



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**RELACIÓN DEL GRADO DE SATURACIÓN DE Ca^{+2} EN
LA AFINIDAD DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS
INHIBIDORAS DE LA CaM Y SU EFECTO
FARMACOLÓGICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
NATZIDIELLY VERA MONSALVO**



MÉXICO, Cd. Mx., Octubre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: MONTIEL PACHECO CARMINA
VOCAL: IGNACIO VICENTE CEFERINA
SECRETARIO: GONZÁLEZ ANDRADE MARTÍN
1er. SUPLENTE: JOSE EDUARDO ROA CORIA
2° SUPLENTE: LUZ XOCHIQUETZALLI VASQUEZ BOCHM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

TORRE DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE _____

SUSTENTANTE:

NATZIDIALLY VERA MONSALVO _____

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la finalización de este trabajo y en particular a las siguientes personas e instituciones:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de la Facultad de Química y sus profesores me permitió formarme académicamente.

A la facultad de Medicina, especialmente a la Torre de Investigación, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo dentro de sus instalaciones.

Al financiamiento aportado para esta investigación, a través del programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IA204116 y de super cómputo LANCAD-UNAM-DGTIC-313 de la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación, UNAM.

Contenido

RESUMEN	6
ABREVIATURAS.....	7
Ångström	7
Guanosín monofosfato cíclico.....	7
Quinasa de Cadena Ligera de Miosina.....	8
INTRODUCCIÓN	10
Interacciones moleculares entre blancos moleculares y fármacos	10
Interacciones biomoleculares de fármacos	11
La proteína calmodulina (CaM), como un blanco molecular	12
Papel del ion Ca^{2+} en la actividad de la proteína CaM.....	17
Calmodulina como blanco molecular de fármacos	21
Fármacos anti-CaM	22
Interacciones de CaM con fármacos.....	25
Equilibrio químico aplicado a la interacción proteína-ligando.....	26
La constante de disociación o unión (K_d).....	26
Relación entre K_d y la variación de energía libre en la unión.....	27
Métodos utilizados para el estudio de las interacciones biomoléculas con sus ligandos (CaM-Ligandos).....	28
Métodos teóricos	29
Métodos experimentales.....	32
Fármacos y prototipos de fármacos de la CaM.....	37
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
MATERIALES	41
Fármacos y prototipo de fármacos	41
Biosensor CaM M124C-mbbr	41
Súper computadora Mitzli de la UNAM.....	41
MÉTODOS.....	41
Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)	41
Dinámica molecular	42

Determinación de la K_d de los compuestos bioactivos de la CaM por fluorescencia.....	43
Estimación del ΔG experimental a partir de la K_d	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
Estudios experimentales de unión de los diferentes ligandos con CaM.....	44
Estudios teóricos de unión de los diferentes ligandos con CaM	57
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA	65
APÉNDICE.....	72
Estudio teórico	72
I. Construcción de estructuras pdb.....	72
II. Obtención de la proteína CaM.....	72
III. Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking).....	72
IV. Preparación del complejo para DM.....	73
V. Ejecución de DM.....	74
VI. Minimización, calentamiento, equilibrio, densidad – súpercomputadora Miztli de la UNAM	76
VII. Análisis de trayectorias	79
VIII. Gráficas completas de los espectros de fluorescencia obtenidos a partir de la titulación del biosensor hCaM-m1124C mBBr con los diferentes fármacos y prototipos de fármacos a diferentes equivalentes de Ca^{2+}	79
Anexo	86
Teoría de la fluorescencia	86
Principios de fluorescencia	86
Procesos de disipación de energía.....	86
Apagamiento colisional.....	87
Importancia de la espectroscopia de fluorescencia	88
Espectrofluorómetro.....	89
Fluoróforos.....	89
Estándares utilizados en fluorescencia.....	90
Efectos sobre el espectro de emisión	91

RELACIÓN DEL GRADO DE SATURACIÓN DE Ca^{2+} EN LA AFINIDAD DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS INHIBIDORAS DE LA CaM Y SU EFECTO FARMACOLÓGICO

RESUMEN

Los fármacos inhibidores de la proteína calmodulina (CaM) presentan diversos efectos farmacológicos, tales como anticancerígenos, antipsicóticos, relajantes musculares, bloqueadores α -adrenérgicos, entre los más importantes. Estos fármacos también presentan algunos efectos colaterales, los cuales están relacionados con el propio mecanismo de acción propuesto, el cual se establece conociendo la interacción Ca^{2+} -CaM-Fármaco. Por lo que en este trabajo se estudian las interacciones moleculares de siete compuestos identificados como inhibidores de CaM y otras moléculas bioactivas prototipo de fármacos en función del grado de saturación de Ca^{2+} utilizando un biosensor de CaM y herramientas de modelaje molecular.

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido para transformar la información de las interacciones químicas en señales analizables por medio de mecanismos bioquímicos. El biosensor *hCaM M124C-mBBR* tiene la capacidad de monitorear la unión del ion calcio, así como la de los inhibidores de la CaM de manera independiente, con lo cual podemos determinar K_d 's de inhibidores en relación con el grado de saturación del ion Ca^{2+} . Por otro lado, las herramientas de modelaje molecular utilizadas en este trabajo se refieren a los métodos teóricos, que se aplican a través de algoritmos computacionales para simular el comportamiento de las moléculas de un sistema, en este caso del complejo 4Ca^{2+} -CaM-Fármaco; para obtener diferentes parámetros teóricos de unión (ΔG , ΔH , ΔS y K_i). Con esto dos enfoques complementarios se pretende establecer una relación entre la afinidad de los fármacos a la CaM con respecto al grado de saturación de calcio y sus posibles implicaciones farmacológicas.

ABREVIATURAS

Φ, φ_F, Q	Rendimiento cuántico
λ	Longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
^{13}C	Isótopo de carbono 13
^{15}N	Isótopo de nitrógeno 15
Å	Ångström
A7	A-7 Hidrocloruro
ADH	Hormona antidiurética
AMA	Amantadina
Apo-CaM	Calmodulina en su forma libre de calcio y de ligando
Atm	Atmósferas
BIS I	Bisindolilmaleimida
Ca^{2+}	Ión calcio
CAL	Cloruro de calmidazolio
Cal	Calorías
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
Cl^-	Ión cloruro
CPZ	Ciprofloxacina
DM	Dinámica molecular
DPH	Piruvato deshidrogenasa
E6	E6 Berbamina
FM	Femtomolar
FRET	Fenómeno transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
Gln	Glicina
Glu	Glutamina
GOx	Glucosa oxidasa
GPF	Proteína verde fluorescente

GSK ₃	Quinasa de la glucógeno sintasa 3
GSK ₃ β	Quinasa de la glucógeno sintasa 3 beta
H ⁺	Ion hidronio
H ₂ O	Molécula de agua
hCaM	Proteína calmodulina humana
IC ₅₀	Constante de inhibición al 50%
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
J8	J8 Hidrocloruro
K	Unidad de temperature Kelvin
K ⁺	Ión potasio
K _d	Constante de unión
kDa	Kilodaltons
L	Ligando libre
L ₀	Concentración del ligando
Leu	Leucina
LGA	Algoritmo genético lamarckiano
M124C	Modificación del aminoácido metionina 124 por una cisteína
M	Unidad Molar
MAS	Mastoparan
MBBr	Fluoróforo - monobromobinano
Met	Metionina
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Millimolar
ms	Milisegundos
MYLK	Quinasa de Cadena Ligera de Miosina
NAMD	Rendimiento cuántico
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
nM	Nanomolar

ns	Nanosegundos
P_0	Concentración de proteína
PDE	Enzima fosfodiesterasa
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PKA	Proteína de unión A
pKa	Constante de disociación ácida
PKC	Proteína de union C
PL	Complejo proteína - ligando
R	Constante general de los gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación de la media cuadrática
S_0	Estado electrónico basal
S_i	Estado electrónico basal
SNC	Sistema nervioso central
T	Temperatura
TFP	Trifluoperazine
Trp	Triptofano
ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔH	Entalpía
ΔS	Entropía
μM	Micromolar

INTRODUCCIÓN

Interacciones moleculares entre blancos moleculares y fármacos

Las interacciones entre macromoléculas, en general, son esenciales para cualquier proceso biológico. Ejemplos de estas incluyen la transferencia de información, inhibición o activación de la función enzimática, el reconocimiento molecular en el sistema inmune, el ensamblaje de estructuras macromoleculares y moleculares, etc. Las proteínas son macromoléculas que interactúan con otras proteínas o moléculas a través de la energía de afinidad, que varía desde órdenes de mM a fM. El grado de afinidad es determinante para la formación de complejos de tipo proteína-ligando, siendo el ligando iones Ca^{2+} , proteínas, enzimas, fármacos, péptidos, etc, la cantidad de los diferentes complejos formados están relacionados con las concentraciones locales.

La concentración de un complejo específico es generalmente baja en la célula (nM a mM), la concentración total de las macromoléculas es alta, permitiendo que las interacciones débiles y no específicas jueguen papeles importantes en el contexto celular [1]. La especificidad de las proteínas implica la unión a una molécula específica junto con la no unión a otras proteínas. Otro factor requerido es la distancia entre las dos macromoléculas este efecto es dependiente de la concentración, teniendo en cuenta las interacciones de la barrera energética [1].

Las proteínas se involucran en numerosas interacciones de tipo proteína-proteína, proteína-péptido, proteína-lípido, proteína-carbohidrato que en conjunto regulan diversos procesos biológicos en la célula. Según algunas estimaciones, más de un tercio de todas las proteínas de mamíferos son proteínas multiespecíficas, que interactúan con más de un ligando y juegan un papel central en la organización modular de las redes de interacción entre proteínas. El conocimiento a nivel molecular que rigen las interacciones multiespecíficas, es importante no sólo para el avance de la ciencia básica, sino también para la ciencia aplicada, tal como en el caso del diseño de nuevos fármacos que

modifican las interacciones en los complejos proteína-fármaco y proteína-proteína-fármaco [2].

Interacciones biomoleculares de fármacos

Las biomoléculas se encuentran realizando múltiples funciones, entre estas podemos encontrar a proteínas, canales iónicos, receptores intra o extra celulares. Estas intervienen en la señalización química celular y extracelular; pueden encontrarse en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Los receptores en su forma activa regulan, ya sea de forma directa o indirecta, las rutas metabólicas, la polarización iónica, la fosforilación y desfosforilación proteica, la transcripción genética, la actividad o inactividad enzimática. Los ligandos son moléculas efectoras como los fármacos, hormonas, iones y neurotransmisores que se unen a una biomolécula para modificar su actividad. Un ligando puede activar o inactivar una biomolécula; a su vez, la activación puede incrementar o reducir la actividad de una determinada función celular. Cada ligando puede interactuar con una o varias biomoléculas y con diferentes afinidades. Muy pocos fármacos, son altamente específicos para una biomolécula (blanco molecular). Sin embargo, la mayoría de los fármacos presenta una relativa selectividad. La selectividad es el grado en que un fármaco actúa sobre un sitio de unión en una biomolécula, y esta unión depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del fármaco hacia las biomoléculas.

La capacidad de un fármaco para interactuar con un blanco molecular depende del grado de afinidad del fármaco; definido como, la probabilidad de que el fármaco llegue y ocupe un sitio de unión en la biomolécula en un instante dado, y de la actividad intrínseca es decir, el grado en que un ligando activa a una biomolécula y propicie una respuesta celular. Tanto la afinidad como la actividad de un fármaco dependen de su estructura química (propiedades fisicoquímicas de los grupos químicos que posee la molécula) y de la concentración o disponibilidad de este en el sistema.

La capacidad de unión a las biomoléculas en diversas ocasiones se encuentra comprometida por factores externos y por mecanismos reguladores

intracelulares. Por ejemplo, la cantidad basal de blancos moleculares o la eficiencia de los mecanismos estímulo-respuesta los cuales no son iguales en todos los tejidos u órganos. El número y la afinidad de unión de las biomoléculas pueden aumentar (regulación positiva) o disminuir (regulación negativa) en función de los fármacos, el deterioro celular (senescencia), las mutaciones genéticas individuales y las patologías.

Los ligandos se unen a regiones moleculares específicas de las biomoléculas receptoras, denominadas sitios de reconocimiento molecular. El sitio de unión del fármaco puede ser compartido con otros efectores o en el caso de las enzimas con su sustrato. En algunas ocasiones, los fármacos que se unen a un punto adyacente o distinto al sitio de unión a ligando endógeno, se denominan ligandos alostéricos, los cuales son los fármacos ideales ya que los efectos farmacológicos que producen estos son independientes de la concentración (cita).

Las propiedades farmacológicas suelen estar asociadas a la naturaleza química del fármaco, lo que a su vez está relacionado directamente con la capacidad que tiene esta molécula para interactuar con su blanco molecular y causar una respuesta a nivel fisiológico. Una forma de conocer como es esta interacción entre el fármaco y su blanco molecular es estudiando las interacciones entre ellos a nivel molecular, lo cual es conocido como mecanismo de acción farmacológico. El conocer a detalle la interacción entre los fármacos y sus receptores tiene una serie de ventajas entre las que se incluyen, posologías precisas, efectos adversos identificados, sinergismos establecidos, contraindicaciones conocidas, entre las más importantes.

La proteína calmodulina (CaM), como un blanco molecular

La calmodulina (CaM) es un paradigma de una proteína multiespecífica, con más de 300 blancos moleculares de la CaM identificados hasta la fecha [3]. La CaM puede unirse y regular a sus ligando a través de la concentración de Ca^{2+} intracelular o extracelular, diferentes proteínas mediadoras de procesos; como la inflamación, la motilidad celular, la proliferación celular, el metabolismo de

nucleótidos, la transcripción de genes, la fosforilación/desfosforilación de proteínas, el transporte de iones, apoptosis, la contracción de músculo, entre las más importantes. Y a través de la unión con el Ca^{2+} , induce un cambio estructural en la proteína que le permite unirse a moléculas específicas [2].

La proteína CaM al ser una proteína sensora de Ca^{2+} regula numerosas vías metabólicas sensibles al calcio en las células, siendo esta proteína la principal traductora de señales intracelulares de calcio [4]. La CaM está relacionada con alrededor de 40 proteínas intracelulares conocidas, cuyas actividades están moduladas por los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, algunos ejemplos de estas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas reguladas por la calmodulina

Proteína	Descripción	Referencia
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G	[5]
mGluR7	Receptor metabotrópico de glutamato 7	[5]
Angiotensina IIR	Receptor de angiotensina II	[5]
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	[5]
IP ₃ R	Receptores de ryanodina e inositol 1,4,5 trisfosfato	[6]
CaMKI-V	Quinasas dependientes de CaM	[5]
CaMKKs	Quinasas CaMK	[5]
NOSI, III	Óxido nítrico sintasas I y III	[7]
PDE1 y 2	Fosfodiesterasas 1 y 2	[8]
Miosinas	Varias isoformas de miosina	[5]
PYGB	Glicógeno fosforilasa	[5]
CNA	Proteína fosfatasa calcineurina	[9]
AC	Adenilato ciclasa 1 y 8	[10]
MLCK	Cinasa de cadena ligera de la miosina	[5]
MLCK II	Cinasa de cadena ligera de la miosina II	[5]
RyR-1	Canales de rianodina	[11]
Caldesmona	Proteínas fijadoras de actina	[12]
Espectrina	Proteína en el citoesqueleto cortical de los eritrocitos	[3]
Aducina	Proteína propia del citoesqueleto de la membrana plasmática	[13]
P-57, GAP-43 y B-50	Neuromodulinas	[14]
NGRN	Neurograninas	[5]
Cabin 1	Regulador transcripcional de timocitos	[15]
NAP-22	Sustrato neuronal de la proteína cinasa	[16]
Estriatina neuronal	Se asocia con la fosfatasa 2A	[17]
CAP-19 neuronal	Neuronal, motivo de unión a calmodulina IQ	[18]

Receptor de EGF humano	CaM se une a la yuxtamembrana	[19]
Fosfatasa de la MLCK	Participa en la relajación/contracción muscular	[20]
Conexina 32	Localizado en los conexones	[21]
ChURP	Localizado en el núcleo	[22]
Proteína de unión de alto peso molecular (HHWCaMBP)	Fosfoproteína del músculo cardíaco	[23]
Glicoproteína beta-2	Proteína asociada a la membrana en el riñón	[24]
Proteínas de la retina	Participa en la transmisión sináptica neuronal	[25]
Proteínas extracelulares	Localizadas en fluidos corporales de los animales	[26]
Proteínas de esperma	Espermatocito, la reacción del acrosoma	[27]
Proteínas de levadura	Interviene en la división y crecimiento celular	[28]
Fosfatidilinositol 3-cinasa	Componente de receptor de señalización	[29]

Los blancos moleculares de CaM muestran una variabilidad considerable en secuencia y estructura. Las regiones de unión a CaM dentro de las proteínas diana son generalmente ricas en residuos hidrofóbicos y están rodeados por aminoácidos cargados positivamente [2], los estados activados atraen de forma preferente a ligandos de naturaleza hidrofóbica y/o polares.

La CaM es una proteína, de naturaleza ácida, monitora de Ca^{2+} , compuesta por una cadena única de polipéptidos con 148 aminoácidos altamente conservada en vertebrados [9] tiene un peso molecular de 16,7 kDa, la CaM es una de las proteínas más abundantes, ubicuas y conservadas en la biología eucariótica (cita). En mamíferos, se han identificado tres genes distintos que codifican a la CaM. Entre todos los vertebrados, la secuencia de aminoácidos de CaM es completamente invariante [30]. Presenta una plasticidad estructural importante, capacidad que le confiere su promiscuidad bioquímica. Estas características hacen que la CaM sea una proteína prototipo de estudio en múltiples interacciones.

La Figura 1, muestra la estructura cristalográfica de la CaM, la cual consta de dos lóbulos globulares conectados por una región central flexible, constituida por

26 aminoácidos. Cada lóbulo contiene dos sitios de unión al calcio o dominios funcionales que se designan con los números romanos I-IV. Los dominios I y II constituyen el extremo amino terminal de la proteína y poseen baja afinidad por el calcio (K_d de 3.4×10^{-5} y 3.6×10^{-5} M, respectivamente), mientras que los dominios III y IV forman el extremo carboxilo terminal y presentan una mayor afinidad (K_d de 0.6×10^{-5} y 1.3×10^{-5} M, respectivamente) por el ion Ca^{2+} , en comparación con los otros dos sitios. Cada dominio se encuentra conformado por 12 aminoácidos y son ricos en aminoácidos de ácido aspártico y glutámico principalmente.

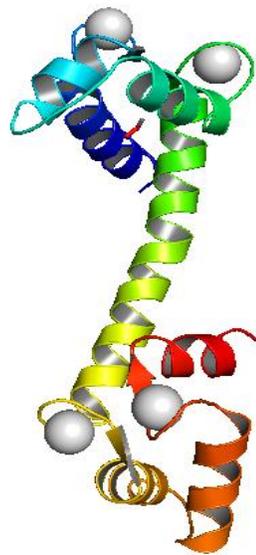
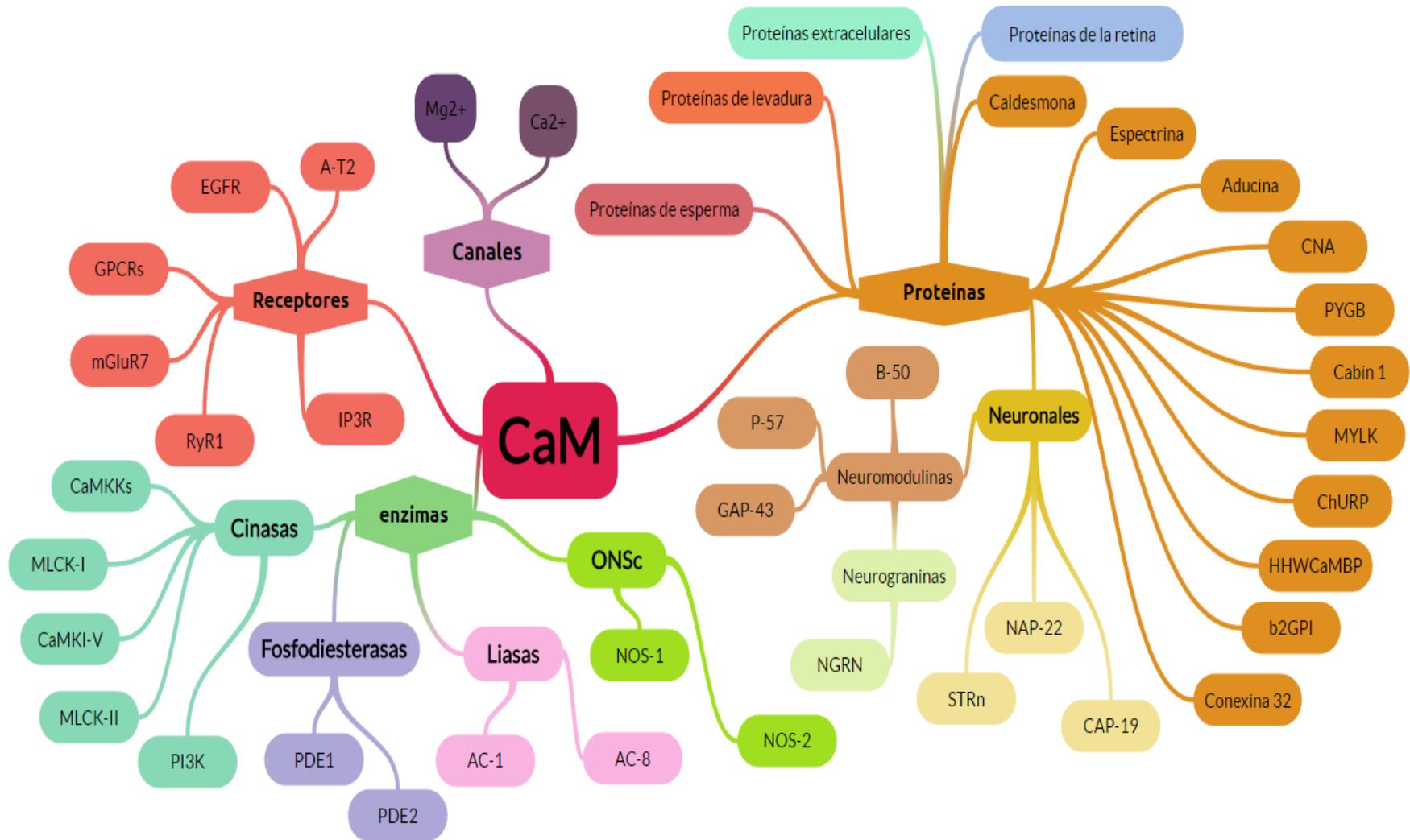


Figura 1. Representación gráfica de la CaM con sus cuatro sitios de Ca^{2+} los cuales se representa con las cuatro esferas en color gris.



