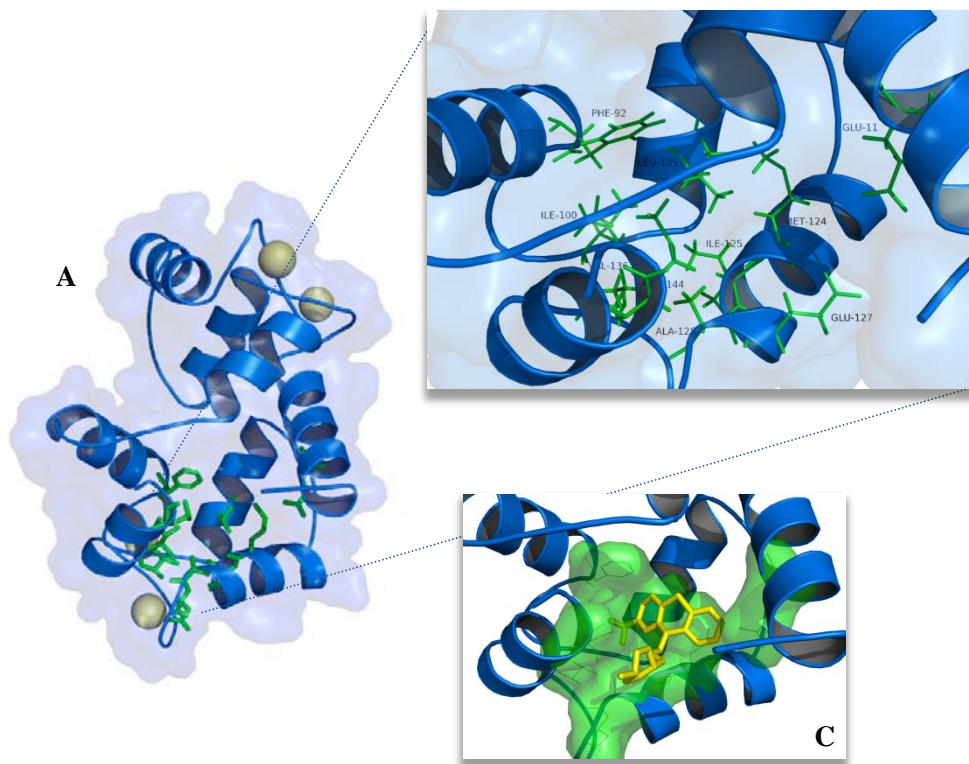


Figura 17. Sitio de interacción con la CaM de los ligandos analizados (A), residuos de aminoácidos involucrados (B) y superposición de la TFP en el pocket (C) (PDB ID 1a29).

El sitio de unión generado mediante el estudio teórico es idéntico al sitio donde interactúan experimentalmente los inhibidores clásicos de la CaM, CPZ y TFP.

Con base en la K_i estimada fue posible establecer una relación de estructura química-afinidad por la CaM de los compuestos estudiados. Los mejores productos fueron **8a**,

8b, 10a, 10b, 14a, 6a, 5a, 1, 9a, 15a, 1b, 13a, 5b, 11a y 12a con constantes de inhibición que oscilan entre 0.071 y 1.63 μM .

Los análogos con mayor afinidad a la CaM fueron **8a** y **8b** ($K_i=71.15$ y $K_i=93.85$ nM, respectivamente), dos enantiómeros que presentan un carbonilo en C-5 del biciclo[2.2.2]diazaoctano y dos átomos de cloro en el anillo indólico (posición C-8 y C-9). Estos dos compuestos son 13 y 10 veces más afines a la CaM que la malbranqueamida (**1**) y a diferencia de los demás productos, **8a** y **8b** forman enlaces de hidrógeno con el residuo de glutamina 127 (GLU127), y no con la MET124. Otros dos compuestos que presentaron buena actividad fueron el **10a** y **10b** que presentan en común con **8a** y **8b** la presencia de dos átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol, aunque en otras posiciones (C-7 y C-8), y la presencia de un carbonilo de amida en C-5. En este caso sólo el producto **10a** forma un puente de hidrógeno en el sitio de unión a la proteína, y al igual que la mayoría de los otros productos analizados, el puente se establece con la MET124. En la **Figura 18** se ilustra la interacción de los compuestos **8a** y el **10a** en el sitio de unión de la proteína.