Esquema 1. Proteínas, cofactores, canales, enzimas y receptores regulados por CaM. EGFR⁶= Receptor del factor de crecimiento epidérmico, A-T₂⁶= Receptor de angiotensina II, GPCR_s⁹= Receptores acoplados a proteína G, mGluR7⁷=Receptor metabotrópico de glutamato 7, RyR-1⁷=Receptor de rianodina 1, IP3R⁷= Receptor de rianodina e inositol 1,4,5 trifosfato, CaMKKs⁶=Quinasas dependientes de Calmodulina, MLCKI⁶= Cinasas de cadena ligera de la miosina, CaMKI-V⁶=Quinasas dependientes de CaM, MLCKII⁶= Cinasas de cadena ligera de la miosina II, PI3K³⁰= Fosfoinositol 3 Cinasas, PDE-1 y 2⁹= Fosfodiesterasas 1 y 2, AC-1 y 8¹¹= Adenilato ciclasa 1 y 8, NOS-1 y 3⁸= Óxido nítrico sintasa 1 y 2, B-50¹⁵=Neuromodulina de la Membrana en Cono de Crecimiento del Nervio, GAP-43¹⁵= Proteína específica del Tejido Nervioso, P-57¹⁵= Proteína de unión a la calmodulina, NGRN⁶= Regulador transcripcional de timocitos, STRn¹⁸=Estriatina neuronal, NAP-22¹⁷= Sustrato neuronal de la proteína cinasa, CAP-19¹⁹= Péptido neuronal de unión a calmodulina, Conexina 32²²=Proteína de enlace GAP, b2GPI²⁵=Glicoproteína beta 2 asociada a la membrana de riñón, HHWCaMBP²⁴= Proteína de unión de alto peso molecular, ChURP²³= Proteína de unión a calmodulina nuclear, MYLK⁶=Miosina del músculo liso de la cadena ligera, Cabin 1¹⁶=Regulador transcripcional de timocitos, PYGB⁶=Glicógeno fosforilasa, CNA¹⁰= Proteína fosfatasa calcineurina, Aducina¹⁴= Proteína propia del citoesqueleto de la membrana plasmática, Espectrina⁴= Proteína en el citoesqueleto cortical de los eritrocitos, Caldesmona¹³=Proteínas fijadoras de actina, Proteínas de esperma²⁸, Proteínas de levadura²⁹, Proteínas

Papel del ion Ca^{2+} en la actividad de la proteína CaM

Esta proteína es el miembro más estudiado de un grupo de proteínas que son utilizadas por las células eucariotas en los procesos de transducción de señales intracelulares mediadas por el ion calcio. La CaM carece de actividad propia sin embargo, regula la actividad de muchas biomoléculas como se muestra en el Esquema 1 [4, 31, 32]. El calcio (como Ca^{2+}) es reconocido como un mensajero esencial y responsable de la regulación de un amplio intervalo de procesos celulares. Sin embargo, el calcio en altas concentraciones es citotóxico para la célula, por ello los niveles de calcio intracelular son mantenidos entre 20-100 nM, muy por debajo de las concentraciones extracelulares ($> 100 \text{ mM}$) [31]. Esta concentración de Ca^{2+} intracelular regula la CaM en tres maneras distintas: 1) a nivel celular, dirigiendo su distribución subcelular; 2) a nivel molecular, promoviendo diferentes modos de asociación con muchos blancos moleculares y 3) dirigiendo una variedad de estados conformacionales en la CaM que resultan en la activación específica de algunos blancos moleculares [4].

Estudios estructurales recientes han revelado, que existen diversos modos de unión accesibles a CaM permitiendo que esta proteína interactúe con sus blancos moleculares; en un estado de Ca^{2+} saturado (4 iones Ca^{2+} unidos a la CaM), en un estado parcialmente saturado Ca^{2+} (2 iones Ca^{2+} unidos a CaM), y en un estado libre de Ca^{2+} (Figura 2) [33] [34]. En la forma saturada de Ca^{2+} , la CaM presenta un cambio conformacional exponiendo sus dos dominios globulares, englobando un área de superficie hidrófoba sustancial y propiciando interacciones favorables de enlace de hidrógeno con sus blancos moleculares. Datos en la literatura indican que la CaM saturada de Ca^{2+} se une a sus blancos moleculares con alta afinidad, mostrando valores de K_d en un intervalo de 1×10^{-10} a $1 \times 10^{-9} \text{ M}$. Esta afinidad se reduce al menos 1000 veces en el estado libre de Ca^{2+} (apo-CaM), lo que permite la rápida disociación del complejo de CaM con sus blancos moleculares, cuando la cantidad del ión Ca^{2+} se agota [2].

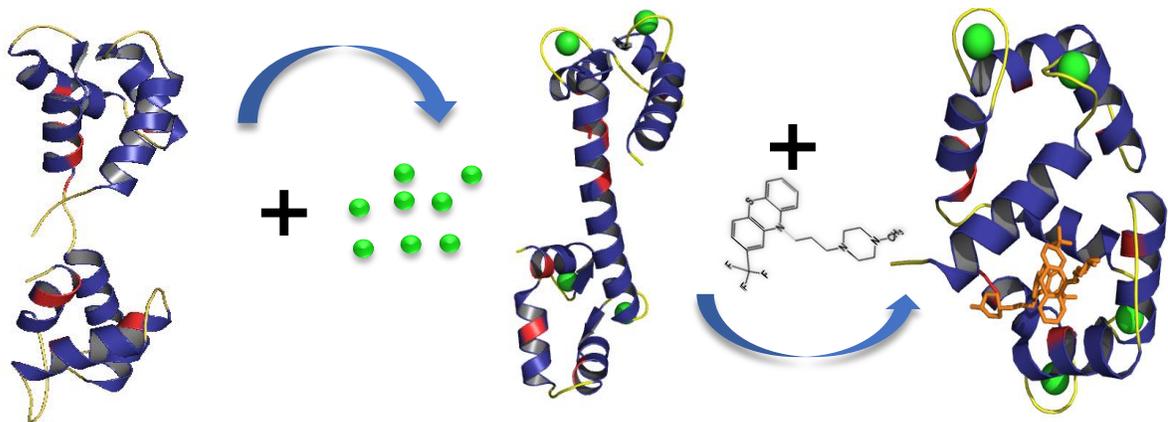


Figura 2. Modelos estructurales de la CaM en sus diferentes conformaciones. La estructura de la cadena principal de CaM, a la izquierda libre de Ca^{2+} y ligando (apo-CaM, 1CFD.pdb), en el centro unida a cuatro iones de calcio (Ca^{2+} -CaM; 1CLL.pdb) y a la derecha unida al inhibidor trifluoroperazina TFP (4Ca^{2+} -CaM-TFP).

La CaM, también es considerada una proteína promiscua, esto se debe a que interactúa con un gran número de ligandos. Estas proteínas promiscuas desempeñan un papel clave en las vías de señalización celular cuya disrupción puede conducir a enfermedades como el cáncer (cita). Las secuencias de aminoácidos de tales proteínas deben haber evolucionado para ser óptimas que permiten las interacciones combinadas con diversos blancos moleculares. Las proteínas promiscuas contienen ciertos dominios estructurales que son necesarias para interactuar con todos sus ligandos [2].

Existen dos clases de relaciones dentro de la interfaz de CaM; 1) las interacciones intramoleculares, las cuales son críticas para la afinidad y 2) las interacciones intermoleculares que determinan la especificidad con los diversos blancos moleculares.

En el perfil evolutivo de CaM, las secuencias de los aminoácidos se encuentran en regiones conservadas, y pueden clasificarse por aquellas que regulan la afinidad a través de residuos hidrofóbicos ricos en Met, Leu o Phe. Las posiciones encargadas de la especificidad, a través de aminoácidos hidrofílicos (Glu y Gln) y, en menor proporción, están ocupadas por Leu.

Las posiciones responsables de la afinidad y la especificidad están presentes tanto en los dominios N- y C-terminales de CaM y también están distribuidas uniformemente a lo largo de la estructura de la misma. Los residuos de Met, los cuales son abundantes en la interfaz de unión de CaM, son propuestos a menudo para ser claves para su capacidad de interactuar con múltiples blancos moleculares. El aminoácido Met posee una cadena lateral larga y flexible que puede, en principio, ajustar la interacción con cualquier blanco molecular [2]

La CaM pertenece a una familia de proteínas que se distingue por un motivo estructural conocido como "la mano E-F". La mano E-F consiste en una hélice N-terminal (la E-hélice) seguida inmediatamente por una localización central, lazo de coordinación de Ca^{2+} y una hélice C-terminal (la hélice-F). La Figura 3, muestra la disposición tridimensional de estos dominios, es una reminiscencia del pulgar, el índice y los dedos medios de una mano, de ahí el nombre "mano E-F". Las proteínas monitoras de Ca^{2+} , son aquellas proteínas que sufren un cambio conformacional inducido por la cantidad de Ca^{2+} . Los ejemplos más destacados de los sensores incluyen la troponina C, proteína encargada de la regulación de la contracción del músculo estriado, la proteína transductora CaM, la familia de proteínas S100 y, más recientemente, las proteínas neuronales miristoiladas [4].

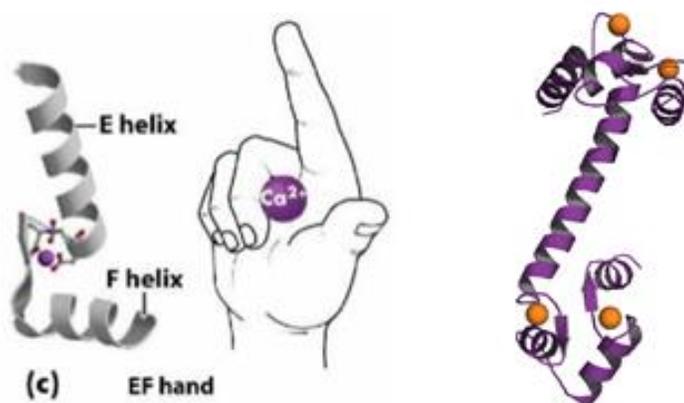


Figura 3. Disposición tridimensional de la "mano E-F" en la CaM. Las dos primeras manos E-F se combinan para formar un dominio N-terminal globular que está separado por una hélice flexible. Los sensores Ca^{2+} en la proteína deben ser capaces de detectar y responder a un intervalo biológicamente relevante de concentraciones intracelulares de Ca^{2+} libre.

Los dos dominios de la CaM adoptan diferentes conformaciones en ausencia o presencia de Ca^{2+} lo que desencadena la actividad monitora de Ca^{2+} . Al cambiar la forma de los dominios de CaM desencadena su capacidad para modular proteínas, remodelar sitios activos y dimerizar proteínas [30]. En ausencia de Ca^{2+} , el dominio N-terminal de la apo-CaM adopta una conformación 'cerrada' (apo-CaM) en la que las hélices en ambas manos E-F están juntas. Por el contrario, aún en ausencia de Ca^{2+} , el dominio C-terminal de apo-CaM adopta una conformación "semiabierta" en la que un parche hidrofóbico queda parcialmente expuesto, en una hendidura rica en Met de cada dominio que se envuelven alrededor de regiones anfipáticas de proteínas diana y, por tanto, accesible al disolvente, en muchos casos, ambos dominios se envuelven alrededor del blanco molecular, compactando la estructura en una forma globular [35] [4]. Esto podría permitir que el dominio C-terminal de la CaM interactúe con algunas proteínas diana en los niveles de reposo de Ca^{2+} libre intracelular.

La afinidad de CaM por Ca^{2+} es relativamente alta lo cual cae dentro del intervalo de concentraciones intracelulares de Ca^{2+} presentado por la mayoría de las células (10^{-7} M a 10^{-6} M). Sin embargo, tiene una limitación adicional, las manos EF de CaM tienen afinidades distintas para el Ca^{2+} , ya que el par C-terminal del dominio E-F tiene una afinidad de tres a cinco veces mayor para Ca^{2+} respecto al par N-terminal. Muchas proteínas de unión a Ca^{2+} con afinidad elevada ($K_d < 10^{-7}$ M) actúan como moduladores ya que secuestran el exceso de Ca^{2+} libre, por otro lado, existen proteínas de unión a Ca^{2+} las cuales tienen afinidad baja ($K_d > 10^{-5}$ M), por lo que no pueden actuar como sensores ya que son incapaces de detectar la gama de cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} libre que normalmente ocurren en las células [4].

Es esta capacidad para convertir el evento de unión a Ca^{2+} en energía bioquímica es lo que caracteriza a las proteínas monitoras de Ca^{2+} y es la base de su capacidad para traducir señales de Ca^{2+} . La energía bioquímica se traduce en dos efectos separables: un cambio en la afinidad de CaM para el efector y una alteración en la función del mismo [4]. La concentración y localización de CaM parecen jugar un papel importante en la regulación de su actividad biológica. La CaM constituye al

menos el 0.1% de las proteínas totales presente en las células (10^{-6} M – 10^{-5} M) y se expresa incluso a niveles más altos en células de crecimiento rápido, especialmente aquellas sometidas a división y diferenciación celular [4].

Se ha encontrado que en la CaM existe una zona hidrofóbica homóloga, la cual se ha conservado evolutivamente en algunas quinasas. Estudios espectroscópicos y cristalográficos de complejos 4Ca^{2+} -CaM-péptidos, muestran en cada caso que el residuo Met124 interactúa exclusivamente con la parte hidrófoba de diferentes proteínas dependientes de CaM y esto es lo que confiere energía de unión a estas. De hecho, esto lo demuestra a su vez los experimentos de mutagénesis complementarios sobre los residuos de Met de CaM mostraron que en la posición 124 invariable evolutivamente en el dominio C-terminal de CaM es el que entra en contacto con los residuos hidrofóbicos conservados en varios péptidos y ligandos de la CaM necesarios para la alta afinidad de unión y activación de CaM quinasa I, así como para otras tres quinasas dependiente como lo muestra la figura 4 [4].

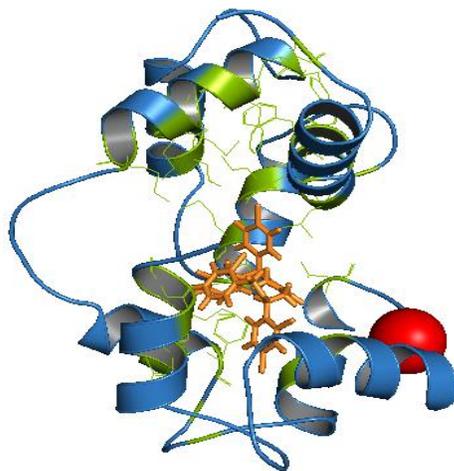


Figura 4. Representación gráfica de los aminoácidos reactivos en CaM. En color verde se muestran los aminoácidos relacionados con la unión de ligandos y blancos moleculares, la esfera roja representa la Met124 del biosensor utilizado en este trabajo.

Calmodulina como blanco molecular de fármacos

La proteína CaM es un blanco molecular de varios fármacos debido a que desempeña un papel importante en la regulación de muchos procesos fisiológicos tales como: regulación genética, síntesis de proteínas, contracción del músculo liso,

transporte axonal, crecimiento celular, procesos de secreción, función de canales iónicos, motilidad celular y quimiotaxis, entre los más importantes. La CaM también desempeña un papel importante como regulador de procesos bioquímicos fundamentales y por tanto puede ser un blanco molecular para propiciar una respuesta farmacológica. En el ámbito fisiopatológico se encuentra relacionada indirectamente con enfermedades de tipo neurodegenerativas como el Alzheimer, trastornos mentales del comportamiento como la esquizofrenia, cáncer, susceptibilidad viral y baja respuesta inmunológica.

Fármacos anti-CaM

La actividad reguladora de la CaM se inhibe en presencia de ciertos fármacos y numerosos metabolitos secundarios. Por lo tanto, la identificación de fármacos que alteran la actividad de CaM puede, proporcionar un nuevo enfoque para el tratamiento de procesos fisiológicos o patológicos. Por consiguiente, los agentes que inhiben la actividad de CaM deben tener efectos farmacológicos profundos. En los últimos años, se han identificado varios compuestos que inhiben a CaM, entre los que se encuentran fármacos antipsicóticos, relajantes de músculo liso, agentes bloqueadores α -adrenérgicos, neuropéptidos, antipalúdicos, antiespasmódicos, antitumorales, antidepresivos, anestésicos locales, antihistamínicos y anticolinérgicos.

Los estudios de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de una variedad de inhibidores de CaM han demostrado que hay interacciones iónicas e hidrofóbicas entre los ligantes y la CaM. De los estudios realizados hasta ahora, se ha concluido que para que un compuesto inhiba a la CaM, debe llevar una carga positiva a pH fisiológico, facilitando la interacción con cargas negativas presentes en las regiones hidrofílicas de la CaM siendo de carácter ácido, y tener grupos hidrófobos, para interactuar con las regiones lipófilas en la CaM. Pero estos dos factores no son los únicos que están implicados en la inhibición de la CaM, ya que muchas moléculas altamente cargados y altamente hidrofóbicos tienen relativamente poco efecto sobre la actividad en CaM. Las relaciones estructurales entre estas regiones iónicas e hidrófobas y otros factores como la estructura del fármaco (principalmente anillos resonantes, estructuras grandes e hidrofóbicas y halógenos presentes), fuerzas

iónicas, interacciones electrostáticas, hasta ahora identificados, también son factores importantes y necesarios para la unión efectiva de CaM-fármaco y no sólo es necesaria una característica aislada para la correcta interacción, incluso pueden dominar unas características más que otras, pero eso depende de la naturaleza del fármaco. [36].

En los últimos años, se han identificado varios fármacos que inhiben a la CaM, los estudios sobre la dependencia del pH de la unión de la trifluoroperazina (**TFP**) a la CaM sugieren que las fuerzas iónicas juegan un papel importante en esta interacción. Estudios de unión reportados previamente entre la **TFP** y la CaM muestran un aumento notablemente en la afinidad al evaluar está apH por encima de 4.0, alcanzando un valor máximo de pH 5.0 y permaneció constante hasta pH 8.0. Por encima de pH 8.0, la unión disminuyó notablemente. Dado que el punto isoeléctrico de CaM es de aproximadamente 4 y el pKa de la TFP es 8.1, estos resultados sugieren que existe una interacción electrostática entre la CaM cargada negativamente y la Fenotiazina cargada positivamente [36].

Estudios recientes sobre los efectos de los neuropéptidos (figura 5), β -endorfina, hormona adrenocorticotrófica y dinorfina sobre la CaM también muestran que los inhibidores más potentes de CaM son los que se encuentran con carga negativa a pH fisiológico. Sin embargo, varios péptidos como la neurotensina, la sustancia P y la hormona estimulante del melanocito alfa están presentan carga negativa, con potencia menor inhibiendo ala CaM, lo que indica que otras características estructurales también contribuyen a la unión. Una comparación de los diversos compuestos conocidos que inhiben a CaM muestra que tienen muchas similitudes estructurales, lo que sugiere que la estructura geométrica de una molécula bioactivaes importante para determinar su interacción con la CaM. En muchos casos, ligeras modificaciones en la estructura química pueden alterar en gran medida la capacidad de un compuesto para unirse a la CaM e inhibir su actividad. Tal especificidad estructural es sugestiva de interacciones específicas de fármaco-receptor y no de unión hidrófoba simple.

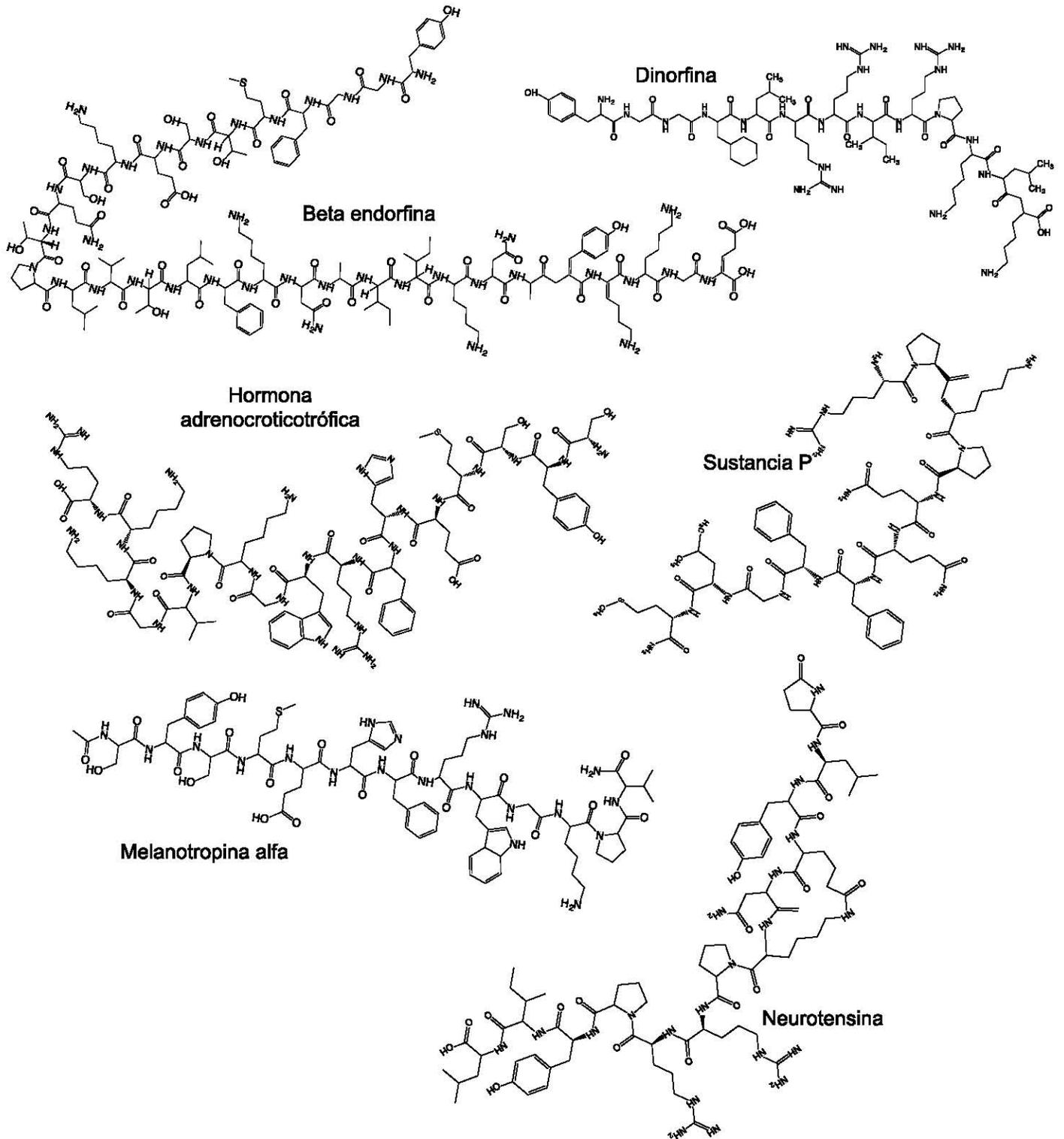


Figura 5. Estructuras de los neuropéptidos β -endorfina, dinorfina y hormona adrenocorticotrófica, las cuales sí tienen actividad por CaM, a diferencia de la sustancia P, la melanotropina alfa y la neurotensina

Interacciones de CaM con fármacos

La Inhibición de la actividad de CaM por inhibidores clásicos como la flufenazina, trifluoroperazina y clorpromazina, muestran mayor afinidad en la forma saturada de calcio (4Ca^{2+} -CaM). Se ha propuesto que la clorpromazina, un potente antipsicótico, actúa inhibiendo las interacciones de Ca^{2+} -CaM a través de las fosfodiesterasas inhibiendo la afluencia de Ca^{2+} en concentraciones más bajas que las requeridas para inhibir la maquinaria contráctil, como en la contracción inducida por Ca^{2+} en los músculos de la piel [37].

Se ha propuesto que los derivados fenotiazínicos se unen a la CaM de manera dependiente de la cantidad de Ca^{2+} . Existen hasta 4 sitios de unión de manera dependientes del ión Ca^{2+} al fármaco por cada molécula de CaM, como lo muestra la Figura 6, con constantes de disociación en un intervalo de 1 a 10 μM . Los antipsicóticos fenotiazínicos no sólo inhiben la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de CaM, sino que también inhiben una amplia variedad de procesos y eventos dependientes de CaM: transporte de agua mediada por la hormona antidiurética (ADH), respuestas α -adrenérgicas, captación de calcio, función catecolaminérgica, secreción de cloro en el intestino, síntesis de ADN, endocitosis, exocitosis, liberación de insulina y neurotransmisores, función leucocitaria y plaquetaria, transmisión neuromuscular y metilación de fosfolípidos [36].

Otros fármacos que interaccionan con la CaM son los antimicóticos derivados del miconazol; los cuales afectan la actividad de las enzimas dependientes de CaM con una potencia mayor que las fenotiazinas [38] [39] [32]. Por otro lado; la melitina, un péptido presente en el veneno de abejas se une al extremo amino terminal de los dominios I y II, y al extremo carboxilo terminal de los dominios III y IV de la proteína e inhibe sus propiedades reguladoras [39]. La citreoviridina, el ácido secalónico y la verruculogena, neurotoxinas fúngicas del género *Penicillium*, inducen cambios conformacionales en la proteína que provocan la exposición de sus regiones hidrofóbicas alterando así la regulación de las enzimas moduladas por la CaM provocando efectos neurotóxicos en el sistema nervioso central (SNC) [40]. Finalmente, los metabolitos como flavonoides [41], isoflavonoides [42], lignanos [43]; [44], fenilpropanoides [41], sesquiterpenoides [45] cumarinas [46] y varios metabolitos

fúngicos [47] [48, 49] inhiben la enzima fosfodiesterasa (PDE) dependiente de CaM sin afectar las PDE's no sensible a CaM.

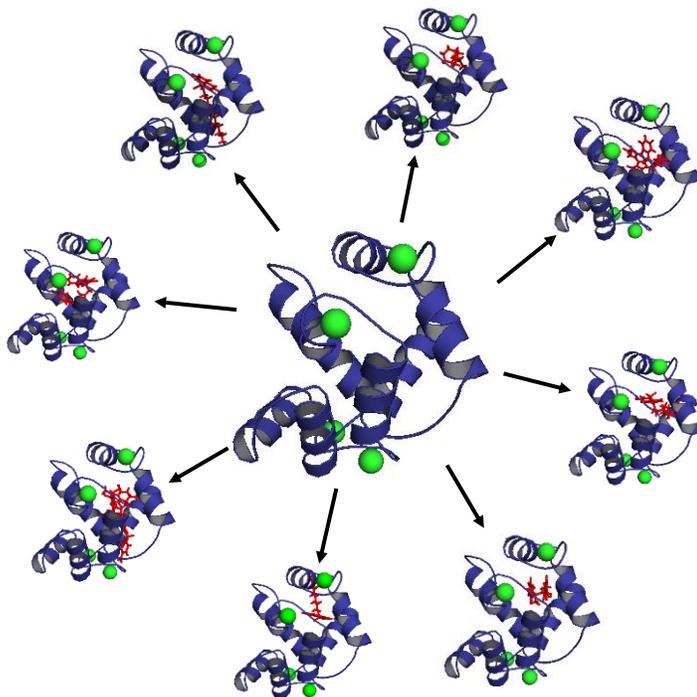


Figura 6. Interacciones de CaM con ligandos. En el centro se muestra la proteína CaM en el modo saturado de Ca^{2+} , las figuras que señalan las flechas son las interacciones de CaM con los fármacos utilizados en el presente trabajo.

Equilibrio químico aplicado a la interacción proteína-ligando

La constante de disociación o unión (K_d)

Las proteínas son polímeros de aminoácidos (presentan secuencias específicas) que adquieren una estructura tridimensional específica para llevar a cabo sus funciones. Esta estructura se le denomina estructura nativa. Para la estabilidad de esta estructura, se requieren fuerzas covalentes que unen a los aminoácidos a través de sus enlaces peptídicos y forman el esqueleto hidrocarbonado. Además se requiere de una serie de interacciones no covalentes, que van desde solvatación, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entre otras para la adquisición de la llamada estructura nativa [50].

Estas son las mismas fuerzas que permitirán las interacciones específicas para estabilizar o modular las interacciones proteína-ligando. Para cuantificar la fuerza de

interacción entre las proteínas y sus ligandos a través de la constante de unión o de disociación. Esta constante nos habla de la fuerza de unión entre una biomolécula y su ligando, la forma libre de la proteína y sus ligandos al equilibrio. La determinación de la constante de unión requiere de condiciones de equilibrio termodinámico. Además, se requiere de condiciones de reversibilidad del proceso, la proteína y el ligando no deberán presentar ninguna alteración que modifique a la proteína o la mantenga fuera de la solución, solo existirán las formas libres y en complejo.

La constante de disociación esta definida en términos de concentración entre la proteína libre (P), el ligando libre y el complejo proteína-ligando (PL) a partir de la siguiente reacción:



Esta constante se relaciona con la fuerza de la interacción, en este caso mientras el valor de K_d sea menor la afinidad será mayor, puesto que será menor la concentración de ligando necesaria para saturar la proteína y mayor es la afinidad de la proteína hacia el ligando.

Relación entre K_d y la variación de energía libre en la unión.

La energía libre asociada a esta interacción se denomina energía libre de Gibbs, que se calcula a partir de la K_d , de acuerdo con la siguiente relación:

$$\Delta G = -RT \ln K_d$$

En donde, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura. Cuanto menor sea la K_d más exergónica será la formación del complejo proteína-ligando, y por tanto se favorece la asociación del complejo. La energía de interacción también se puede dividir en componentes de entalpía y entropía de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La contribución de la entalpía (ΔH) no sólo corresponde a las interacciones directas entre el ligando y la proteína, sino también a las interacciones externas que estabilizan al complejo (interacciones electrostáticas, puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, entre otras). La contribución de la entropía (ΔS), proviene de los cambios de los grados de libertad tanto del ligando como de la proteína; por ejemplo, la solvatación o desolvatación de moléculas de agua durante la interacción, o bien cambios en la flexibilidad local o global del complejo proteína-ligando en el disolvente. Dicho de otra manera, los componentes entrópicos se dan por los cambios en la dinámica intrínseca de la proteína durante la interacción. Esta información ha sido difícil de medir. Sin embargo, gracias a los estudios teóricos de dinámica molecular (DM) o experimentales de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), hoy en día se estudia con más claridad el papel de las interacciones entrópicas de los complejos proteína-ligando [50].

Métodos utilizados para el estudio de las interacciones biomoléculas con sus ligandos (CaM-Ligandos).

A pesar de la numerosa información estructural y funcional de las proteínas provenientes de estudios bioquímicos y biofísicos aún resulta muy difícil predecir la especificidad o la afinidad de las proteínas a sus ligandos a partir de información estructural exclusivamente, el problema radica en que se analiza a las proteínas desde una perspectiva estática ya que en muchas ocasiones se desconocen los eventos que llevaron a el estado final de la unión de la proteína con su ligando. Sin embargo, la conjunción de diferentes disciplinas, tanto experimentales como teóricas, han permitido grandes avances para comprender las bases moleculares de las interacciones entre las proteínas y sus ligandos lo que tiene implicaciones directas tanto en el diseño de nuevos fármacos como en el descubrimiento de nuevos blancos farmacológicos.

Métodos teóricos

Acoplamiento molecular (Docking). Se basa en el acoplamiento y reconocimiento molecular, generando mapas electrostáticos para cada tipo de átomos que participan, mediante los cuales se define la unión de un ligando en una macromolécula. El programa AutoDock4 utiliza una combinación de algoritmos (Lamarckiano y genético), realiza el análisis probabilístico de unión entre las diferentes conformaciones del ligando y el sitio de unión de la proteína, de esta manera nos proporciona las posiciones/sitios en los cuales la interacción con menor energía se ve favorecida. Para desarrollar la tarea de acomodar “posing” un ligando en una cavidad de la proteína blanco, se han desarrollado esquemas numéricos de puntaje para cada orientación basándose en ecuaciones matemáticas de la física clásica, las cuales determinan la energía no covalente de la unión blanco-ligando como función de las distancias atómicas entre moléculas utilizando la ecuación de Coulomb para calcular la energía electrostática entre dos átomos cargados y la ecuación de Van der Waals para calcular las fuerzas de repulsión o atracción entre moléculas o regiones de la misma molécula, la búsqueda examina los mínimos conformacionales basados en la energía de torsión, translación e interacción de los ligandos dentro de estos campos [51].

La Figura 7 esquematiza la evaluación de la asociación entre el ligando y la proteína blanco, esto se hace a través de un muestreo del espacio conformacional disponible para un ligando en una proteína, esto se predice combinando campos de fuerza empíricos de energía de enlace basado en un modelo termodinámico donde la energía libre prevista de unión de las conformaciones a probar con el algoritmo genético-Lamarckiano antes mencionado. En este método, la proteína se incrusta en una cuadrícula (mapa espacial). A continuación, se coloca un átomo de sonda de forma secuencial en cada punto de la rejilla, se calcula la energía de interacción entre la sonda y el objetivo, almacenando el valor en la rejilla. Los resultados obtenidos al finalizar los cálculos son dos archivos, un archivo contiene las coordenadas cartesianas de cada átomo del ligando en la mejor orientación dentro de la cavidad del blanco y el otro archivo incluye los nombres o códigos de cada uno de los ligandos, ordenados de acuerdo con el puntaje obtenido para su orientación óptima [52].

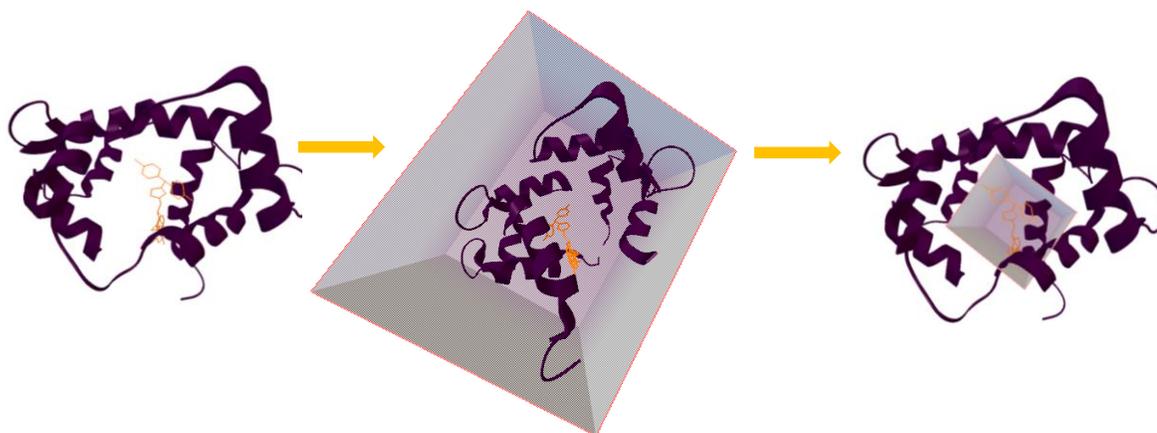


Figura 7. Representación esquemática del acoplamiento molecular realizado con el programa AutoDock4.

Los métodos computacionales para realizar el acoplamiento molecular presentan una serie de ventajas tales como: requerimientos computacionales comunes, tiempos de análisis cortos, nos permite estimar parámetros termodinámicos de unión teóricos y predecir el sitio de unión de ligandos en una proteína diana. Sin embargo, estos métodos no son 100 % confiables ya que los parámetros teóricos obtenidos sólo son aproximaciones, por lo que esta información computacional actualmente es confrontada y enriquecida por métodos experimentales. Un objetivo de la química computacional es predecir la vinculación entre moléculas, particularmente para la industria farmacéutica resulta de suma importancia al tener una aplicación directa en el descubrimiento y desarrollo de fármacos [51].

Dinámica molecular. Los primeros estudios de dinámica molecular (DM) fueron introducidos por Alder y Wainwright a finales de los años 50's [53]. Con el paso de los años se han perfeccionado los métodos para ser cada vez más precisos y exactos con sistemas complejos tales como biomoléculas solvatadas, complejos proteína-ligandos y sistemas lipídicos con el fin de calcular parámetros termodinámicos de uniones de ligandos y plegamiento de proteínas pequeñas principalmente. Esta técnica permite el estudio de sistemas biológicos y químicos a nivel atómico en escalas de tiempo desde fs a ms considerando posiciones, ángulos, torsiones, orientaciones, velocidades de los átomos, distancias, solvente, etc. Lo cual permite que todos los átomos de un sistema vibren y se trasladen en intervalos de tiempo aproximando las energías de los sistemas moleculares. La DM es considerada

un campo multidisciplinarios, sus leyes y teorías mezclan las matemáticas, física, química y las ciencias computacionales. Actualmente el número de protocolos y programas para hacer simulación de DM ha incrementado, algunos de los programas más utilizados son CHARMM, AMBER, NAMD y GROMACS, los cuales tiene sus propios campos de fuerzas para cada tipo de molécula que se requiera estudiar. Por ejemplo, el paquete de AMBER los tiene para carbohidratos (Glycam), fosfolípidos (Lipid11), ácidos nucleicos y moléculas orgánicas (Gaff) [54].

La DM utiliza las ecuaciones de mecánica clásica provenientes de los principios planteados en las ecuaciones de movimiento de Newton. Para ello se realiza una evaluación de la energía total del sistema, a través de las ecuaciones que describen la energía de las interacciones covalentes (energía de los enlaces, sus ángulos y torsiones), además de las interacciones no covalentes, es decir fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrogeno, etc. Con ello se obtiene una trayectoria de los átomos en movimiento. A través de esta técnica, es posible simular la interacción entre un ligando y una proteína en solución considerando la fuerza iónica y la temperatura del sistema (Figura 8).

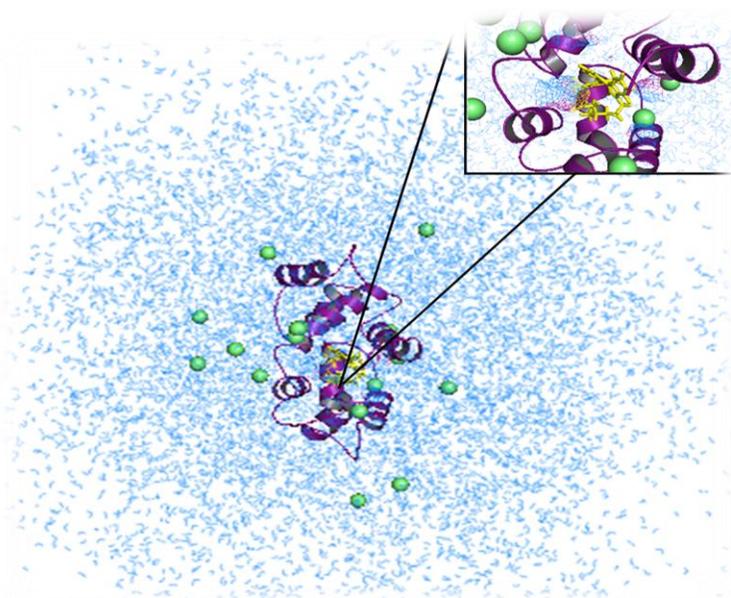


Figura 8. Representación de una dinámica molecular (DM) del complejo CaM-TFP. El procedimiento general tiene los siguientes pasos: 1) Adición de iones hidrógenos a los aminoácidos, 2) Neutralización del sistema con contra iones (en este caso con iones Na^+), 3) Solvatación del complejo en una caja octahedra de moléculas de agua, 4) Minimización del sistema, 5) Calentamiento desde 0 a 298.15 K, 6) Estabilización del volumen a una presión de 1 atm, 7) Equilibrio del sistema y 8) producción de la DM.

La finalidad de esta técnica se centra en proveer información detallada de las interacciones a nivel molecular de las biomoléculas que son simuladas, proporcionándonos parámetros estructurales y termodinámicos de las interacciones tales como fluctuaciones entre átomos, desviaciones cuadráticas en función del tiempo, ΔH , ΔS y ΔG , con diferentes condiciones de presión y temperatura lo que permite entender más acerca de las bases moleculares de la interacción proteína-ligando. Actualmente sus principales aplicaciones se derivan en la parte estructural y termodinámica de macromoléculas biológicas y sus complejos [55], así como el refinamiento de estructuras obtenidas por cristalografía de Rayos X y RMN.