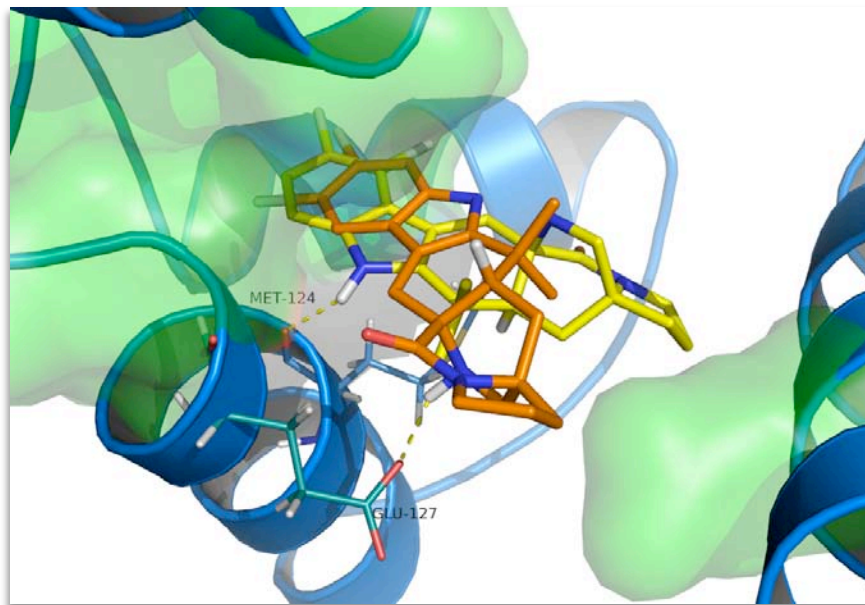


Figura 18. Superposición de los compuestos **8a** (bastones naranjas) y **10a** (bastones amarillos) en el sitio de unión a la CaM (superficie verde), destacando los puentes de hidrógeno (líneas punteadas) con los residuos GLU127 y MET124, respectivamente.

De los resultados obtenidos se puede concluir que el puente de hidrógeno con la GLU127 que establecen los isómeros **8a** y **8b** a través del carbonilo (C-5) de la función amida confiere a las moléculas un arreglo diferente y más estable, posiblemente, dentro del sitio de unión a la proteína CaM. Sin embargo, cuando en los compuestos **8a** y **8b** se introduce un carbonilo en C-14 (compuestos **5a** y **5b**, respectivamente) disminuye la constante de inhibición y la orientación de las moléculas en el sitio de unión o “pocket” es distinta. Así las K_i de los productos **5a** y **5b** fueron de 0.87 μM y 1.41 μM , respectivamente, es decir 12 y 15 veces menos activos que los productos **8a** y **8b**, respectivamente.

Evidentemente como se desprende de los resultados hasta ahora analizados, la presencia de halógenos y el número de estos en el anillo indólico tiene también implicaciones en la afinidad de los ligandos por el sitio de unión de la proteína. De tal forma, que todos los análogos con dos átomos de cloro, sin importar la posición, resultaron más activos que sus contrapartes monoclorados o sin ningún cloro. Para ilustrar esta aseveración basta comparar los productos **6b** vs **11b** vs **13b**, de los cuales el primero con dos halógenos fue más activo que **11b** con un halógeno y, **13b**, sin ningún halógeno, fue el menos activo de esta serie. En este sentido, una esquematización del potencial electrostático de superficie de la proteína (**Figura 19-A**) revela que la región en donde se unen preferentemente los análogos mono- y biclorados es ligeramente neutra (color blanco). Esto evidencia que existe una interacción electrostática entre la parte de la estructura parcialmente negativa (anillo indólico) del ligando y el sitio de unión de la proteína, siendo esta interacción mejor cuando hay presencia de uno o más átomos de cloro (caso de los compuestos **8a** y **11a**, de la **Figura 19-B**) ya que aumenta su densidad negativa, en comparación con la ausencia de este halógeno (caso del compuesto **13a**, **Figura 19-B**).