Métodos experimentales

Existen otros métodos utilizados para contribuir en el descubrimiento y desarrollo de nuevos inhibidores de la CaM, tanto experimentales como teóricos. Entre los experimentales podemos mencionar que la mayoría de ellos son *in vitro*: a) cromatografía de afinidad, el cual es un método específico. Sin embargo, es de alto costo, laborioso y no es posible determinar parámetros termodinámicos; b) electroforesis nativa en gel, efectiva para detectar eventos de unión, es cualitativa pero poco robusta y es afectada por la forma de la proteína; c) Resonancia magnética nuclear, provee información detallada sobre las interacciones proteína-ligando en solución, se marca la proteína con ^{15}N y ^{13}C y se titula con los ligandos de interés, es un método de costo elevado y los análisis son laboriosos; d) Espectroscopia ultravioleta-dicroísmo circular, es un método sensible para monitorear cambios conformacionales de la proteína inducida por la unión de ligandos, tiene como una desventaja que se necesita una mayor cantidad de proteína (alrededor de miligramos) y se requiere de gasto computacional para realizar las predicciones, de la conformación más estable de la proteína; [56] e) Fluorescencia intrínseca, requiere relativamente menor cantidad de muestra en comparación con la técnica anterior, la respuesta es sensible dependiente de los cambios estructurales locales promovidos por la unión de los ligandos; f) Transferencia de energía resonante por fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés), monitorea tanto las interacciones de unión entre diferentes moléculas (proteína-proteína) entre dos estados de excitación electrónica

de dos fluoróforos acoplados (par conjugado), como los cambios conformacionales en una misma biomolécula; g) Difracción de rayos X, con esta técnica se pueden observar detalles de aproximación atómica de los complejos formados entre la proteína y su ligando, ofreciendo una visión detallada de su arreglo espacial, sus interacciones y nos provee una estructura tridimensional [57]; la metodología es laboriosa y se requiere de equipo especializado; h) Calorimetría de titulación isotérmica (ITC), es posible determinar parámetros termodinámicos y de unión (K_d). Los cuales se pueden transformar a parámetros cinéticos, es un método directo; sin embargo, se requiere una gran cantidad de proteína (mg) y únicamente se pueden cuantificar ligandos solubles en ciertos amortiguadores; i) Métodos enzimáticos, determina la actividad de forma indirecta de la CaM, las metodologías son complejas y requieren de una mayor inversión de tiempo y costo, adicionalmente se pueden encontrar resultados falsos positivos. j) Finalmente, los biosensores fluorescentes de CaM, los cuales son dispositivos biotecnológicos que ofrecen diversas ventajas tales como; respuestas directas, sensibles, unión de diferentes ligandos con respuestas diferentes en el mismo dispositivo, cantidad mínima de muestras (del orden de nM a mM).

Biosensores: El desarrollo de biosensores comenzó con la creación del primer electrodo biosensorial de glucosa en 1962 por Clark y Lyons [58] [59]. Este biosensor de glucosa consistía en un electrodo de oxígeno recubierto con la enzima glucosa oxidasa (GOx), el cual permitía la medición de glucosa en sangre mediante el consumo de oxígeno resultante de las reacciones catalizadas por la enzima [60]. Los biosensores son considerados como bioherramientas analíticas, los cuales presentan las ventajas de ser fácil de usar, rápidos, sensibles, precisos, robustos, además presentan un amplio intervalo de concentración operacionales y lineales, límites de detección bajos en comparación con otras técnicas, determinación cuantitativa y cualitativas, tiempos de respuesta en estado estacionario y transitorio, reproducibles, estables, con una vida útil larga; además son capaz de simplificar arduos procesos analíticos y sustituir la instrumentación de costo elevado [61].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), define a un biosensor como un dispositivo integrado, autónomo y capaz de proporcionar

información analítica semicuantitativa o cuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico), el cual se encuentra en contacto directo con un elemento de transducción [61]. Estos dispositivos transforman la información de las interacciones químicas moleculares, en señales físicas analizables por medios de mecanismos bioquímicos, el sistema receptor, generalmente es un componente biológico (proteínas, canales iónicos, ADN, células, etc.) el cual le confiere alta especificidad, este receptor interactúa específicamente con un analito y traduce la señal a un sistema detector capaz de generar una señal cuantificable y analizable, siendo este último de tipo fisicoquímico, eléctrico, mecánico, piezoeléctrico o electroquímico.

Clasificación de los biosensores

La Tabla 2, muestra la clasificación de estos dispositivos en función de: 1) el tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito; 2) el método utilizado para detectar dicha interacción; 3) la naturaleza del elemento de reconocimiento y 4) el sistema de transducción.

Tabla 2. Criterios de clasificación de los biosensores

Tipo de interacción	Detección de la interacción
Biocatalítica	Directa
Bioafinidad	Indirecta
Elemento de reconocimiento	Sistema de transducción
Enzima	Electroquímico
Orgánulo	Óptico
Tejido	Piezoeléctrico
Célula completa	Termométrico
Receptor biológico	Nanomecánico
Anticuerpo	
Ácidos nucleicos	
PIM, PNA, aptámero	
Tomada de [62]	

Por otro lado, la elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido, ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades fisicoquímicas que ocurra como consecuencia de la interacción.

Biosensores fluorescentes

Los biosensores fluorescentes semisintéticos específicamente son dispositivos contruidos con fluoróforos como elemento transductor fluorescentes unido de manera covalente a un elemento de reconocimiento molecular como una proteína de interés, estos biodispositivos convierte la interacción entre la proteína y el analito en un cambio en la señal fluorescente, ya sea en su intensidad o en su λ_{\max} de emisión. Este tipo de dispositivos, han ganado importancia ya que se utilizan como herramientas analíticas de rutina tanto para el desarrollo de nuevos métodos analíticos como para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, además estos biosensores semisintéticos son herramientas analíticas, que tienen varias ventajas con respecto a otros métodos analíticos como su alta sensibilidad, especificidad, tiempo mínimo de análisis y posible automatización. En el caso particular de nuestro grupo de trabajo, se ha construido un biosensor de la proteína CaM humana (*hCaM*) utilizando un fluoróforo (monobromobimano, *mBBr*) para analizar distintos tipos de ligandos, y su interacción con la CaM [63].

Biosensores fluorescentes de la proteína CaM

Actualmente se han descrito en la literatura algunos biosensores fluorescentes relacionados con la CaM, entre ellos destacan el CaM-Dansyl [64], el cual utiliza como elemento fluorescente el Cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo el cual fue durante mucho tiempo el reactivo fluorógeno más utilizado para la determinación de aminoácidos en proteínas y péptidos; el biosensor CaM-GPF el cual utiliza la proteína verde fluorescente fusionada (GPF) a la CaM, el cual tiene un amplio uso como un gen reportero para controlar los patrones de expresión codificados por los promotores de genes y la distribución de la CaM cuando se fusiona con una proteína de interés en levaduras *in vivo* [65]. Finalmente, están los biosensores *hCaM-mBBr* reportados por nuestro equipo de trabajo [63].

Biosensor *hCaM-M124C-mBBr*

El biosensor que se utiliza en este trabajo es denominado *hCaM M124C-mBBr*, el cual fue desarrollado y construido por nuestro grupo de trabajo previamente [63], la estrategia que se siguió fue a través de la unión covalente del fluoróforo *mBBr* a una mutante de *hCaM M124C* con un grupo tiol reactivo.

- I. El sitio modificado químicamente fue diseñado racionalmente con el fin de localizar la posición donde se va a marcar de manera específica a la proteína con el *mBBr* utilizando herramientas computacionales tales como visualizadores moleculares (pymol), información del área accesible a la superficie e información de las regiones de interacción.
- II. Una vez elegida la posición se realiza una mutagénesis sitio dirigida, mediante la cual se reemplazó una Met en la posición 124 por un residuo de Cys.
- III. Finalmente, se hace un marcaje fluorescente específico del sitio mediante el *mBBr* (un fluoróforo reactivo específicamente a los grupos tioles de las cisteínas).

Con un biosensor fluorescente de este tipo, es posible correlacionar los cambios conformacionales asociados a la unión de ligandos utilizando las propiedades de emisión de fluorescencia de este dispositivo biotecnológico [66].

La CaM marcada con el *mBBr* es altamente sensible a la detección de la interacción de los inhibidores dado que presenta un rendimiento cuántico de $\Phi = 0,494$, el cual es aproximadamente 20 veces mayor que el valor para *hCaM* nativa ($\Phi = 0,025$) y un cambio en la intensidad de fluorescencia (80% aproximadamente) cuando la proteína se encuentra a concentraciones saturantes de inhibidores clásicos (**TFP** o **CPZ**), Cabe resaltar que este biosensor mantiene las propiedades estructurales y funcionales de la proteína nativa. Ha sido descrito como altamente sensible y útil en la detección e identificación de la interacción de posibles inhibidores de la proteína CaM, lo innovador de este biosensor es que permite cuantificar afinidades de ligandos a la CaM con diferente número de equivalentes de Ca^{2+} de manera independiente [67].

Fármacos y prototipos de fármacos de la CaM

En este trabajo se estudiaron siete prototipos de fármacos y fármacos que son clasificados como posibles inhibidores de la CaM. Algunos de ellos han sido reportados como tal utilizando ensayos enzimáticos, poseen características estructurales que los hacen candidatos a inhibir a la CaM (estructuras con anillos resonantes, hidrofóbicas pero con ciertas regiones polares, presencia de halógenos, con carga negativa a pH fisiológico). Adicionalmente, algunos de ellos han sido sintetizados por las principales compañías farmacéuticas, dichos compuestos se muestran en la Figura 9 (tu compuesto CAL le falta la configuración, o si es mezcla racémica).

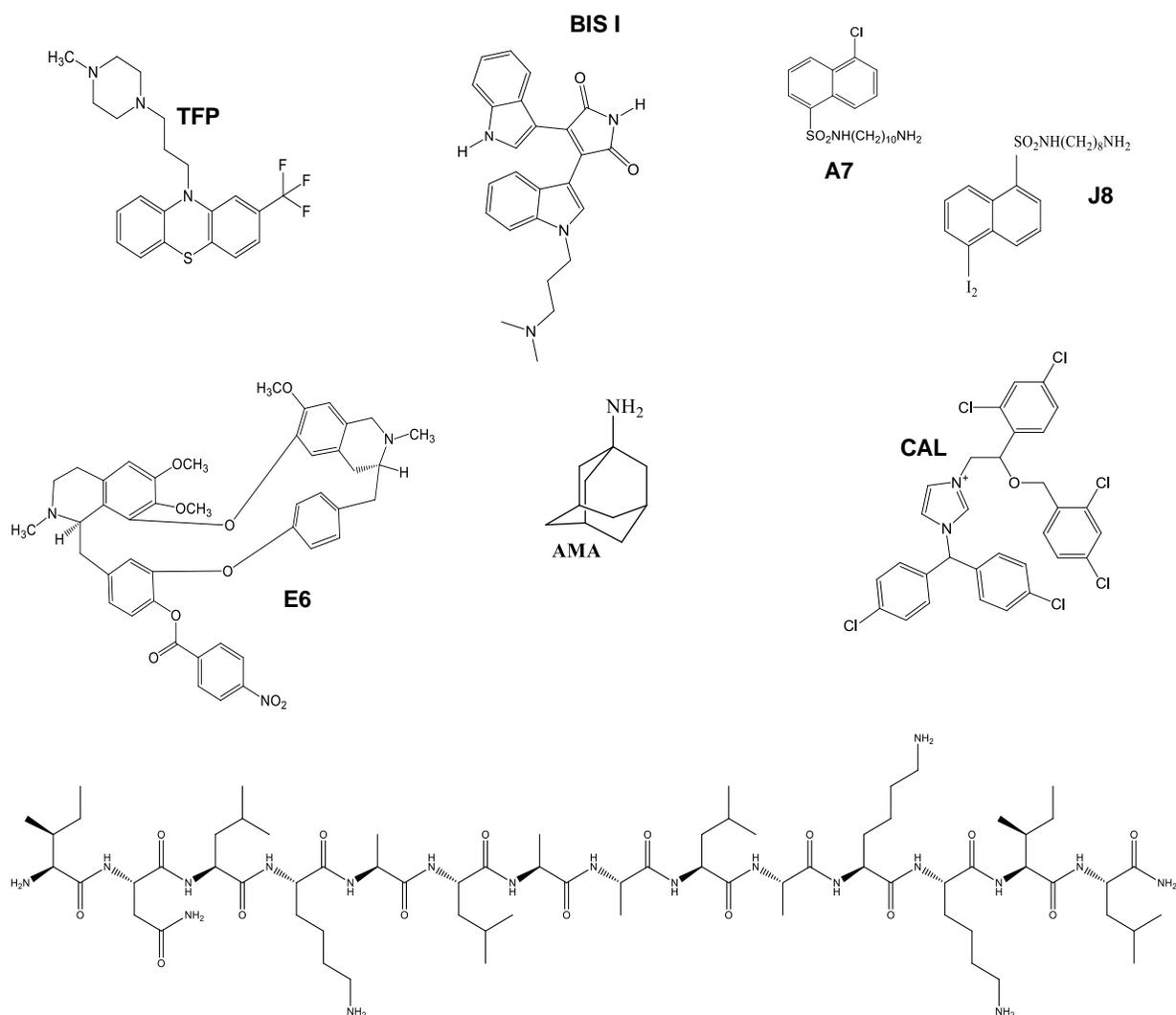


Figura 9. Estructuras de los compuestos inhibidores de la CaM.

El fármaco Trifluoperazina (**TFP**), con los nombre comerciales Eskazine, Stelazine, Estelazina, Triftazina, es considerado dentro del grupo de medicamentos llamado neurolépticos o antipsicóticos, entre sus usos terapéuticos se encuentran: tranquilizante, antipsicótico, ansiolítico y un antiemético potente, este medicamento actúa fundamentalmente en los sistemas dopaminérgicos centrales D2 en una acción de tipo antagonista, también es considerado un fármaco potente contra los síntomas psicóticos. Sin embargo, los efectos secundarios son muy evidentes ya que produce somnolencia, mareos, alteraciones visuales y disminución de la capacidad de reacción debido a que estimula la prolactina lo que agrava el cuadro cerebral. En general los neurolépticos se unen a CaM, inhiben fosforilación de proteínas e impiden activación de enzimas responsables de la síntesis de neurotransmisores [68].

El Bisindolilmaleimida I (**BIS I**) es un prototipo de fármaco derivado de la estaurosporina, la cual es un alcaloide con actividad para el tratamiento del cáncer ya que bloquea ciertas proteínas e impide el crecimiento de células cancerosas. No hay mucha información relacionada a **BIS I**, la única actividad terapéutica publicada hasta el momento es su relación a la inhibición de la GSK-3 β la cual está implicada en la enfermedad de Alzheimer o la diabetes mellitus no dependiente de la insulina, las cuales se consideran enfermedades hiperproliferativa, tal como el cáncer o las displasias. **BIS I** al inhibir a GSK-3 evita la hiperfosforilación de la proteína TAU la cual produce la rotura de microtúbulos de las neuronas y su desestabilización, por lo que la función neuronal se ve gravemente afectada desencadenando las condiciones fisiopatológicas necesarias para el desarrollo del alzheimer [69].

El prototipo A-7 Clorhidrato (**A7**) es considerado un potente isómero del naftalenosulfonamida, es un análogo del **W7** y es presuntamente vinculado a los inhibidores de la CaM, no existe gran información en la literatura relacionada con este compuesto, un posible mecanismo propuesto es la inhibición de la PDE , Hiroo I. y Hiroyoshi H. (1984) (cita) propusieron mediante experimentos enzimáticos que el complejo Ca²⁺-PDE posee un sitio de unión para antagonistas de la CaM y que el sitio de unión para estos antagonistas en esta enzima puede ser estructuralmente similar al sitio de unión en la propia CaM. Estos experimentos se realizaron mediante

métodos indirectos (enzimáticos) con un exceso de la proteína CaM y en presencia de 1mM de Ca^{2+} [70].

El prototipo J-8 Clorhidrato (**J8**) es un compuesto reportado en la literatura como un antagonista de la CaM, este compuesto también es un análogo del **W7**, se ha demostrado que es capaz de inhibir la actividad del complejo Ca^{2+} -CaM dependiente de la PDE, así como de la cinasa de proteínas C (PKC) y la transglutaminasa [71]. El compuesto J8 reduce la invasión de células de melanoma a través de estudios in vitro mediante la inhibición de la CaM. Sin embargo, existen otros estudios que demuestran que la inhibición de **J8** no es dependiente ni selectivo de la concentración de Ca^{2+} interno o externo, además se sugiere que la inhibición no resulta de una acción anti-CaM [72], pese a ello, las compañías farmacéuticas siguen promoviéndolo como un antagonista de la CaM.

El prototipo E6 Berbamina (**E6**) es un compuesto que se ha reportado en la literatura como un inhibidor de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) inducida por CaM de manera dependiente de la concentración del compuesto **E6**, incluso dicha inhibición incrementa considerablemente cuando se añaden cantidades excesivas de CaM, la literatura propone a **E6** como un antagonista de la CaM nuevo y considerablemente potente [73].

El fármaco Amantadina (**AMA**), con el nombre comercial Amantadine Level, Symmetrel, Mantadan o Pakiden es un compuesto derivado de aminas simétricas primarias con un uso terapéutico y profiláctico limitado, su uso terapéutico es como antiviral, únicamente activo contra el virus de la influenza tipo A al interferir con el ciclo de replicación a través de la inhibición de la proteína M2 impidiendo los cambios conformacionales en la hemaglutinina necesarios para la fusión de las membranas viral y endosomal, impidiendo la liberación al citoplasma de los segmentos genómicos, y la disociación de las proteínas de matriz por lo que no hay maduración de la partícula viral. [74].

El compuesto Cloruro de Calmidazolium (**CAL**) es considerado un inhibidor de la CaM para su uso como analgésicos, evaluado en el test de la formalina, retirada de cola e inyección intratecal de NMDA, evaluado en concentraciones de 0.12-1.0 $\mu\text{mol/L}$.

También se ha reportan en la literatura que, a dosis mayores, produce flacidez muscular. El efecto analgésico de **CAL** no produce efectos sobre SNC como los opiáceos, lo cual les proporciona un buen potencial como analgésicos [75]. Estos efectos son mediados, a través del bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a las neuronas espinales mediante la inhibición de la CaM [76]. Los complejos Ca^{2+} -CaM activan varios tipos de enzimas intracelulares que incrementan la excitabilidad neuronal y la mantienen incluso después de que la concentración de Ca^{2+} se haya normalizado produciendo un estado de analgesia que dura aproximadamente 50 min. Otros autores describe que **CAL** produce la inhibición de un proceso de sensibilización neuronal en el hipocampo [77].

Finalmente el compuesto Mastoparan (**MAS**) es un análogo del compuesto Polistes Mastoparan, el cual es una toxina peptídica del veneno de la avispa reportado como un antagonista de la CaM, al igual que el **MAS**. Se ha reportado como una toxina que regula las proteínas G mediante la imitación de los receptores acoplados a dicha proteína, también ha sido reportado como un estimulador de la liberación de insulina por islotes pancreáticos a través de proteínas de unión a GTP y PLA2, esta última enzima está relacionada con diversas enfermedades principalmente de tipo inflamatorias y su actividad depende de la concentración del ion Ca^{2+} para ejercer su actividad, también ha sido nombrado como uno de los péptidos inhibidores de CaM más potentes [78].

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación del grado de saturación del calcio sobre la CaM y su repercusión en la afinidad de siete fármacos y prototipos de fármacos mediante un método experimental de fluorescencia y un método teórico, dinámica molecular (DM), utilizando el biosensor *hCaM M124C-mBBr* y herramientas de modelaje molecular respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Calcular las concentraciones de los equivalentes de calcio para la saturación de la CaM, utilizando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr*.
2. Determinar las K_{ds} de los inhibidores de CaM en función de los equivalentes de calcio, utilizando el biosensor *hCaM M124C-mBBr*.

3. Realizar estudios de acoplamiento molecular entre los inhibidores y la proteína CaM utilizando el programa AutoDock4.
4. Realizar estudios de dinámica molecular de los complejos 4Ca^{2+} -CaM-ligando utilizando el programa *Amber 14*.
5. Analizar las trayectorias obtenidas por la dinámica molecular y obtener parámetros termodinámicos teóricos de unión del sistema 4Ca^{2+} -CaM-ligando.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Fármacos y prototipo de fármacos

Todos los fármacos y prototipos de fármacos fueron adquiridos de Sigma Aldrich S.A de C.V., México* y Santa Cruz Biotechnology, Inc **, **TFP** (440-17-5*), BIS I (133052-90-1*), A7 (sc-203794**), J8 (sc-221772**), E6 (sc-221573**), AMA (665-66-7*), CAL (57265-65-3*), MAS (sc-200831**).

Biosensor CaM M124C-*mbr*

El biosensor fue construido y evaluado previamente en nuestro laboratorio, ubicado en la Torre de investigación en la Facultad de Medicina UNAM.

Súper computadora Miztli de la UNAM

Se utilizó la supercomputadora Miztli, bajo el proyecto autorizado con número SC16-1-IR-8, LANCAD-UNAM-DGTIC-313 proporcionado por la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGETIC), UNAM.

MÉTODOS

Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)

La conformación inicial de cada ligando fue construida y minimizada energéticamente con la aplicación geometric optimization del programa Hyperchem 8. Las estructuras de los compuestos y de la CaM fueron preparadas para el docking utilizando una supercomputadora en paralelo, la cual contiene 1368 procesadores AMD Opteron (<http://www.super.unam.mx/>). La macromolécula en cada docking fue la estructura resuelta por difracción de rayos-X de la CaM (2O60.pdb), obtenida a partir

del Protein Data Bank (www.pdb.org). El acoplamiento molecular (docking) se realizó en una caja de 60x60x60 Å, con un espacio de enrejamiento de 0.375 Å, localizada en el centro de la macromolécula; la cual se construye con el programa AutoGrid4 (parte del paquete de programas de AutoDock4). El proceso del acoplamiento molecular se realizó con el algoritmo genético Lamarckian (LGA), utilizando los parámetros recomendados inicialmente a excepción del número de corridas el cual lo aumentaremos a 100, un tamaño de población de 150, un número máximo de evaluaciones de 2,500,000 y un número máximo de generaciones de 27,000. Los programas utilizados para el docking y su análisis son los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular GraphicsLaboratory, TheScrippsReseachInstitute) sobre el sistema operativo UNIX en el nuevo equipo de supercomputo de la UNAM (Miztli supercomputer).

Dinámica molecular

Para realizar los cálculos de dinámica molecular se partió de un archivo de estructura tridimensional (PDB), el cual tiene la información espacial de cada uno de los átomos que conforman la macromolécula. La preparación de este archivo para cada complejo CaM-ligando se realizó en el módulo LEaP a partir del programa AMBER y conlleva los siguientes pasos:

- I. Se renumeraron tanto los residuos como los átomos de todo el complejo.
- II. Se indicó el estado de protonación de los diferentes grupos ionizables.
- III. Se neutralizó el sistema utilizando contra-iones dependiendo de la carga total del sistema.
- IV. Se solvató el sistema con el modelo de agua TIP3PBOX en forma de octaedro y con un espesor de 12 Å a partir de la superficie de la proteína.
- V. Se realizó una minimización de 600 pasos, seguido de una etapa de 50 ps de calentamiento desde 0 a 298.15 K, 50 ps de presurización para equilibrar el sistema a una presión de 1 atm, 500 ps de equilibrio y finalmente 20 ns de DM.

Después de terminar la dinámica molecular (DM) se analizaron los resultados con el protocolo de MM/PBSA en modos normales para obtener los parámetros energéticos

(ΔH , ΔG , ΔS). Estos programas han sido diseñados y optimizados para ser utilizados en sistemas de cómputo de alto desempeño, como el nuevo equipo de supercómputo (NES) de la UNAM Miztli. Los detalles de todos los protocolos utilizados se encuentran en los apéndices de esta tesis (Ver apéndices para más detalles).

Determinación de la K_d de los compuestos bioactivos de la CaM por fluorescencia

La determinación de la K_d se calculó a partir de titulaciones en fluorescencia del biosensor de CaM con el compuesto a evaluar. Utilizando una concentración de 1 mM del biosensor (en un volumen final de 2 mL) y una solución de concentración conocida del ligando, en buffer de Tris 50 mM, pH 7.5 a 25 °C. La λ_{ex} del biosensor utilizada fue de 381 nm y una λ_{em} en un intervalo de 405-550 nm, con 10 integraciones y colectando cada 2 nm.

Los valores de K_d , se determinaron a partir de las diferencias existentes entre las λ_{max} en función de la concentración del compuesto a evaluar, utilizando la siguiente ecuación de segundo orden en el programa OriginPro 2016 64Bit:

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

en donde P_0 y L_0 es la concentración de proteína y ligando presentes, K_d es la constante de disociación [79].

Esta ecuación de segundo orden tiene origen en la unión y disociación del ligando con la proteína, ya que dentro de un cierto periodo de tiempo, la proteína tendrá una probabilidad de unirse a su ligando la cual es proporcional a la cantidad de ligando disponible y circulante (concentración del ligando L_0) y la probabilidad de la unión efectiva (K_{on}), después de la unión la proteína o receptor también tiene una probabilidad de separarse del ligando en un periodo de tiempo (K_{off}), k_{on} y k_{off} son las constantes de velocidad de asociación y disociación.



Estimación del ΔG experimental a partir de la K_d

Para estimar el ΔG a partir de la constante de equilibrio (K_d) se utilizó la ecuación termodinámica de Van't Hoff. Esta ecuación relaciona la variación de la temperatura absoluta (T) con la variación de la constante de equilibrio o disociación. Considerando las relaciones entre el ΔG y la K_d obtenida de la titulación por fluorescencia, la ecuación de Van't Hoff se puede escribir de la siguiente manera:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT * \ln K_d$$

donde R es la constante de los gases ideales (1.987207 cal/mol K), T es la temperatura en grados Kelvin (298.15 K) y K_d es la constante de disociación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios experimentales de unión de los diferentes ligandos con CaM

Mediante estudios de unión de los diferentes fármacos y prototipos de fármacos (**CAL**, **J8**, **A7**, **MAS**, **E6** y **BIS**) utilizando el biosensor *hCaM M124-mBBr*, se obtuvieron parámetros de unión (K_d) en función del grado de saturación de Ca^{2+} en CaM. Se utilizó como control positivo la **TFP** ya que este fármaco posee estudios previos que respaldan su unión a CaM, ha sido uno de los prototipos más estudiados con esta proteína. Como control negativo utilizamos a la **AMA** por sus características fisicoquímicas, estructurales y farmacológicas no relacionadas con la CaM.

La Cl_{50} nos proporciona información limitada acerca de la afinidad en función del grado de saturación de Ca^{2+} en el complejo de CaM-ligando. Mientras que el establecimiento de la relación con la K_d en función del número de equivalentes de Ca^{2+} provee información sobre la respuesta celular. Lo anterior se traduce en la posibilidad de analizar posibles efectos adversos en aquellos tejidos u órganos en los que hay mayor concentración de Ca^{2+} con la finalidad de disminuir efectos colaterales, identificar fármacos más selectivos o incluso direccionar fármacos a ciertas patologías.

Los valores de K_d son parámetros representativos e intrínsecos de un sistema al equilibrio, ya que es una medida de la unión directa de un ligando a una proteína. En el caso de la Cl_{50} , este parámetro depende de algunas variables tales como la concentración del ligando y proteína utilizados, tiempo de reacción y condiciones de análisis; adicionalmente los valores de Cl_{50} son obtenidos mediante métodos indirectos, como lo son los métodos enzimáticos, los cuales generan mayores errores estadísticos.

La Tabla 3, muestra los parámetros de unión de los complejo $4Ca^{2+}$ -CaM-Ligandos experimentales y teóricos. La mayoría de los ligandos presentan un aumento de la K_d proporcional al grado de saturación de Ca^{2+} (4 iones Ca^{2+} -CaM), a excepción del compuesto **J8**. Este último disminuye su afinidad al aumentar el grado saturación de Ca^{2+} , lo cual es atípico. Todos los ligandos estudiados presentan una K_d en los intervalos esperados y reportados en la literatura (orden μM a saturación de Ca^{2+}). El **CAL** es el único ligando estudiado que presenta una K_d con un orden de magnitud menor que el resto (nM), lo que se traduce en una mayor afinidad del resto de los ligandos.

La capacidad del biosensor *hCaM M124C-mBBr* de monitorear diferentes ligandos, en este caso el ion calcio y los inhibidores nos permite obtener cinco K_{ds} en función del número de equivalentes de Ca^{2+} .

Tabla 3. Resultados experimentales y teóricos de la unión del complejo Ca^{2+} -CaM-Ligandos.

	Experimental					ΔG_{exp}^2	Teóricos		
	K_d^1 (μM)						ΔG_{Teo}	ΔH_{Teo}	ΔS_{Teo}
Equi/ Ca^{+2}	0	1	2	3	4		Kcal/mol		
CaM-TFP	5.23±0.25	1.89±0.11	0.93±0.15	0.87±0.1	0.62±0.18	-8.51	-26.8±11.39	-6.25±2.86	-33.13±3.86
CaM-MAS	0.38±0.10	0.44±0.08	0.30±0.05	0.06±0.01	0.02±0.02	-6.27	-5.9±1.4	0.4±0.2	-5.4±1.4
CaM-BIS I	1.31±0.30	1.26±0.20	1.23±0.13	1.17±0.17	0.19±0.41	-8.7	-2.9±0.8	-23.3±3.5	-20.3±7.4
CaM-A7	NU	un	NU	NU	NU	NU	-9.3±1.9	-30.8±4.2	-21.4±8.8
CaM-J8	1.24±0.5	1.44±0.9	1.81±0.9	1.95±1.1	2.20±0.0	-7.71	-5.8±1.6	-27.8±3.4	-21.9±5.9
CaM-E6	0.33±0.04	0.07±0.02	0.06±0.02	0.05±0.01	0.04±0.04	-10.09	-6.9±1.3	-36.0±5.7	-29.1±8.3
CaM-CAL	8.2±2.93*	10.2±9*	7.5±3.2*	6.9±4.8*	4.8±3.9*	-11.34	-25.1±8.3	-49.3±6.2	-24.1±5.6
CaM-AMA	-	-	-	-	-	-	+117.69±21.1	+15.50±5.1	+133.30±13.80

¹Constante de disociación aparente

²Energía libre de Gibbs o entalpía a condiciones de temperatura y presión constantes, La ΔG_{exp} se obtuvo con la ecuación, $\Delta G_{exp}=RT \ln(K_d)$, $R=1.986 \times 10^{-3}$ kcal/mol, $T=298.15$ K y K_d =constante de disociación aparente a condiciones saturación de calcio.

*Resultados en nanomolar

La utilización del biosensor *hCaM M124C-mBBR* representa una ventaja frente a los ensayos enzimáticos, ya que estos últimos miden la unión de manera indirecta entre la proteína y el ligando, lo que implica reacciones enzimáticas asociadas a reacciones secundarias con variantes como el tiempo de reacción, pH, temperatura, concentración de los sustratos, etc. Este tipo de metodologías están expuestas a obtener resultados falsos positivos, prueba de ello es el compuesto **A7** el cual ha sido analizado solamente con métodos enzimáticos y se han reportado IC_{50} 's. Sin embargo, nosotros medimos la interacción directa de **A7** con el biosensor de CaM y este no muestra interacción directa con el biosensor (Figura 20B). Este tipo de análisis nos indica que existen compuestos que inhiben complejos enzimáticos específicos relacionados con la CaM, lo cual puede ayudar a describir mecanismos de acción de este tipo de inhibidores. Por otro lado, la necesidad de corroborar los resultados por al menos dos metodologías diferentes.

Cabe señalar que el biosensor *hCaM M124C-mBBR* ha servido para identificar más de 20 inhibidores de la CaM con anterioridad, con buena sensibilidad ya que posee una $\Phi = 0.494$, aproximadamente 20 veces mayor que el valor para *hCaM* nativa ($\Phi = 0,025$) y un cambio en la intensidad de fluorescencia de alrededor de 80% al interactuar con los inhibidores clásicos. Estos datos apoyan el uso de *hCaM M124C-mBBR* como un biosensor de fluorescencia confiable para determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas de inhibidores de la CaM. La Figura 10 (checha la numeración), muestra la titulación del biosensor *hCaM M124C-mBBR* con Ca^{2+} la cual nos da la pauta para calcular la concentración correspondiente de equivalentes de calcio a la concentración de proteína utilizada en este trabajo, es decir la cantidad de proteína total y la saturación de los 4 iones equivalente de Ca^{2+} - CaM. La adición de Ca^{2+} causa un aumento en la intensidad de fluorescencia en función del grado de saturación, la K_d calculada es de 2.35×10^{-6} M con una estequiometría de 4.18 (considerando los 4 iones Ca^{2+} que se pueden unir y saturar a CaM). La proteína posee 4 sitios de unión a Ca^{2+} dos de alta afinidad (sitio III y IV) en el dominio N-terminal y otros dos de baja afinidad (sitios I y II) en el dominio C-terminal, los cuales

se han reportado que se unen de manera secuencial [80]. Para nuestra metodología estimamos el número de equivalentes de Ca^{2+} hasta la concentración saturante del biosensor (4 iones Ca^{2+}), es decir con 0.0, 2.5, 5.5, 7.5 y 10 μM de calcio respectivamente.

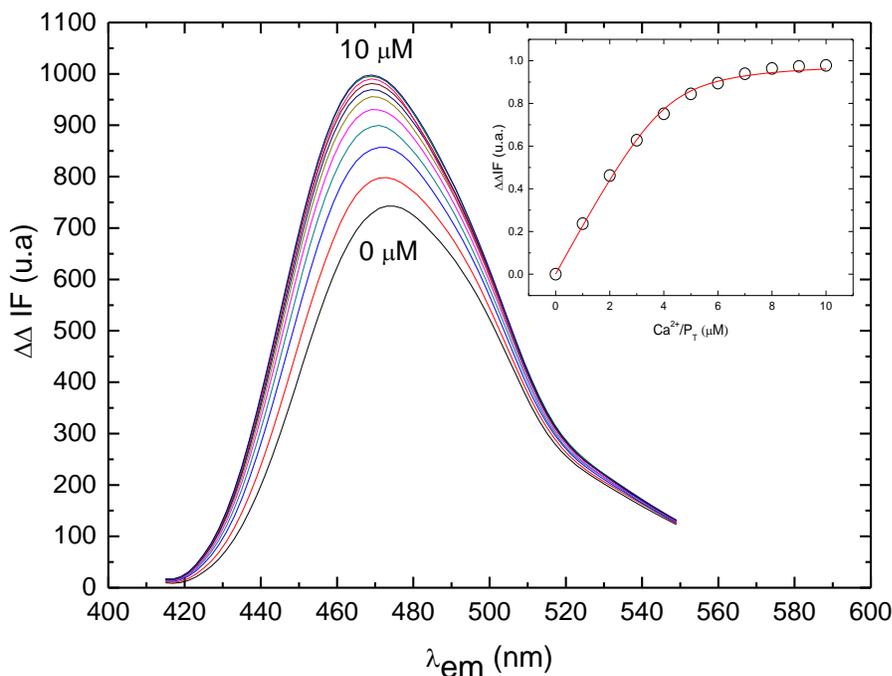


Figura 10 Espectro de fluorescencia de la titulación del biosensor hCaM-M124C-mBBr con Ca^{2+} a saturación (0-10 μM), en el re-gráfico se muestra el ajuste de unión

Las titulaciones de todos los compuestos con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* a diferentes grados de saturación de Ca^{2+} se muestran en el APÉNDICE en la pág. 80

La figura 11-A1, muestra el modelo tridimensional del biosensor en su conformación abierta con sus cuatro sitios de Ca^{4+} ocupados y la posición del biosensor en la proteína en color verde, esta conformación representa el estado libre de unión de la proteína con algún ligando, la figura 15-A11 muestra el biosensor en su conformación cerrada, con sus cuatro sitios de Ca^{4+} ocupados y la unión efectiva del biosensor con el fármaco TFP, el cual representa el control positivo ya que es el fármaco clásico mayormente estudiado en CaM.

La Figura 11B, muestra el espectro de fluorescencia correspondientes a la titulación del fármaco **TFP** con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* y su respectivo regráfico. En este último se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de ligando entre la cantidad de proteína total, este regráfico nos permite calcular la K_d haciendo uso de una ecuación de segundo orden. El espectro de fluorescencia muestra una disminución a saturación de Ca^{2+} de alrededor del 38.6 % en la intensidad de fluorescencia y prácticamente la **TFP** no provoca un desplazamiento en el espectro de emisión hacia mayores o menores λ_{nm} . La interacción directa de la **TFP** con el fluoróforo *mBBr* es probablemente la responsable de la disminución de la fluorescencia extrínseca al cambiar el microambiente del fluoróforo.

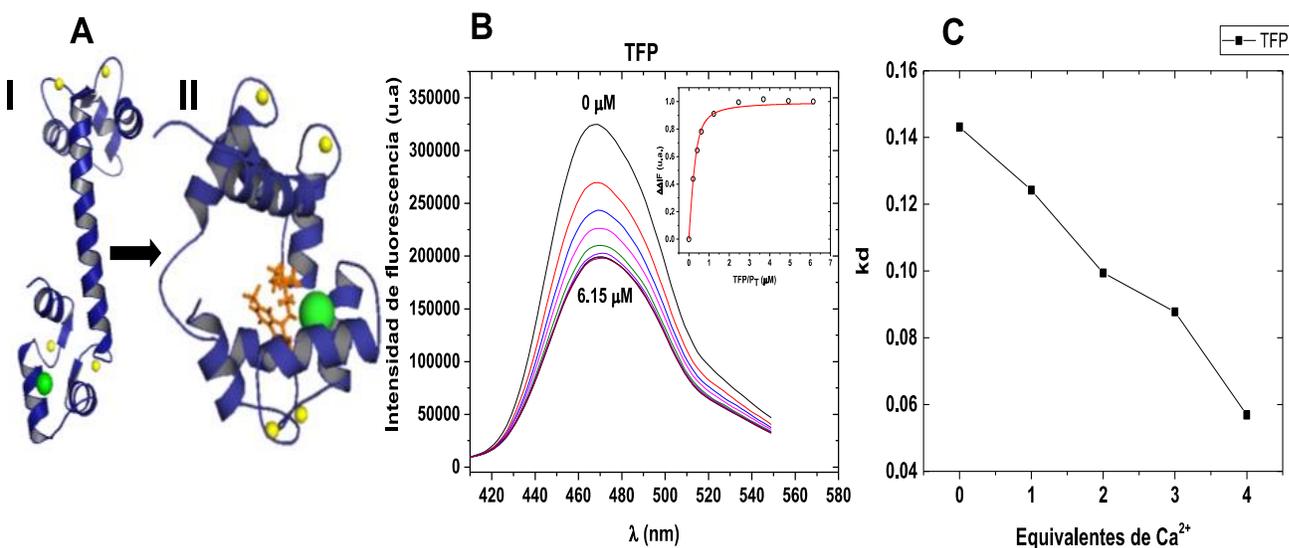


Figura 11. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su confirmación abierta (i) y cerrada (ii). Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; *M124C-mBBr*, esfera verde y 4Ca^{2+} , esferas amarillas unida la **TFP**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con TFP.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca^{2+} .**

La importancia del fenómeno de la transferencia de energía para la bioquímica emana del hecho de que la eficiencia de la transferencia es función de la distancia entre los compuestos fluorescentes y por tanto utilizarse para medir las distancias moleculares, ver la interacción del complejo al exponerse al solvente y la interacción con el entorno proteico como lo muestra la Figura 11A. En este caso al no

desplazarse el espectro de emisión podría deberse a que no hay solo un proceso de disipación de energía con el entorno lo que permite un equilibrio energético.

La Figura 11C, muestra la tendencia de la variación de la K_d en función del número de equivalentes de Ca^{2+} , donde se observa una disminución de la K_d en función los equivalentes de Ca^{2+} adicionados. Esto nos indica un aumento en la afinidad del ligando al saturar de calcio la CaM. Las K_{ds} calculadas se encuentran en el intervalo de 0.62 – 5.23 μM , lo cual representa un aumento de aproximadamente ocho veces entre 0 y 4 equivalentes de Ca^{2+} . Estos resultados se encuentran en armonía con lo reportado previamente en la literatura, ya que describen a la **TFP** como un compuesto que promueve la elevación de Ca^{2+} citosólico inducida por agonistas [81].

La Figura 12B, muestra los espectros de fluorescencia correspondientes a la titulación del fármaco **MAS** con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* y su respectivo regráfico. El espectro de fluorescencia muestra una disminución de alrededor del 13.2% en la intensidad de fluorescencia y prácticamente el **MAS** no provoca un desplazamiento en el espectro de emisión. Este compuesto estructuralmente es grande y posee tanto regiones hidrófobicas como regiones polares, lo que puede permitir un balance entre las interacciones electrostáticas del complejo y del microambiente del fluoróforo como se muestra en la Figura 12A.

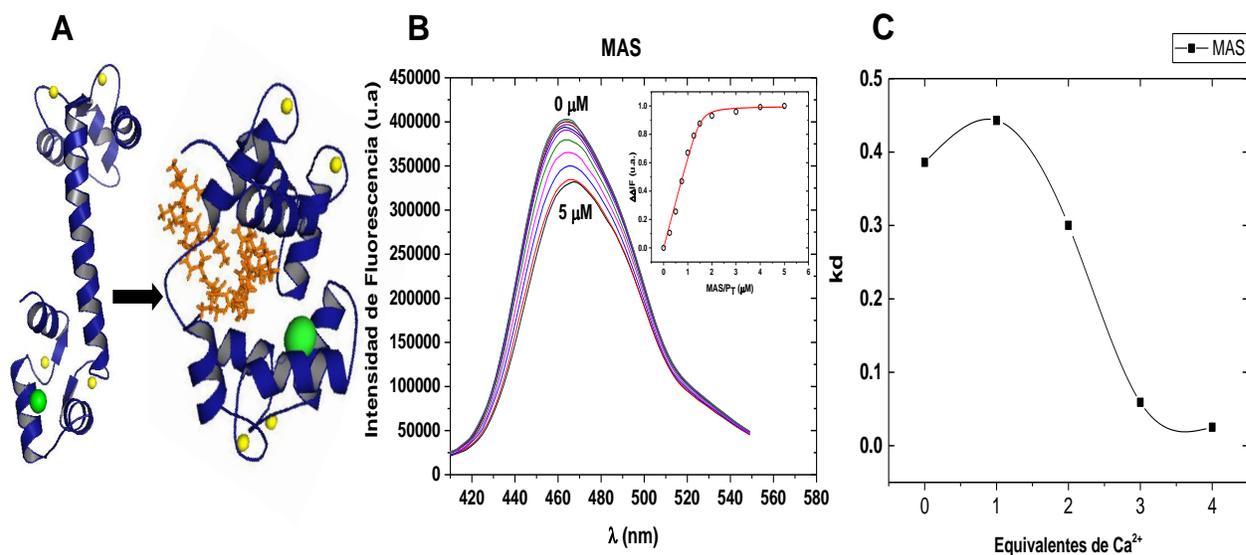


Figura 12. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su confirmación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; M124C-*mBBr*, esfera verde y 4Ca²⁺, esferas amarillas unida la **MAS**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con MAS.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca²⁺ (10 μM). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca²⁺.**

La Figura 12C, muestra la tendencia de la variación de K_d en función del número de equivalentes de Ca²⁺, donde se observa una disminución de la K_d en función los equivalentes de Ca²⁺ adicionados, lo que se traduce en un aumento en la afinidad del ligando al saturar de Ca²⁺ a la proteína. Las K_{ds} calculadas se encuentran en el intervalo de 0.02-0.38 μM, lo cual representa un aumento de alrededor de 19 veces entre 0 y 4 equivalentes de Ca²⁺. Datos en la literatura indican que existe una inhibición de tipo competitiva al menos para los complejos CaM-PDE y CaM-cGMP con una CI_{50} de 100 y 20.3 nM, respectivamente. Finalmente otros estudios demuestran que los dos dominios globulares del complejo de Ca²⁺-CaM-**MAS** se aproximan entre sí de 8.0-9.5 Å en promedio, distancia apropiada para ser considerada una unión e interacción entre una proteína y su ligando [82].