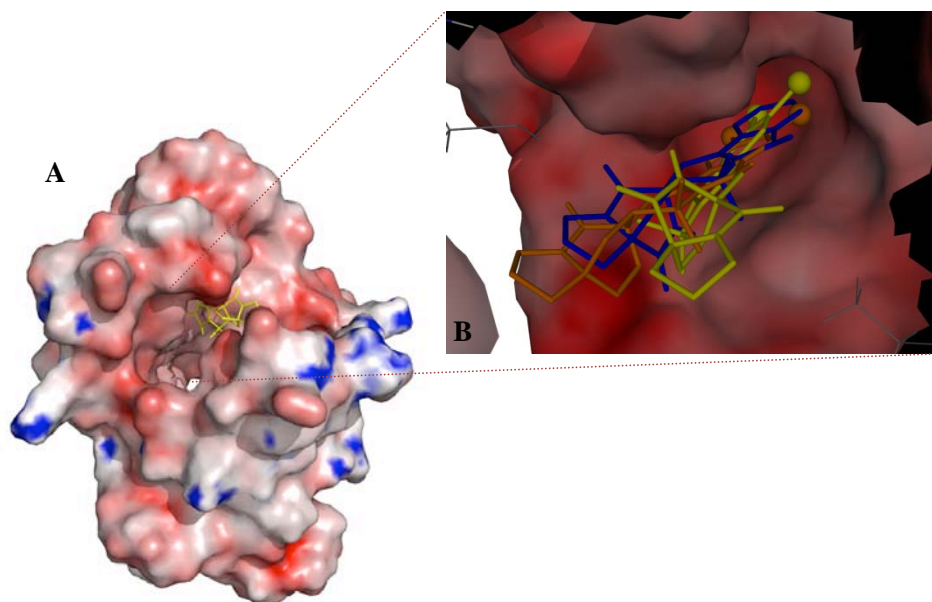


Figura 19. (A) Estructura de la CaM mostrando el Potencial de Superficie (calculado mediante el software APBS) en donde colores rojos indican densidad negativa, blancos neutra, y azules positiva. (B) Amplificación del sitio de unión, mostrando el Potencial de Superficie y la sobreposición de los compuestos **11a** (bastones amarillos), **8a** (bastones naranjas) y **13a** (bastones azules).

La afinidad de los análogos por el sitio de unión también se ve influenciada, aunque en mucho menor grado, por la estereoquímica relativa del C-12. Según los parámetros presentados en la **Tabla 8**, los isómeros con H α orientado en C-12, como en el caso de la malbranqueamida (**1**), son más activos que los isómeros con el hidrógeno β orientado.

Los datos obtenidos del estudio *in silico* concuerdan con los resultados experimentales obtenidos a través del bioensayo funcional y permitieron también establecer la influencia de la presencia de los átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol, la configuración relativa en C-12a y el grado de oxidación del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano sobre la afinidad de los productos por la CaM.

Por último, para determinar si la electronegatividad de los átomos presentes en el anillo indólico influye en la afinidad de la malbranqueamida (**1**) por la CaM, los estudios teóricos se extendieron a los análogos con F (**15a**), Br (**14a**) e hidroxilo (**16a**). El modelo teórico propuesto para la interacción de estos análogos con la proteína se ilustra en la **Figura 20**. De acuerdo al modelo estructural, la orientación de los compuestos hidroxilados y fluorados en el sitio de interacción (“pocket”) es idéntico entre ellos, y muy similar a la de la malbranqueamida. Así mismo, la afinidad de los tres compuestos no se modifica significativamente (K_i de 1.76, 1.01 y 1.41 μM , respectivamente, **Figura 21**). Estos resultados indican que la naturaleza de los sustituyentes electronegativos en el anillo carbocíclico del indol no afecta de manera importante la afinidad de la malbranqueamida por la proteína. La excepción de esta aseveración fue el derivado bromado (**14a**) que, siendo menos electronegativo, resultó más afín a la proteína que los otros dos análogos. El compuesto bromado no forma puentes de hidrógeno en el sitio de unión, orientando la molécula de diferente forma que la malbranqueamida (**1**). Esta circunstancia, aunada al radio atómico del bromo, hace que el compuesto **14a** adopte el mismo arreglo espacial que el compuesto **8a**, que fue el más afín a la proteína en este estudio. (**Figura 22**).

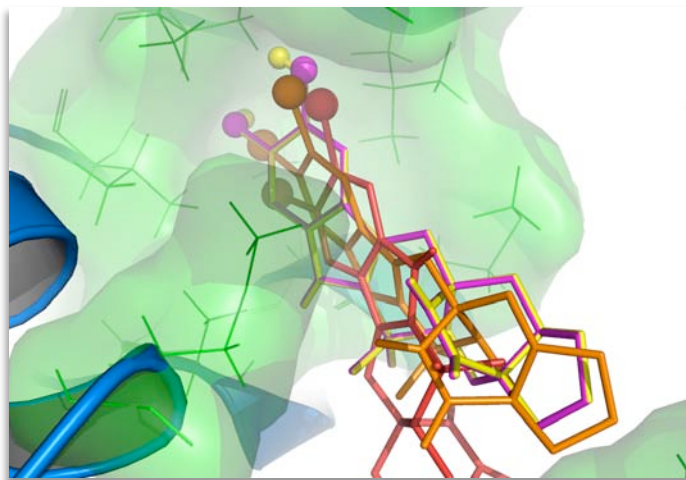


Figura 20. (A) Superposición de los compuestos **1** (bastones naranjas), **14a** (bastones rojos), **15a** (bastones morados) y **16a** (bastones amarillos) en el sitio de unión a la CaM.

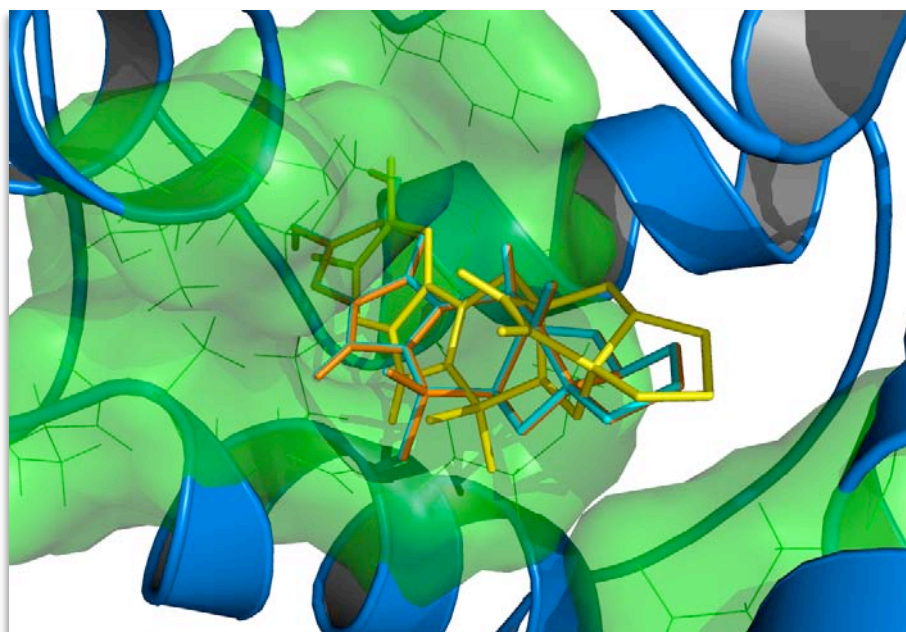


Figura 21. Superposición de la malbrancheamida (**1**, bastones amarillos) con los análogos **15a** (bastones azul) y **16a** (bastones naranjas).