La Figura 13B, muestra los espectros de fluorescencia correspondientes a la titulación del fármaco **BIS I** con el biosensor *hCaM* M124C-*mBBr* y su respectivo regráfico. El espectro de fluorescencia muestra una disminución de alrededor del 77.1% en la intensidad de fluorescencia. **BIS I** tampoco provoca un desplazamiento en el espectro de emisión hacia mayores o menores λ , esto posiblemente se debe a la interacción directa entre **BIS I** y el fluoróforo *mBBr* en el biosensor como se muestra en la figura 13A.

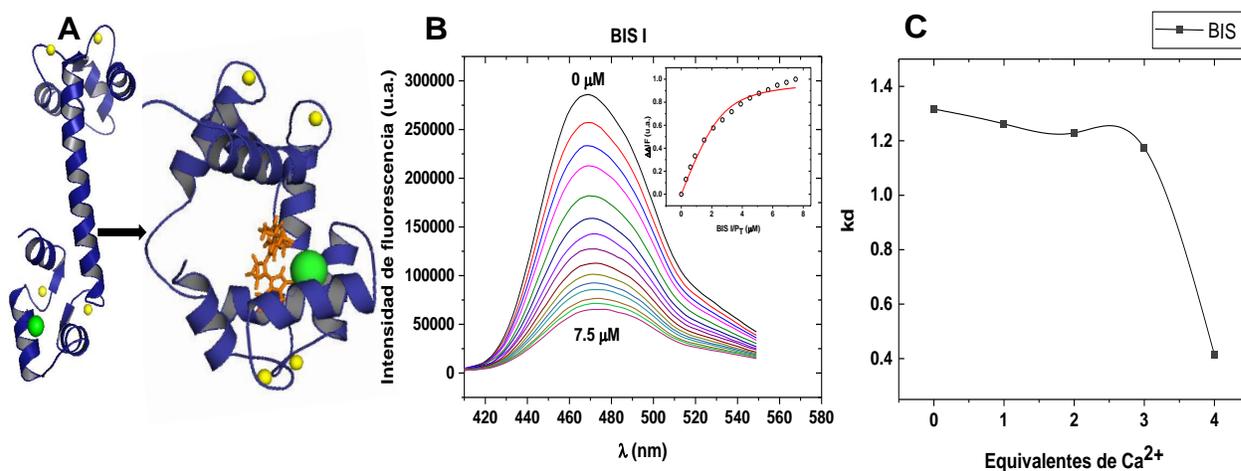


Figura 13. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su confirmación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; *M124C-mBBr*, esfera verde y $4Ca^{2+}$, esferas amarillas unida la **BIS I**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con BIS I.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} (10 μ M). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca^{2+} .**

La Figura 13C, muestra la tendencia de la K_d en función del número de equivalentes de Ca^{2+} , en donde no se aprecia un cambio significativo hasta 3 equivalentes de Ca^{2+} , por lo que podemos decir que la afinidad de **BIS I** es aparentemente independiente del grado de saturación de Ca^{2+} . Sin embargo, con 4 equivalentes de calcio se observa una disminución significativa del valor de K_d (alrededor de 6 veces), este resultado nos muestra el matiz de conformaciones que tiene la CaM para unir ligandos. Lo anterior puede relacionarse con los efectos farmacológicos de estos inhibidores; por ejemplo, el **BIS I** puede presentar mayor efecto en el músculo (órgano donde hay mayor concentración de calcio) ya sea de manera directa o como efecto adverso. Las K_{ds} calculadas se encuentran en el intervalo de 0.19 – 1.31 μ M. Sin embargo, aún no hay datos de unión directa reportados en la literatura para el complejo CaM-**BIS I**, solo se ha reportado una Cl_{50} =10 nM para el complejo PKC-**BIS I**, una Cl_{50} =360 nM para el complejo GSK3-**BIS I**, otra Cl_{50} = 170 nM para el complejo GSK3 β -**BIS I** y una Cl_{50} = 2 μ M para el complejo PKA-**BIS I**, determinados mediante métodos enzimáticos [83, 84].

Por otro lado, la Figura 14B, muestra los espectros de fluorescencia correspondientes a la titulación del fármaco **E6** con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* a saturación de Ca^{2+} y su respectivo gráfico. El espectro de fluorescencia muestra una disminución de alrededor del 24.2 % en la intensidad de fluorescencia y de igual manera que los compuestos anteriores **E6** prácticamente tampoco provoca un desplazamiento en el espectro de emisión hacia mayores o menores λ . La disminución de la intensidad de fluorescencia posiblemente se debe a interacción directa entre **E6** y el fluoróforo *mBBr* en el biosensor. No se presenta un desplazamiento a longitudes de onda mayores o menores, posiblemente porque en la interacción del ligando con el biosensor no hay un proceso de disipación de energía

notablemente mayor a la interacción propia del complejo permitiendo su estabilidad energética.

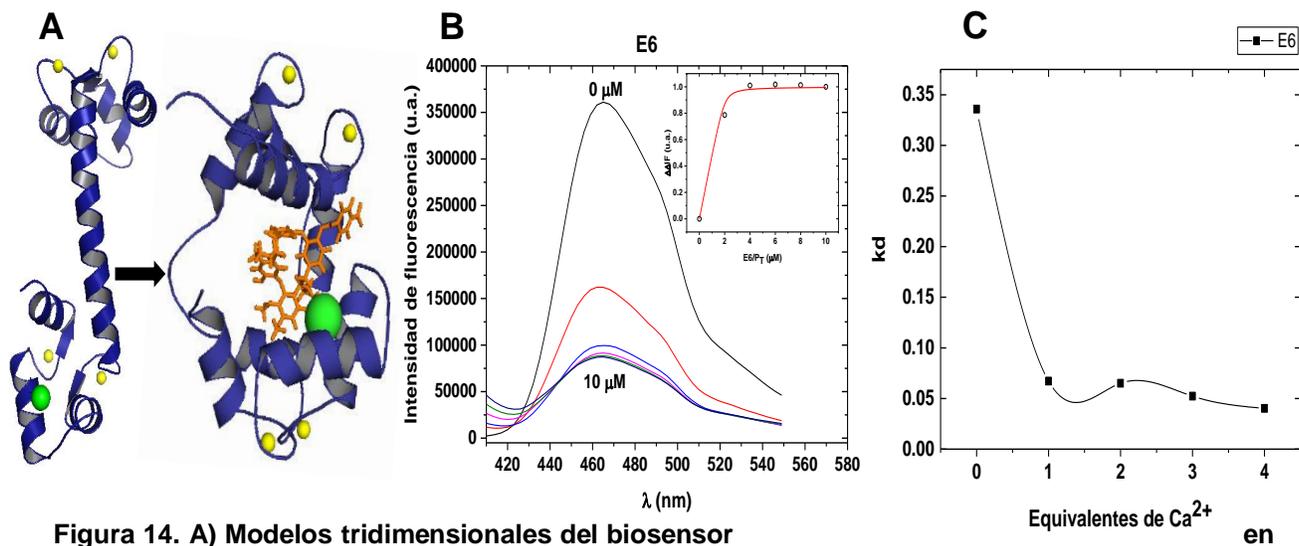


Figura 14. A) Modelos tridimensionales del biosensor su confirmación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; M124C-*mBBR*, esfera verde y 4Ca²⁺, esferas amarillas unida la **E6**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con E6.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca²⁺ (10 μM). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca²⁺.**

La Figura 14C, muestra la variación de la K_d en función de equivalentes de calcio, observando un cambio significativo en la tendencia de la K_d de 0 a 1 equivalente de Ca²⁺ adicionados (alrededor de 5 veces). Posteriormente, la K_d se mantiene constante hasta la saturación de calcio, por lo que podemos argumentar que la afinidad de **E6** con respecto a CaM es mayor en un ambiente donde hay relativamente poco Ca²⁺ pero responde igual en aquellos órganos donde hay mayor concentración de este ión. Bajo esta hipótesis posiblemente **E6** tendrá los mismos efectos colaterales o la misma acción terapéutica en cualquier órgano que haya concentraciones relativamente bajas de Ca²⁺. Las K_{ds} calculadas se encuentran en el intervalo de 0.04–0.33 μM, por lo que la afinidad de **E6** hacia CaM es relativamente alta en comparación de los inhibidores clásicos, los datos reportados en la literatura, señalan a **E6** como un antagonista de CaM, con CI_{50} reportadas de 8 μM para el complejo CaM-MYLK y de 0.53 μM para el complejo CaM-PDE, respectivamente [85].

Para el caso de **J8**, se observa una disminución en el espectro de fluorescencia de alrededor del 65.5 % en la intensidad de fluorescencia y en este caso **J8** sí provoca un desplazamiento en el espectro de emisión hacia menores λ (efecto hipsocrómico), alrededor del 1.3 % (Figura 15B). Este fenómeno puede ser atribuido a que la interacción entre **J8** y el *mBBR* produce una conjugación la cual ocasiona una redistribución electrónica en las moléculas.

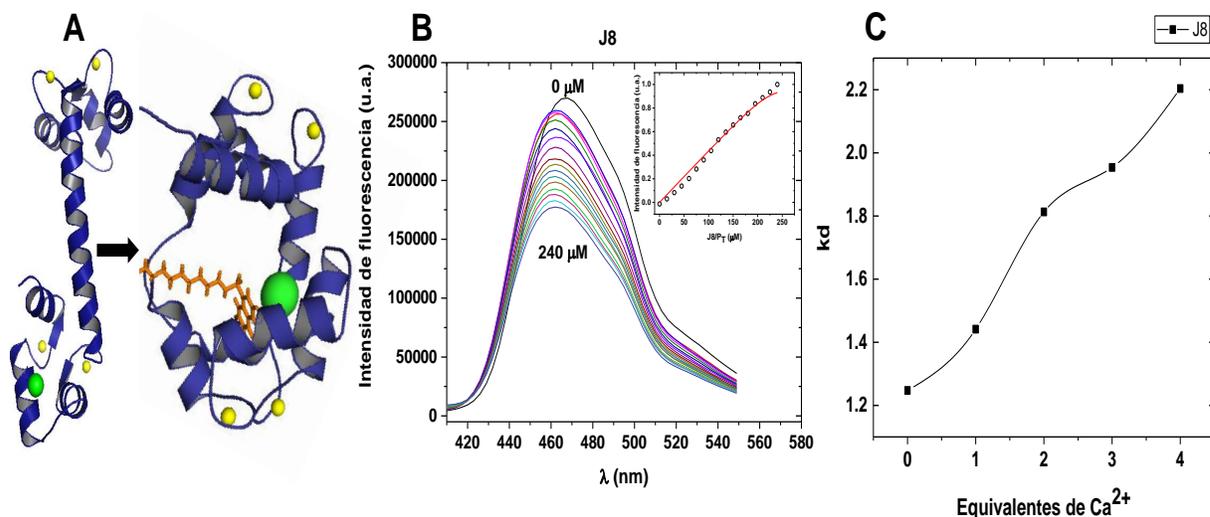


Figura 15. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su conformación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; M124C-*mBBR*, esfera verde y 4Ca^{2+} , esferas amarillas unida la **J8**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con J8.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} (10 μM). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca^{2+} .**

La Figura 15C, muestra una variación particular con respecto a la tendencia de la K_d en función del número de equivalentes de Ca^{2+} . La afinidad de este ligando por la CaM disminuye al incrementar el grado de saturación de Ca^{2+} en CaM, efecto contrario al resto de los compuestos estudiados en este trabajo. Las K_{ds} calculadas se encuentran en el intervalo 1.24–2.20 μM lo cual representa una disminución de aproximadamente dos veces entre 0 y 4 equivalentes de Ca^{2+} . La afinidad de **J8** hacia CaM se encuentra en los intervalos esperados para la mayoría de inhibidores anti-CaM, los datos reportados en la literatura señalan que la inhibición de **J8** no es dependiente del Ca^{2+} interno o externo, además diversos estudios demuestran que **J8** es más selectivo con el ión K^+ (CI_{50} =:4 a 11 μM) en comparación con el ión Ca^{2+} (CI_{50} = 36 μM) [72].

La Figura 16B, muestra un aumento en el espectro de fluorescencia de alrededor del 25.4 % en la intensidad de fluorescencia para el **CAL**, presenta un desplazamiento en el espectro de emisión hacia menores λ (efecto hipsocrómico), alrededor del 2.6 %, lo que probablemente se deba a la conjugación de la interacción directa del fármaco con el fluoróforo del biosensor. El **CAL** es el compuesto con mayor afinidad por la CaM de todos los ligandos estudiados en este trabajo, esta afinidad puede estar relacionada con la estructura del **CAL**, ya que es una estructura hidrofóbica conjugada y con varias regiones altamente polares por la presencia de halógenos (cloruro).

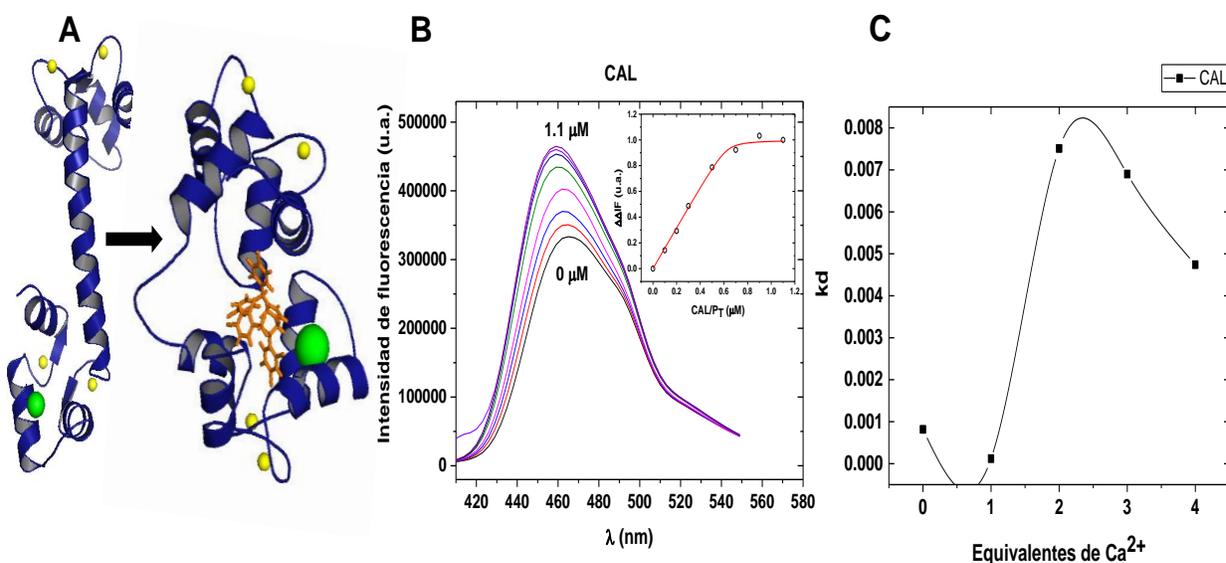


Figura 16. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su conformación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; M124C-*mBBr*, esfera verde y $4Ca^{2+}$, esferas amarillas unida la **CAL**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CAL.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} (10 μ M). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca^{2+} .**

La Figura 16C, muestra la tendencia general de la variación de la afinidad del ligando hacia el biosensor con respecto al número de equivalentes de Ca^{2+} . Podemos observar de forma general una disminución en la afinidad a medida que aumentamos el número de equivalentes de calcio. Sin embargo, el intervalo en el que varía el valor de K_d (4.8 – 8.2 nM) no es realmente grande, aproximadamente dos veces entre 0 y 4 equivalentes de Ca^{2+} . En la literatura se ha demostrado que, CAL inhibe la PDE dependiente de CaM y la activación inducida por CaM de la ATPasa transportadora de calcio de los eritrocitos ($CI_{50} = 0,15$ y $0,35 \mu$ M, respectivamente). El CAL también

inhibe una serie de ATPasas transportadoras de calcio, incluidas las del corazón y del músculo esquelético ($CI_{50} = 2,1$ y $2,9 \mu\text{M}$, respectivamente), sin embargo, estos estudios se han realizado mediante métodos enzimáticos [86].

La Figura 17B, muestra el espectro de fluorescencia correspondientes a la titulación del fármaco **AMA** (control negativo) con el biosensor *hCaM M124C-mBBr*, el cual no presenta variación en la intensidad de fluorescencia y no se produce un desplazamiento de λ en el espectro de emisión, debido a que este fármaco no interacciona con CaM, ya que es un fármaco antiviral cuyo blanco molecular es la proteína M2 la cual es determinante en la resistencia del virus de la influenza tipo A.

En el enlace <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-natzi/cam-ama.html> se puede apreciar la DM del complejo **AMA-CaM**, donde se observa como **AMA** no interacciona con el fluoróforo *mBBr* y prácticamente AMA abandona a la proteína CaM, estructuralmente AMA no reúne todas las características que teóricamente se han descrito para la unión efectiva de CaM hacia ella, es un fármaco pequeño, poco hidrofóbico comparado con los otros fármacos y no posee átomos de halógenos.

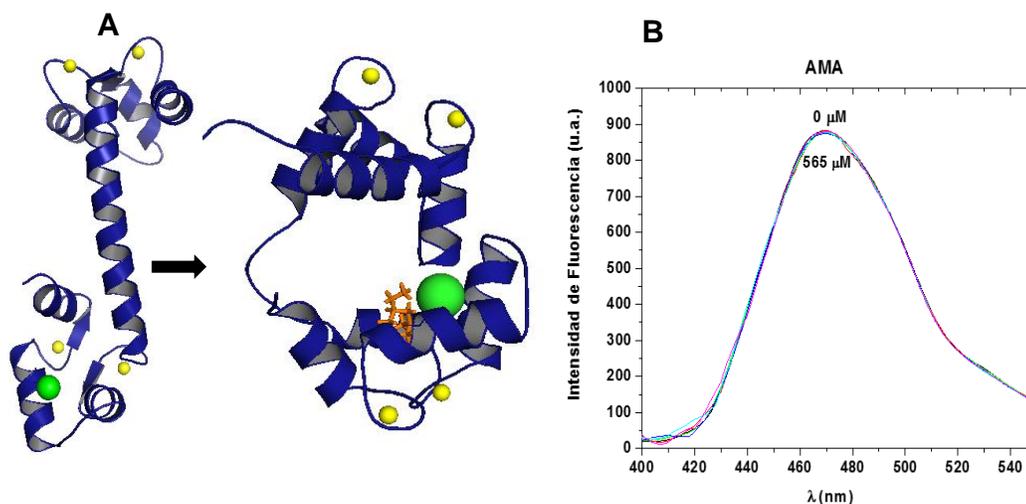


Figura 17. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su confirmación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; *M124C-mBBr*, esfera verde y 4Ca^{2+} , esferas amarillas unida la **AMA**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con AMA.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} ($10 \mu\text{M}$). **C) Variación de la K_d en función de equivalentes de Ca^{2+} .**

Finalmente se estudió la interacción de un prototipo de fármaco ya reportado en la literatura como antagonista e inhibidor de la CaM, el compuesto **A7** con el objetivo de analizar la relación estructura–función. Sin embargo, este compuesto no mostró respuesta con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* (Figura 18B) . El espectro de fluorescencia correspondientes a la titulación del **A7** con el biosensor *hCaM M124C-mBBr*, no se percibe una variación en la intensidad de fluorescencia a pesar de adicionarle 52 μM del ligando **A7**, la cual es una cantidad de 3 veces mayor que cualquier compuesto utilizado para saturar al biosensor en las mismas condiciones experimentales. Para asegurarnos del resultado a la misma cubeta de reacción se le adicionó **TFP** (control positivo) observando una disminución significativa en la señal de fluorescencia correspondiente a la interacción con el biosensor (Figura 18B).

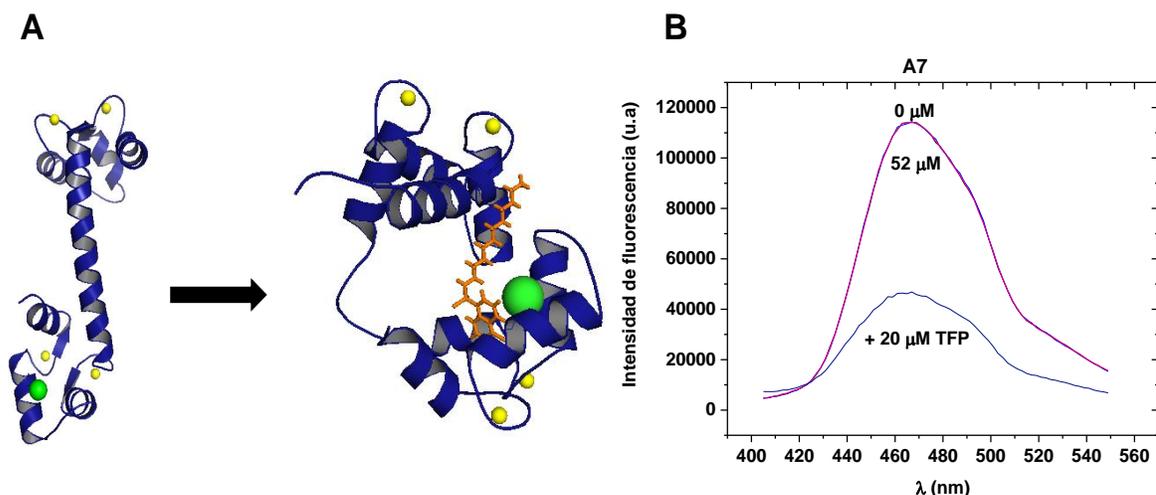


Figura 18. A) Modelos tridimensionales del biosensor en su conformación abierta y cerrada. Cambio en la estructura del biosensor, *hCaM*, estructura en azul; M124C-*mBBr*, esfera verde y 4Ca^{2+} , esferas amarillas unida la **A7**, bastones naranjas. **B) Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con A7.** Los espectros de fluorescencia fueron realizados con una concentración saturada de Ca^{2+} (10 μM).