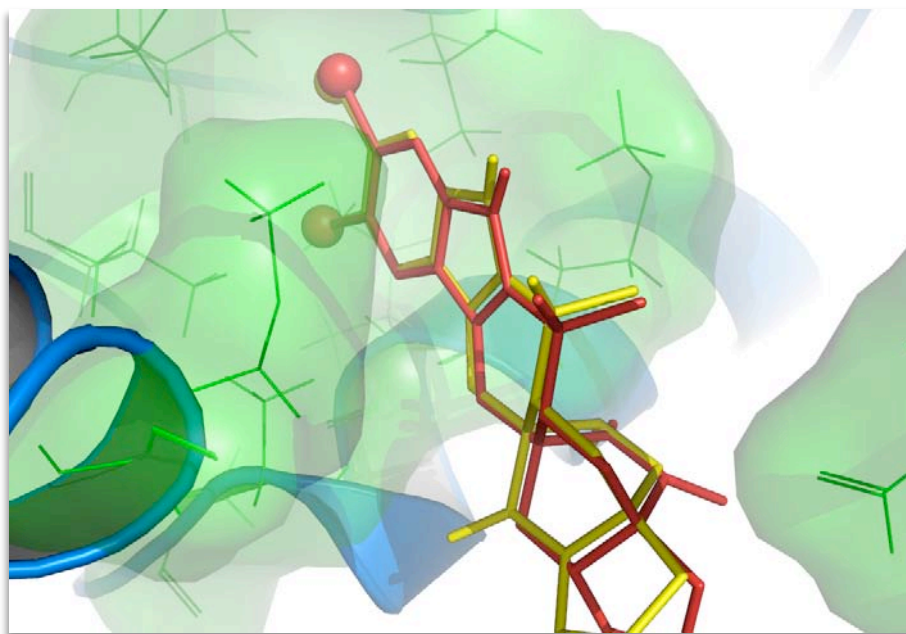


Figura 22. Comparación del arreglo espacial de los compuestos **14a** (bastones rojos) y el **8a** (bastones amarillos).

Con las evidencias antes presentadas, se puede concluir de manera general, que los análogos de la malbranqueamida estudiados interaccionan en el mismo sitio de unión que el reportado para los inhibidores clásicos; y que la mejor afinidad se obtiene con los derivados biclorados que poseen un carbonilo en C-5 y que presentan una configuración relativa α en C-12. Además permiten corroborar *in silico* que la malbranqueamida y sus análogos son inhibidores clásicos de la calmodulina.

7.5 Ensayos biológicos

7.5.1 Susceptibilidad antimicrobiana

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana fueron realizados según lo especificado por Chérigo (Cherigo, Pereda-Miranda et al. 2009), en placas de 96 pozos. Este ensayo se diseñó con bacterias de importancia médica, empleando para ello bacterias gram-positivas y gram-negativas, así como una especie fúngica, la levadura *Candida albicans*. Los resultados obtenidos tras haber leído a las 18 y 48 horas (bacterias y levadura, respectivamente), se muestran en la **Tabla 9**:

Tabla 9. Resultados del ensayo antimicrobiano para la malbranqueamida.

Bacterias G(+)	MIC (ppm)	Bacterias G(-)	MIC (ppm)
<i>Bacillus subtilis</i>	62.5	<i>Escherichia coli</i>	>500
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.25	<i>Salmonella typhi</i>	>500
Ampicilina (Control Positivo)	<1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>500
<i>Candida albicans</i>	>500	Fluconazol (Control Positivo)	2

Como se aprecia en la **Tabla 9**, el compuesto **1** inhibió el crecimiento de manera moderada para las bacterias gram-positivas, con una MIC de 62.5 ppm y 31.35 ppm para *B. subtilis* y *S. aureus*, respectivamente.

Estos resultados indican que la malbranqueamida no ofrece buenas perspectivas para el desarrollo de agentes antimicrobianos.

8. Conclusiones

- Se mejoró el proceso de obtención de las malbranqueamidas (**1-4**) a partir del extracto del medio de cultivo y micelio de *Malbranchea aurantiaca* mediante un fraccionamiento vía una partición ácido-base y posterior separación de los alcaloides de la fracción básica mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. La aplicación de esta estrategia permitirá duplicar el rendimiento de los alcaloides en trabajos futuros. Estos resultados corroboran una vez más que los métodos químicos de fraccionamiento son más eficientes si no modifican la estructura molecular de los compuestos que se desean obtener.
- La co-fermentación de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* con el hongo, *Paecilomyces* 26014, no altera de manera significativa la producción de metabolitos de naturaleza alcaloidea en *M. aurantiaca*. Durante la realización de estos experimentos fue posible detectar la presencia de alcaloides en el aislamiento *Paecilomyces* 26014.
- La malbranqueamida (**1**), la malbranqueamida B (**2**) y la isomalbranqueamida (**3**) se comportan como inhibidores clásicos de la proteína CaM ya que no solo inhiben la activación de la enzima PDE1 si no que también apagan la fluorescencia extrínseca del biosensor de CaM *hCaMM124C-mBBr* y modifican los espectros de dicroísmo de la proteína. En todos los casos los efectos se compararon con los de la CPZ. Los experimentos de fluorescencia permitieron calcular también las constantes de inhibición y la estequiometría de los complejos malbranqueamidas-CaM.
- La malbranqueamida (**1**) presenta diferentes afinidades por los complejos proteicos CaM-Ca²⁺-PDE1 y CaM-Ca²⁺-MLCK, siendo más afín por el primero ($K_d=0.287\pm 0.088$ μM y $K_d=0.550\pm 0.087$ μM , respectivamente). Las implicaciones farmacológicas que se desprenden de estos resultados son de gran relevancia, ya que se podrían controlar de

manera selectiva diversos procesos patológicos en los que está involucrada la proteína CaM y estas enzimas.

- Con base en los análisis de acoplamiento molecular, las características estructurales que le confieren a las malbanqueamidas y sus análogos una mayor afinidad por la CaM, son las siguientes: dos átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol; un grupo carbonilo en C-5 del biciclo[2.2.2]diazaoctano, así como una estereoquímica relativa α en C-12. Además, se identificó que el sitio de unión de los análogos de la malbranqueamida (**1**) coincide con el reportado para la CPZ, un inhibidor clásico de la calmodulina.

9. Perspectivas

- Resolver la estructura cristalográfica del complejo CaM-Ca²⁺-malbranqueamida con la finalidad de corroborar su sitio de unión experimentalmente y de esta manera enriquecer la información que se tiene hasta la fecha de complejos CaM-ligando en el Banco de Datos de Proteínas (PDB).
- Aislar, purificar y elucidar estructuralmente el o los compuestos de carácter alcaloideo presentes en los extractos (CA's) de la especie fúngica *Paecilomyces* 26014.
- Ampliar la información generada para la interacción de la malbranqueamida (**1**) con los complejos CaM-Ca²⁺-PDE1 y CaM-Ca²⁺-MLCK por medio de ensayos *in vitro*, utilizando modelos con cultivos celulares, o bien tejidos aislados.

10. Bibliografía

- ❖ Acharya, K. R. and M. D. Lloyd (2005). "The advantages and limitations of protein crystal structures." Trends Pharmacol Sci **26**(1): 10-4.
- ❖ Allen, M. W., R. J. Urbauer, et al. (2004). "Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments." Anal Biochem **325**(2): 273-84.
- ❖ Babu, Y. S., C. E. Bugg, et al. (1988). "Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution." J Mol Biol **204**(1): 191-204.
- ❖ Babu, Y. S., J. S. Sack, et al. (1985). "Three-dimensional structure of calmodulin." Nature **315**(6014): 37-40.
- ❖ Brini, M. and E. Carafoli (2000). "Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives." Cell Mol Life Sci **57**(3): 354-70.
- ❖ Carafoli, E. (1987). "Intracellular calcium homeostasis." Annu Rev Biochem **56**: 395-433.
- ❖ Carafoli, E. and J. T. Penniston (1985). "The calcium signal." Sci Am **253**(5): 70-8.
- ❖ Crouch, T. H. and C. B. Klee (1980). "Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin." Biochemistry **19**(16): 3692-8.
- ❖ Charpentreau, M., K. Jaworski, et al. (2004). "A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein." Biochem J **379**(Pt 3): 841-8.
- ❖ Cheng, Y., B. Schneider, et al. (2004). "Farinosones A-C, neurotrophic alkaloidal metabolites from the entomogenous deuteromycete *Paecilomyces farinosus*." J Nat Prod **67**(11): 1854-8.
- ❖ Cheng, Y., B. Schneider, et al. (2006). "(+)-N-Deoxymilitarinone A, a neurotogenic pyridone alkaloid from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*." J Nat Prod **69**(3): 436-8.
- ❖ Cherigo, L., R. Pereda-Miranda, et al. (2009). "Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*." Phytochemistry **70**(2): 222-7.