Estos resultados nos indican que **A7** no interacciona directamente con la CaM. Sin embargo, podría estar inhibiendo algún complejo CaM-proteína ya que todas las Cl_{50} reportadas para este compuesto son obtenidas a través de ensayos enzimáticos (ensayos indirectos).

Desde el punto de vista fisiopatológico y farmacológico la importancia de estos resultados puede coadyuvar a interpretar los mecanismos de acción en que estos

fármacos y prototipos de fármaco actúan en los diferentes tejidos. En el tejido muscular, neuronal, óseo, etc. Para el caso del **E6** se observa que el único cambio apreciable con respecto a la K_d fue con 1 equivalente de Ca^{2+} sobre la CaM, por lo que este prototipo de fármaco puede actuar con la misma afinidad en cualquier tejido donde se encuentre la CaM a bajas concentración de Ca^{2+} . Para el caso de la **TFP** el cual es reportado como un buen antipsicótico al ser más afín a la CaM cuando esta se encuentra en su forma saturada de Ca^{2+} provoca la relajación de la musculatura lisa sienta este un efecto adverso obstaculizando el trabajo de una persona en el día a día, en este caso sería mejor utilizar el **J8** el cual podría ser un buen antipsicótico con menores efectos colaterales. Lo que puede ayudar a direccionar a estos fármacos hacia un complejo específico con lo cual se pueden desarrollar fármacos más selectivos y atenuar posibles efectos colaterales.

Estudios teóricos de unión de los diferentes ligandos con CaM

Se realizaron estudios teóricos de unión de los diferentes ligandos a la CaM, inicialmente a través de acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking) para formar los complejos CaM-ligando y posteriormente estudios de DM con la finalidad de calcular parámetros termodinámicos teóricos de unión. Los estudios de DM comprenden diferentes etapas secuenciales, las cuales son: minimización, calentamiento, densidad, equilibrio y finalmente realizar la DM.

La Figura 19, muestra el progreso que comprende las diferentes etapas que involucra la DM en el complejo Ca^{2+} -CaM-ligandos, lo cual nos da la pauta para establecer los tiempos de cada etapa en este sistema. Las etapas de equilibrio y producción (dinámica) son donde existe la mayor estabilidad energética en comparación con las etapas de calentamiento y densidad ya que en esas etapas el complejo se calienta desde 0 a 298.15 °K y se presuriza a 1 atm en cuestión de ns lo que provoca que la entropía en el sistema sea grande que a su vez se traduce en una gran variación en la energía del sistema. La contribución entrópica proviene de los grados de libertad del sistema. Los cambios en la dinámica intrínseca de la proteína durante la interacción pueden modificarse debido, la solvatación o desolvatación de

moléculas de H₂O durante la interacción, o bien de los cambios en la flexibilidad local o global de la proteína. Las últimas etapas mantienen una estabilidad energética tal, que permiten las condiciones necesarias para que sea posible realizar los análisis correspondientes ya que hay que recordar que la DM se trata de hacer en condiciones de equilibrio termodinámico semejantes a las experimentales.

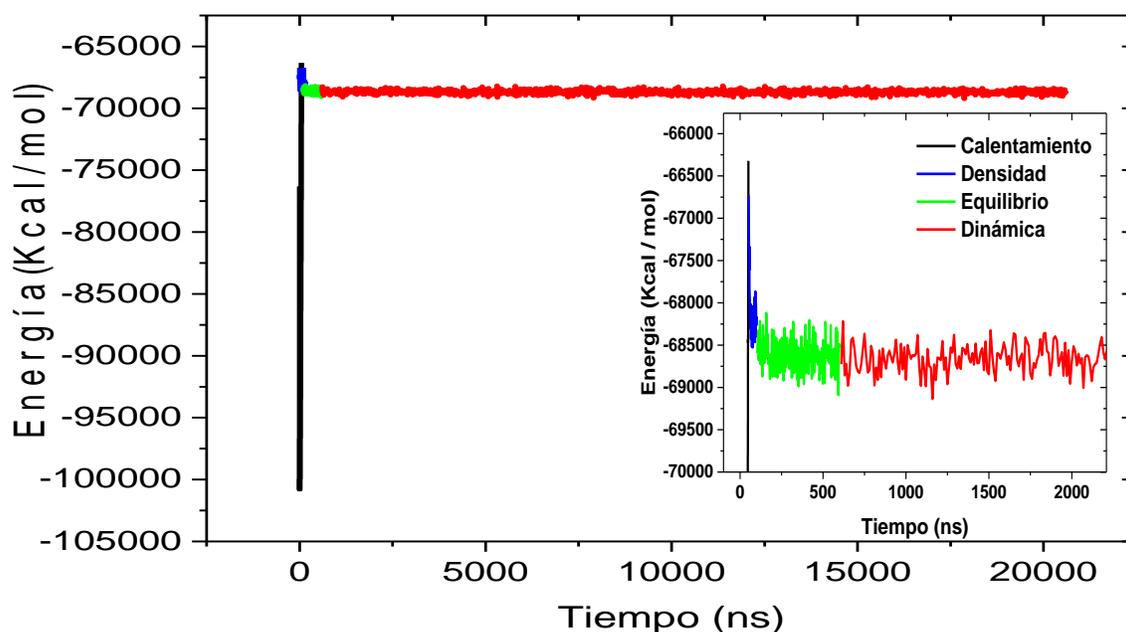
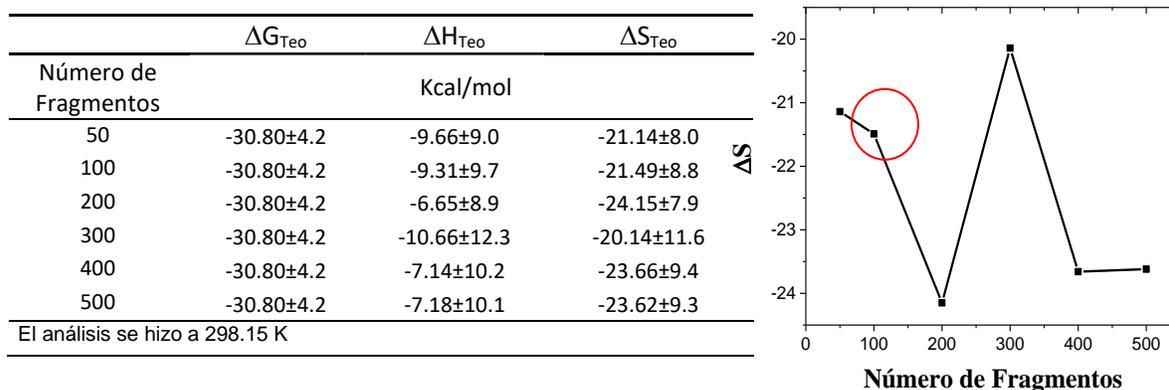


Figura 19. Representación gráfica del progreso de la DM del Fármaco TFP.

Por otro lado, los análisis de DM nos proporcionan información de las propiedades de unión de los complejos CaM-Ligando en función del tiempo. Para analizar las DM, nosotros utilizamos el protocolo de modos normales el cual permite estimar parámetros termodinámicos (ΔG , ΔH y ΔS). Este análisis se puede realizar con diferente frecuencia de intervalos. La Tabla 4, muestran la variación de los parámetros de unión teóricos del complejo $4Ca^{2+}$ CaM-TFP, donde se puede observar que el $\Delta G_{T_{e0}}$ no cambia a pesar de variar el intervalo de fragmentos. Sin embargo, existe variación en el $\Delta H_{T_{e0}}$ y $\Delta S_{T_{e0}}$ lo que nos indica que existen efectos compensatorios únicamente. Por lo tanto, decidimos analizar todas las DM de los diferentes complejos con intervalos de 100 fragmentos como lo muestra el gráfico X, ya que el componente entálpico y entrópico no fluctúan mucho lo que nos habla de la

mayor estabilidad en el complejo para ser analizado, esto es de gran utilidad a la hora de parametrizar la dinámica molecular con la finalidad de predecir con mayor precisión las propiedades energéticas y estadísticas de los sistemas, a la vez que aportan información sobre la conformación y estabilidad de los mismos en solución.

Tabla 4 y gráfico 1. Parámetros teóricos de unión a diferentes números de fragmentos analizados por modos normales CaM-TFP.



La Tabla 3 (pág. 45), muestra los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de los estudios de DM realizados. Todos ellos son consistentes con las leyes de la termodinámica las cuales indican la dirección de un proceso espontáneo (ΔG menor a cero) a excepción del complejo $4Ca^{2+}$ -CaM-AMA. La mayor contribución energética es proporcionada por el componente entálpico (ΔH) en todos los casos, lo que nos indica una mayor estabilidad y posiblemente una buena afinidad entre los complejos $4Ca^{2+}$ -CaM-ligandos.

Los resultados de los estudios de DM son consistentes con los datos experimentales y con las leyes de la termodinámica, la mayor contribución energética es proporcionada por el componente entálpico (ΔH) el cual es el que contribuye más al ΔG_{Teo} en todos los casos. Esta contribución energética corresponde a las interacciones directas entre el ligando y la CaM (interacciones electrostáticas, los puentes de Hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, las fuerzas de Van der Waals, entre otras). Un valor menor de ΔG_{Teo} nos indica una mayor estabilidad y posiblemente una buena afinidad entre el complejo $4Ca^{2+}$ -CaM-ligando.

Los videos de todas las trayectorias de DM se encuentran disponibles en el siguiente enlace (<http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-natzi/videos.html>). Los videos muestran 20 ns de la DM donde se puede apreciar los complejos 4Ca^{2+} -CaM-**J8**, 4Ca^{2+} -CaM-**TFP**, 4Ca^{2+} -CaM-**MAS**, 4Ca^{2+} -CaM-**BIS I**, 4Ca^{2+} -CaM-**A7**, 4Ca^{2+} -CaM-**E6** y 4Ca^{2+} -CaM-**CAL**, los cuales mantiene la forma cerrada y estable de la CaM, mientras el complejo 4Ca^{2+} -CaM-**AMA** a pesar de mantener la forma cerrada de la CaM se observa como la **AMA** se desprende y aleja de la CaM (unión no efectiva). En el caso del complejo 4Ca^{2+} -CaM-**A7** a pasar de que el **A7** se mantiene dentro de la CaM, esta última tiende a deformarse. En el complejo 4Ca^{2+} -CaM-**J8**, se puede observar que en algún momento **J8** abandona la CaM y esta última pierde su estabilidad conformacional, lo cual es consistente con la gráfica de RMSD vs tiempo (Figura 20); en el cual se puede observar una variación semejante a la apo CaM (conformación abierta) sin ligando.

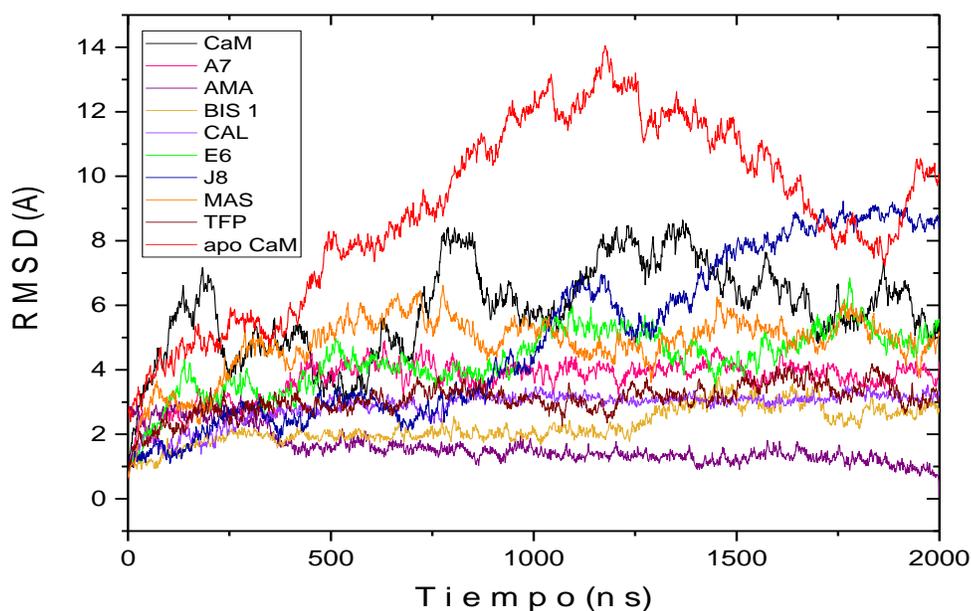


Figura 20. Modelo estructural y análisis de la RMSD de la simulación de dinámica molecular de los complejos CaM-Ligandos, CaM abierta y CaM cerrada.

La Figura 20, muestra todas las RMSDs (Desviación de la media cuadrática) de las DM conformación abierta (apo CaM) y los complejos 4Ca^{2+} -CaM-ligandos a través del tiempo. La CaM en su conformación abierta presenta la mayor RMSD en un intervalo que va de 4 a 14 Å, lo que se traduce en una menor estabilidad en

comparación con el resto de los complejos. La transición de la forma abierta a la forma cerrada, exponiendo regiones hidrofóbicas en la proteína las cuales permiten la unión de los diferentes ligandos y proteínas reguladoras. La mayoría de los inhibidores que presentaron buena afinidad experimentalmente presentan bajas y constantes valores de RMSD, lo cual es consistente con la información reportada en la literatura mediante difracción de rayos X y de RMN de CaM.

Las Figuras 21 y 22, muestran otro análisis realizado a partir de los datos de DM, donde se identifica el número y la frecuencia de contactos entre los residuos de la CaM y el ligando a lo largo de la DM. La densidad de contactos observados entre los ligandos y la CaM correlaciona de manera indirecta el grado de unión en los complejos 4Ca^{2+} -CaM-ligandos. Por ejemplo, el complejo que muestra mayor afinidad y mayor densidad de contactos es 4Ca^{2+} -CaM-**CAL** (Figura 22G) y en el caso de la **AMA** (control negativo) solo se observan contactos al inicio de la trayectoria. Para el caso del **A7** el cual fue el compuesto que no se une al biosensor, este solo presenta contactos en una región de la proteína y para el compuesto **J8** algunos contactos solo se observan al inicio de la dinámica.

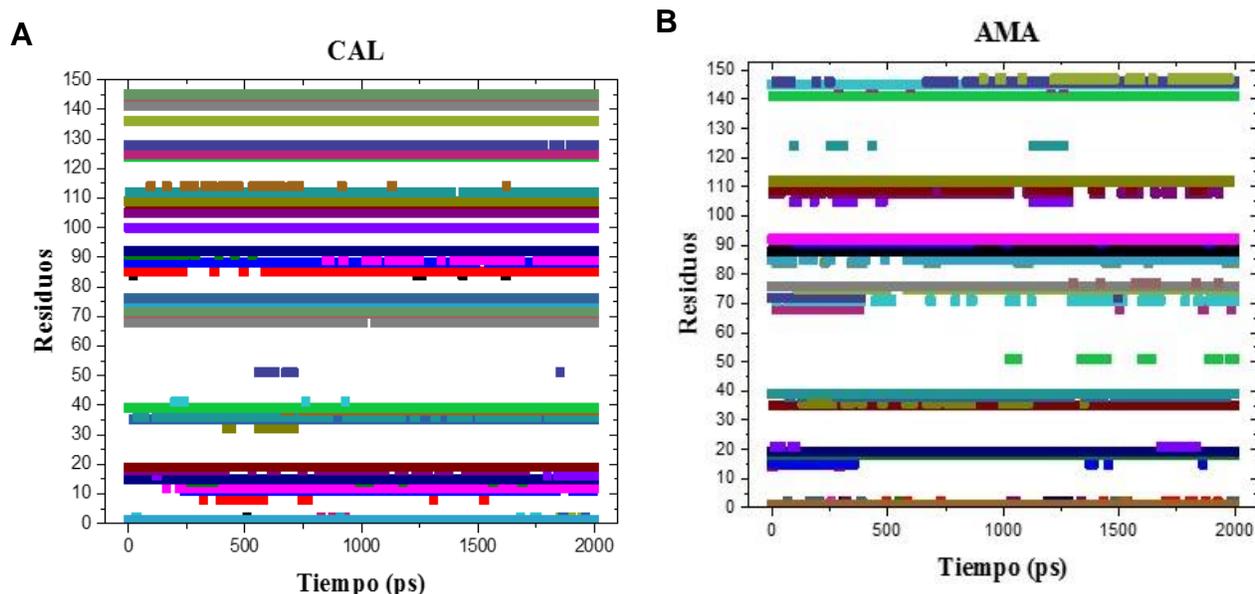


Figura 21. Variación del número de residuos de los fármacos CAL y AMA (A y B) que interactúan con el biosensor respecto al tiempo.

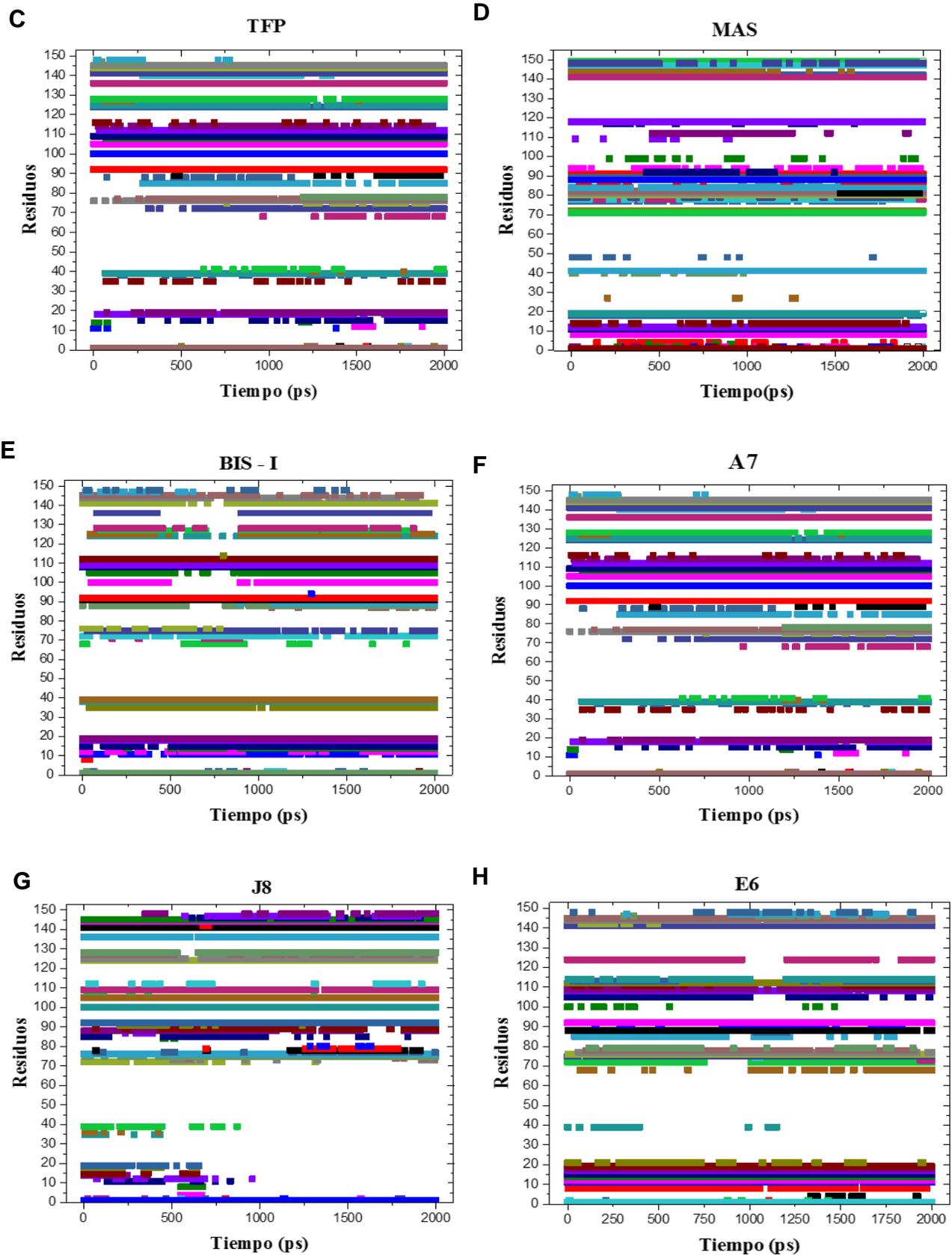


Figura 22. Variación del número de residuos de los fármacos TFP (control positivo), MAS, BIS I, A7, J8, E6 (C-H) que interaccionan con el biosensor respecto al tiempo.