- ❖ Chin, D. and A. R. Means (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." Trends Cell Biol **10**(8): 322-8.
- ❖ Chiung, Y. M., T. Fujita, et al. (1993). "A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54." J Antibiot (Tokyo) **46**(12): 1819-26.
- ❖ Chock, S. P. and C. Y. Huang (1984). "An optimized continuous assay for cAMP phosphodiesterase and calmodulin." Anal Biochem **138**(1): 34-43.
- ❖ Chou, J. J., S. Li, et al. (2000). "Study of conformational rearrangement and refinement of structural homology models by the use of heteronuclear dipolar couplings." J Biomol NMR **18**(3): 217-27.
- ❖ Demain, A. L. and S. Sanchez (2009). "Microbial drug discovery: 80 years of progress." J Antibiot (Tokyo) **62**(1): 5-16.
- ❖ Ding, Y., T. J. Greshock, et al. (2008). "Premalbrancheamide: synthesis, isotopic labeling, biosynthetic incorporation, and detection in cultures of *Malbranchea aurantiaca*." Org Lett **10**(21): 4863-6.
- ❖ Donadio, S., P. Monciardini, et al. (2002). "Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites." J Biotechnol **99**(3): 187-98.
- ❖ Figueroa, M. (2009). Elucidación estructural y estudios de interacción ligando-proteína de inhibidores selectos de la calmodulina obtenidos de las especies fúngicas *Malbranchea aurantiaca* y *Emericella* 25379. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Tesis Doctorado**: 110.
- ❖ Figueroa, M., C. M. Cerda-Garcia-Rojas, et al. (2008). "Tajixanthonones analogs from a new *Emericella* sp strain 25379." Planta Medica **74**(9): 1056-1056.
- ❖ Figueroa, M., C. Gonzalez Mdel, et al. (2008). "Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Nat Prod Res **22**(8): 709-14.
- ❖ Figueroa, M., C. Gonzalez Mdel, et al. (2009). "Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp." Bioorg Med Chem **17**(6): 2167-74.
- ❖ Gabdoulline, R. R. and R. C. Wade (2002). "Biomolecular diffusional association." Curr Opin Struct Biol **12**(2): 204-13.
- ❖ Gangopadhyay, J. P., Z. Grabarek, et al. (2004). "Fluorescence probe study of Ca²⁺-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor." Biochem Biophys Res Commun **323**(3): 760-8.

- ❖ Gibbons, S., M. Oluwatuyi, et al. (2003). "Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*." Phytochemistry **62**(1): 83-7.
- ❖ Gonzalez-Andrade, M., M. Figueroa, et al. (2009). "An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein." Analytical Biochemistry **387**(1): 64-70.
- ❖ Goraya, T. A. and D. M. Cooper (2005). "Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives." Cell Signaling **17**(7): 789-97.
- ❖ Gul, W. and M. T. Hamann (2005). "Indole alkaloid marine natural products: an established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases." Life Science **78**(5): 442-53.
- ❖ Harmat, V., Z. Bocskei, et al. (2000). "A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies." J Mol Biol **297**(3): 747-55.
- ❖ Harmon, A. C., H. W. Jarrett, et al. (1984). "An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity." Analytical Biochemistry **141**(1): 168-78.
- ❖ Harvey, A. (2000). "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products." Drug Discov Today **5**(7): 294-300.
- ❖ Horvath, I., V. Harmat, et al. (2005). "The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug." J Biol Chem **280**(9): 8266-74.
- ❖ Hosoe, T., T. Iizuka, et al. (2005). "4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300." Phytochemistry **66**(23): 2776-9.
- ❖ Jagadeesh, S., T. Padma, et al. (2006). "Inhibition of calmodulin-dependent cyclic AMP phosphodiesterase by phenoxazines." Biochem Biophys Res Commun **342**(3): 690-701.
- ❖ Jaren, O. R., S. Harmon, et al. (2000). "Paramecium calmodulin mutants defective in ion channel regulation can bind calcium and undergo calcium-induced conformational switching." Biochemistry **39**(23): 6881-90.

- ❖ Kakiuchi, S., Yamazaki, R. (1970). "Calcium-dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase." Biochem, Biophys. Res. Commun. **41**: 1104-1110.
- ❖ Kakkar, R., R. V. Raju, et al. (1999). "Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1)." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1164-86.
- ❖ Ladbury, J. E. and M. A. Williams (2004). "The extended interface: measuring non-local effects in biomolecular interactions." Curr Opin Struct Biol **14**(5): 562-9.
- ❖ Lalor, D. J., T. Schnyder, et al. (2003). "Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity." Protein Eng **16**(12): 1071-9.
- ❖ Madariaga-Mazón, A. (2008). Malbrancheamida C, un nuevo alcaloide de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichel. Facultad de Química. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. Licenciatura: 47.
- ❖ Martínez-Luis, S., M. C. Gonzalez, et al. (2005). "Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Phytochemistry **66**(9): 1012-6.
- ❖ Martínez-Luis, S., A. Perez-Vasquez, et al. (2007). "Natural products with calmodulin inhibitor properties." Phytochemistry **68**(14): 1882-903.
- ❖ Martínez-Luis, S., R. Rodriguez, et al. (2006). "Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*." Tetrahedron **62**(8): 1817-1822.
- ❖ Martínez-Luis, S. I. (2007). *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmichel, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. **Doctorado**: 176.
- ❖ Masino, L., S. R. Martin, et al. (2000). "Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin." Protein Sci **9**(8): 1519-29.
- ❖ Mata, R., R. Bye, et al. (2003). "Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*." Phytochemistry **64**(1): 285-91.
- ❖ Miller, D. M., 3rd, J. S. Olson, et al. (1983). "Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis." J Biol Chem **258**(22): 13665-72.

- ❖ Miller, K. A., M. Figueroa, et al. (2008). "Calmodulin inhibitory activity of the malbrancheamides and various analogs." Bioorg Med Chem Lett **18**(24): 6479-81.
- ❖ Miyadoh, S. (1993). "Research on antibiotic screening in japan over the last decade: A producing microorganism approach." Actinomycetologica **7**: 100-106.
- ❖ Morris, G. M., Goodsell, R.S., Halliday, R., Huey, W.E., Hart, R.K., Belew, A.O. (1998). "Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function " J. Comp. Chem. **19**: 1639-1662.
- ❖ Newman, D. J. and G. M. Cragg (2007). "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years." J Nat Prod **70**(3): 461-77.
- ❖ O'Day, D. H. (2003). "CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins." Cell Signal **15**(4): 347-54.
- ❖ Odom, A., M. Del Poeta, et al. (1997). "The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein." Antimicrob Agents Chemother **41**(1): 156-61.
- ❖ Okubo, T. and S. Okada (1998). "Kinetic Analyses of Colloidal Crystallization in Alcoholic Organic Solvents and Their Aqueous Mixtures As Studied by Reflection Spectroscopy." J Colloid Interface Sci **204**(1): 198-204.
- ❖ Orosz, F., T. Y. Christova, et al. (1988). "Functional in vitro test of calmodulin antagonism: effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes." Mol Pharmacol **33**(6): 678-82.
- ❖ Perez-Iratxeta, C. and M. A. Andrade-Navarro (2008). "K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra." BMC Struct Biol **8**: 25.
- ❖ Saito, M., I. Matsuura, et al. (1979). "Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus." J Antibiot (Tokyo) **32**(11): 1210-2.
- ❖ Schlegel, B., Haertl, A., Gollmick, F.A. and Graede, U. (2003). "7-methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286." Journal of Antibiotics **56**: 792-794.
- ❖ Schlegel, B., F. Hanel, et al. (2003). "New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast." Journal of Antibiotics (Tokyo) **56**(11): 917-22.

- ❖ Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. Florida, CRC Press.
- ❖ Sharma, R. K. (2003). "Diversity of calcium action in regulation of mammalian calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase." Indian Journal of Biochemistry & Biophysics **40**: 77-91.
- ❖ Sharma, R. K. and J. H. Wang (1979). "Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein." Adv Cyclic Nucleotide Res **10**: 187-98.
- ❖ Sharma, R. K. a. H. R. A. (1996). Ca²⁺/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. Phosphodiesterase inhibitors. New York, Academic Press: 65-79.
- ❖ Singh, I., A. Mishra, et al. (2009). "Dermatophytes, related keratinophilic and opportunistic fungi in indoor dust of houses and hospitals." Indian J Med Microbiol **27**(3): 242-6.
- ❖ Takahashi, Y. and S. Omura (2003). "Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds." J Gen Appl Microbiol **49**(3): 141-54.
- ❖ VanScyoc, W. S. and M. A. Shea (2001). "Phenylalanine fluorescence studies of calcium binding to N-domain fragments of *Paramecium* calmodulin mutants show increased calcium affinity correlates with increased disorder." Protein Sci **10**(9): 1758-68.
- ❖ Vertessy, B. G., V. Harmat, et al. (1998). "Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies." Biochemistry **37**(44): 15300-10.
- ❖ Williams, R. M. and R. J. Cox (2003). "Paraherquamides, brevianamides, and asperparalines: laboratory synthesis and biosynthesis. An interim report." Acc Chem Res **36**(2): 127-39.
- ❖ Yang, Y. L., W. Y. Liao, et al. (2009). "Discovery of new natural products by intact-cell mass spectrometry and LC-SPE-NMR: malbranpyrroles, novel polyketides from thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*." Chemistry **15**(43): 11573-80.

- ❖ Yurimoto, S., N. Hatano, et al. (2009). "Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein." Biochemistry **48**(18): 3946-55.