CONCLUSIONES

Los estudios de interacción proteína-ligandos son las bases moleculares de la especificidad, por lo que son de gran interés para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Uno de los problemas inherentes para entender las interacciones moleculares es su complejidad dinámica, para ello las herramientas computacionales como la DM, que nos permite analizar los movimientos y las compensaciones energéticas entre la entropía y la entalpía, para tratar de explicar cómo se comunican entre sí las regiones de una proteína y la regulación energética de unión de ligandos a las mismas. Otra de las técnicas disponibles para este tipo de estudios, como método directo es el uso de los biosensores, los cuales presentan diversas ventajas sobre otras técnicas indirectas como los ensayos enzimáticos, ya que estos últimos pueden presentar resultados falsos positivos. En este trabajo estudiamos la interacción de seis compuestos reportados en la literatura como inhibidores de la proteína CaM utilizando un biosensor de CaM fluorescente y herramientas de modelaje molecular (Docking y DM). Los análisis de las trayectorias y las determinaciones de los parámetros termodinámicos teóricos nos reflejan una parte del proceso de unión de los compuestos y esta información puede ser de ayuda para el desarrollo y diseño de nuevos blancos farmacológicos direccionados a inhibir a la CaM. El biosensor utilizado nos permitió obtener cinco K_{ds} en función del grado de saturación de calcio para cada compuesto, reportado por primera vez para estos. La relación entre el grado de afinidad (K_d) y el número de equivalentes de Ca^{2+} nos permite extrapolar y relacionar estos resultados con los efectos farmacológicos de los fármacos y prototipos de fármacos estudiados, además de los posibles efectos adversos. En el caso del compuesto **A7** los estudios de unión con el biosensor *hCaM M124C-mBBR* presuntamente nos indican no se une de forma directa a la CaM, si no que puede inhibir a algún complejo CaM-proteína ya que en datos reportados en la literatura estos compuestos muestran inhibir reacciones enzimáticas con la cual fueron ensayados. Finalmente, los resultados de los estudios teóricos (DM) son consistentes y complementarios con los resultados experimentales.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos tanto de los métodos teóricos como experimental; y como una forma de enriquecer y complementar la información obtenida se proponen varios puntos a realizar:

- 1) Realizar ensayos enzimáticos para el fármaco **A7** con la finalidad de establecer que complejo CaM-Proteína inhibe de manera.
- 2) Utilizar una técnica alternativa directa de unión entre el ligando y CaM. Por ejemplo, la Calorimetría de titulación Isotérmica (ITC) para aquellos compuestos que sean solubles en los amortiguadores adecuados para esta técnica.
- 3) Con respecto al método teórico se propone aumentar el tiempo de las DM, con la finalidad de explorar más estados y obtener mejores interpretaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schreiber, G. and A.E. Keating, *Protein binding specificity versus promiscuity*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(1): p. 50-61.
2. Fromer, M. and J.M. Shifman, *Tradeoff Between Stability and Multispecificity in the Design of Promiscuous Proteins*. Plos Computational Biology, 2009. **5**(12).
3. Bjork, J., S. Lundberg, and L. Backman, *Characterization of the binding of calmodulin to non-erythroid spectrin*. Eur J Cell Biol, 1995. **66**(2): p. 200-4.
4. Chin, D. and A.R. Means, *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(8): p. 322-8.
5. O'Day, D.H., *CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins*. Cell Signal, 2003. **15**(4): p. 347-54.
6. Tang, J., et al., *Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21303-10.
7. Cho, H.J., et al., *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 599-604.
8. Aramburu, J., A. Rao, and C.B. Klee, *Calcineurin: from structure to function*. Curr Top Cell Regul, 2000. **36**: p. 237-95.
9. Kurokawa, H., et al., *Target-induced conformational adaptation of calmodulin revealed by the crystal structure of a complex with nematode Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase kinase peptide*. J Mol Biol, 2001. **312**(1): p. 59-68.
10. Wang, H. and D.R. Storm, *Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(3): p. 463-8.
11. Eu, J.P., et al., *Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(10): p. 1079-84.
12. Huber, P.A., et al., *Multiple-sited interaction of caldesmon with Ca(2+)-calmodulin*. Biochem J, 1996. **316 (Pt 2)**: p. 413-20.
13. Matsuoka, Y., C.A. Hughes, and V. Bennett, *Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25157-66.
14. Elizabeth D. Apel, D.W.L., Ruti H. Clark, Edwin G. Krebs, Daniel R. Storm, *Phosphorylation of neuromodulin (GAP-43) by casein kinase II - Identification of*

- phosphorylation sites and regulation by calmodulin*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266 (16)**: p. 10544-10551.
15. Youn, H.D., et al., *Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2*. Science, 1999. **286(5440)**: p. 790-3.
 16. Yamamoto, Y., Y. Sokawa, and S. Maekawa, *Biochemical evidence for the presence of NAP-22, a novel acidic calmodulin binding protein, in the synaptic vesicles of rat brain*. Neurosci Lett, 1997. **224(2)**: p. 127-30.
 17. Moreno, C.S., et al., *WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2000. **275(8)**: p. 5257-63.
 18. Smith, M.L., et al., *Identification of a neuronal calmodulin-binding peptide, CAP-19, containing an IQ motif*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **62(1)**: p. 12-24.
 19. Martin-Nieto, J. and A. Villalobo, *The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site*. Biochemistry, 1998. **37(1)**: p. 227-36.
 20. Sobieszek, A., et al., *Purification and characterization of a kinase-associated, myofibrillar smooth muscle myosin light chain phosphatase possessing a calmodulin-targeting subunit*. J Biol Chem, 1997. **272(11)**: p. 7027-33.
 21. Torok, K., K. Stauffer, and W.H. Evans, *Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains*. Biochem J, 1997. **326 (Pt 2)**: p. 479-83.
 22. Lodge, A.P., et al., *Identification of chURP, a nuclear calmodulin-binding protein related to hnRNP-U*. Eur J Biochem, 1999. **261(1)**: p. 137-47.
 23. Kakkar, R., et al., *In vitro phosphorylation of bovine cardiac muscle high molecular weight calmodulin binding protein by cyclic AMP-dependent protein kinase and dephosphorylation by calmodulin-dependent phosphatase*. Mol Cell Biochem, 1997. **177(1-2)**: p. 215-9.
 24. Klaerke, D.A., et al., *Identification of beta2-glycoprotein I as a membrane-associated protein in kidney: purification by calmodulin affinity chromatography*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1339(2)**: p. 203-16.
 25. Xu, X.Z., et al., *Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission*. J Biol Chem, 1998. **273(47)**: p. 31297-307.
 26. WenQiang, T., et al., *Extracellular calmodulin-binding proteins in body fluids of animals*. J Endocrinol, 1997. **155(1)**: p. 13-7.

27. Trejo, R. and G. Delhumeau, *Calmodulin content, Ca²⁺-dependent calmodulin binding proteins, and testis growth: identification of Ca²⁺-dependent calmodulin binding proteins in primary spermatocytes*. Mol Reprod Dev, 1997. **48**(1): p. 127-36.
28. Craig, R. and C. Norbury, *The novel murine calmodulin-binding protein Sha1 disrupts mitotic spindle and replication checkpoint functions in fission yeast*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 24)**: p. 3609-19.
29. Joyal, J.L., et al., *Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28183-6.
30. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, *Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms*. Cell, 2002. **108**(6): p. 739-42.
31. Carafoli, E., *Calcium signaling: a tale for all seasons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1115-22.
32. Bitar, K.N., *Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins*. Am J Med, 2003. **115 Suppl 3A**: p. 15S-23S.
33. Schumacher, M.A., M. Crum, and M.C. Miller, *Crystal structures of apocalmodulin and an apocalmodulin/SK potassium channel gating domain complex*. Structure, 2004. **12**(5): p. 849-60.
34. Houdusse, A., et al., *Crystal structure of apo-calmodulin bound to the first two IQ motifs of myosin V reveals essential recognition features*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(51): p. 19326-31.
35. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
36. Weiss, B., W.C. Prozialeck, and T.L. Wallace, *Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications*. Biochem Pharmacol, 1982. **31**(13): p. 2217-26.
37. K., A., *Essencial hypertension: calcium mechanism and treatment*. Japan: Springer, 1998.
38. Hegemann, L., et al., *Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin*. Eur J Pharmacol, 1991. **207**(1): p. 17-22.
39. Vertessy, B.G., et al., *Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies*. Biochemistry, 1998. **37**(44): p. 15300-10.

40. I. Pala, A.S., et al., *Modulation of Calmodulin and Protein Kinase C Activities by Penicillium Mycotoxins*. International Journal of Toxicology, 1999. **18**: p. 91-96.
41. Nishino, H., et al., *Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein*. Experientia, 1984. **40**(2): p. 184-5.
42. J.Goto, *A New Inhibitor of Calcium and Calmodulin-Dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase from Streptosporangium vulgare*. Agriculture And Biological Chemistry, 1987. **51**: p. 3003-3009.
43. Ayres, D.C. and J.D. Loike, *Lignans : chemical, biological, and clinical properties*. Chemistry and pharmacology of natural products. 1990, Cambridge England ; New York: Cambridge University Press. xix, 402 p.
44. Rojas, S., et al., *Calmodulin inhibitors from Leucophyllum ambiguum*. J Nat Prod, 2003. **66**(2): p. 221-4.
45. Mata, R., et al., *Phytotoxic compounds from Flourensia cernua*. Phytochemistry, 2003. **64**(1): p. 285-91.
46. Valencia-Islas, N., et al., *Phytotoxic compounds from Prionosciadium watsoni*. J Nat Prod, 2002. **65**(6): p. 828-34.
47. Nakanishi, S., et al., *Calmodulin antagonistic action of KS-504a, a novel metabolite of the fungus Mollisia ventosa*. Agric Biol Chem, 1990. **54**(10): p. 2697-702.
48. Macias, M., et al., *Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus Guanomyces polythrix*. Phytochemistry, 2001. **58**(5): p. 751-8.
49. Rivero-Cruz, J.F., et al., *A new phytotoxic nonenolide from Phoma herbarum*. J Nat Prod, 2003. **66**(4): p. 511-4.
50. R., G.A.y.D., *In Protein Structure and Function*. NewSciencePress, NY, 2003. **1er Ed**.
51. Maxwell D. Cummings, R.L.D., Alan C. Gibbs, Venkatraman Mohan, and Edward P. Jaeger, *Comparison of Automated Docking Programs as Virtual Screening Tools*. J. Med. Chem., 2005. **48**: p. 962-976.
52. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
53. Alder BJaW, T.E., *Phase transition for a hard sphere system*. J Chem Phys, 1957. **27:1208**.
54. Romelia Salomon-Ferrer, D.A.C.a.R.C.W., *An overview of the Amber biomolecular simulation package*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. **00**: p. 1-13.

55. Ravindranathan, K.P., E. Gallicchio, and R.M. Levy, *Conformational equilibria and free energy profiles for the allosteric transition of the ribose-binding protein*. J Mol Biol, 2005. **353**(1): p. 196-210.
56. Figueroa, M., et al., *Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2011. **26**(3): p. 378-85.
57. Abraham Madariaga-Mazón, M.G.-A.y.R.M., *CALMODULIN: BIOCHEMICAL PROMISCUITY AND ITS BENEFITS*. MENSAJE BIOQUÍMICO, 2016. **VOL. XL**: p. 305-324.
58. Wilkins, E. and P. Atanasov, *Glucose monitoring: state of the art and future possibilities*. Med Eng Phys, 1996. **18**(4): p. 273-88.
59. Yang, S., P. Atanasov, and E. Wilkins, *A glucose biosensor based on an oxygen electrode: in-vitro performances in model buffer solution and in blood plasma*. Biomed Instrum Technol, 1996. **30**(1): p. 55-61.
60. Patel Riddhi, R.A., *Biosensors: A Sensitive Strategy to Detect Glucose in Body Fluids*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2015. **6**(1): p. 25-31.
61. Thevenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosens Bioelectron, 2001. **16**(1-2): p. 121-31.
62. Evtugyn, G., *Biosensors: Essentials*. India: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014. **Vol. 84**: p. 265.
63. Gonzalez-Andrade, M., et al., *Development of the fluorescent biosensor hCalmodulin (hCaM)L39C-monobromobimane(mBBr)/V91C-mBBr, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium*. J Med Chem, 2011. **54**(11): p. 3875-84.
64. Alaimo A, M.C., Areso P, Aloria K, Millet O, Villarroel A, *The use of dansyl-calmodulin to study interactions with channels and other proteins*. Springer Science, 2013. **998**.
65. Daunert, E.D.S.K.D.S., *Drug detection based on the conformational changes of calmodulin and the fluorescence of its enhanced green fluorescent protein fusion partner*. Elsevier B.V, 2003. **500**: p. 237–245.
66. Velazquez-Lopez, I., et al., *Development of new hCaM-Alexa Fluor(R) biosensors for a wide range of ligands*. Anal Biochem, 2017. **516**: p. 13-22.

67. Gonzalez-Andrade, M., et al., *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein*. Anal Biochem, 2009. **387**(1): p. 64-70.
68. David P. Moore, J.W.J., *Manual de psiquiatría médica*. 2005, España: Elsevier 560.
69. Hernandez Felix, L.J.J.A., Jesus, *GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2013. **33**(1): p. 141-144.
70. Itoh, H. and H. Hidaka, *Direct interaction of calmodulin antagonists with Ca²⁺/calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase*. J Biochem, 1984. **96**(6): p. 1721-6.
71. LO Dewhurst, J.G., IG Rennie and S MacNeill, *Tamoxifen, 17 b-estradiol and the calmodulin antagonist J8 inhibit human melanoma cell invasion through fibronectin*. British Journal of Cancer 1997. **75**(6): p. 860-868
72. M.P. Caulfield, J.R., J.A. Sim, D.A. Brown, S. Mac Neil and G.M. Blackburn *The naphthalenesulphonamide calmodulin antagonist W7 and its 5-iodo-1-C8 analogue inhibit potassium and calcium currents in NG 108-15 neuroblastoma x glioma cells in a manner possibly unrelated to their antagonism of calmodulin* Neuroscience Letters, 1991. **125**: p. 57-61.
73. Zhuo-Yi Hu, Y.-S.G., Wen-Long Huang, *Interaction of berbamine compound E6 and calmodulin-dependent myosin light chain kinase*. Elsevier 1992. **Volume 44**(Issue 8): p. 1543-1547.
74. Córdoba, M.V., *Virología médica*, ed. Edición. 2016, El manual moderno y Universidad Nacional de Colombia. 780.
75. Méndez Antolín, L.H.B., Agustín y Baamonde Arbaiza, Ana Isabel, *Fármacos inhibidores de calmodulina para su uso como analgésicos*, UNIVERSIDAD DE OVIEDO Plaza del Riego, (Edificio Hist'orico) 33003 Oviedo, Asturias, ES, Editor. 2000: España. p. 1-13.
76. E., G.M., *Calmodulin in neurotransmitter and hormone action*. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1993. **32**: p. 45-70.
77. YasuhiroOkada, T.M., *NMDA receptor, protein kinase C and calmodulin system participate in the long-term potentiation in guinea pig superior colliculus slices*. Elsevier 1993. **605**(2): p. 287-292.

78. Barnette M. S., D.R., Weiss B., *Inhibition of calmodulin activity by insect venom peptides*. *Biochem. Pharmacol*, 1983. **32**: p. 2929-2933.
79. Miller, D.M., 3rd, et al., *Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(22): p. 13665-72.
80. Ohki, S.Y., et al., *Mastoparan binding induces Ca(2+)-transfer between two globular domains of calmodulin: a 1H NMR study*. *J Biochem*, 1991. **110**(5): p. 737-42.
81. Huerta-Bahena, J., et al., *Mol. Pharmacol*. 1983. **23**: p. 67-70.
82. Molday, Y.-T.H.a.R.S., *Interaction of Calmodulin with the Cyclic GMP-gated Channel of Rod Photoreceptor Cells: modulation of activity, affinity purification, and localization*. *The Journal of biological chemistry*, 1994. **Vol. 269, No. 47**: p. 29765-29770.
83. C. Courage, J.B., and A. Gescher, *Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation*. *British Journal of Cancer*, 1995. **71**: p. 697-704.
84. Zoltan Kiss , H.P., Wayne H. Anderson *The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine* *Biochimica et Biophysica Acta* 1995. **1265**(1): p. 93-95.
85. al., Z.-Y.H.e., *Biochem. Pharmacol Biochem Behav*, 1992. **44**: p. 1543-1549.
86. K., G., *Comparison of the calmodulin antagonists compound 48/80 and calmidazolium*. *Biochem. J.*, 1983. **216**(3): p. 611-616
87. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy* New York 2006. **Third Edition**.
88. Olsen, E.D., *Métodos ópticos de análisis: Espectrofotometría ultravioleta y visible*. Edit. Reverté, S. A. , 1990. **1**: p. 95-97.

APÉNDICE

Estudio teórico

I. Construcción de estructuras pdb

- 1) Mediante el programa Hyperchem Professional en Windows realizar con el uso de las herramientas del programa antes descrito las estructuras de cada prototipo de fármaco y fármacos para CaM.
- 2) Optimizar cada estructura, adicionando iones Hidrógeno y relajando la estructura.
- 3) Guardar archivos en formato *.hin* y *.pdb*

II. Obtención de la proteína CaM

- 1) Mediante el uso del sistema operativo GNU/Linux-Ubuntu, abrir una terminal

TERMINAL 1

- 2) abrir el programa Pymol.
- 3) Seleccionar plugin → `pdb load service` → seleccionar la proteína CaM la cual está codificada como *2o60* → enter
- 4) Guardar la proteína como *proteína 2o60.pdb*

III. Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)

NOTA: el programa amber no reconoce acentos ortográficos por lo que no deben considerarse al crear carpetas, guardar nombres de archivos, etc.

- Crear molécula del fármaco en el programa HyperChem Professional.
- Guardar molécula en formato *pdb*.

TERMINAL 1

- Crear carpeta (`mkdir nombre de la carpeta`) que contenga tanto el ligando *TFP.pdb* como la proteína *2o60.pdb*.
- `adt`

PROGRAMA AutoDockTools ADT

- File → Read molecule → *2o60.pdb* → OK → Desactivar formato en líneas → Activar formato en cintas.
- Ligand → Input → Open → Cambio formato a *pdb* → Abrir ligando *TFP.pdb* → OK
- Ligand → Aromatic Carbons → Aromatic Criterion → *[7.5]* → OK
- Ligand → Output → Save as PDBQT → OK → Save (sin cambiar el nombre que aparece.*pdbqt*)

- Grid → Macromolecule → Choose → 2o60 → Select → OK → Save → Ca Ca Ca Ca
- Grid → Set Map Types → Choose Ligand → TFP → Select
- Grid → Grid Box → 100, 100, 100 → File {close save 1°}
- Grid → Output → Save GPF → 2o60-TFP.gpf

TERMINAL 2

- ls (verificar que estén los archivos antes creados)
- autogrid4 -p 2o60-TFP.gpf

PROGRAMA ADT

- Docking → Macro → Set Rigid → Escoger 2o60.pdb
- Docking → Ligand → Choose → TFP.pdb → Accept
- Docking → Search Parameters → Genetic Algorithms → 300
- Docking → Output → Lamarkian → 2o60-TFP.dpf → Save

TERMINAL 2

- autodock4 -p 2o60-TFP.dpf -l TFP.dlg & top

IV. Preparación del complejo para DM

TERMINAL 1

1. Abrir archivo del complejo proteína-ligando con refinamiento (2do docking): 2o60-TFP-2.pdb
2. Crear carpeta nueva: mkdir dinamicas → Copiar archivo 2o60- TFP -2.pdb y 2o60.pdb dentro de la carpeta de dinámicas
3. Abrir programa pymol: \$pymol 2o60-TFP-2.pdb 2o60.pdb

EN PYMOL

4. Para verificar la posición del fármaco y si es correcta su estructura.
All → Present → Publication
5. Subir a la página (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>) el fármaco obtenido del refinamiento (TFP-2.pdb).
6. Obtener acceso proporcionando cuenta de correo electrónico, posterior a ello te mandan un código de acceso, el cual te permite revisar hasta 5 estructuras de los archivos que se crearon en formato pdb por día.

7. Subir archivo generado en el acoplamiento molecular TFP -2.pdb, desactivando quiralidad y EM.
8. Copiar archivo resultante en formato SYBYL2 (All Hydrogens) y guardar como TFP-2.mol2

V. Ejecución de DM

TERMINAL 1

9. Ejecutar el programa antechamber

```
$ antechamber -i TFP-2.mol2 -fi mol2 -o TFP.mol2 -fo mol2 -rn TFP -nc -s 2
```

10. Obtener la topología frcmod para el fármaco con:

```
$ parmchk -i TFP.mol2 -f mol2 -o TFP.frcmod
```

ABRIR TERMINAL 2

11. Generar los archivos de entrada para la dinámica

```
$ tleap -s -f leaprc.ff99SB
```

```
> source leaprc.gaff
```

```
> list
```

```
> TFP=loadmol2 TFP.mol2
```

```
> list (verificar que se encuentre el modulo TFP en la lista)
```

```
> loadamberparams TFP.frcmod
```

```
> check TFP
```

```
> savepdb TFP TFP-amber.pdb
```

TERMINAL 1

12. Buscar el archivo TFP-amber.pdb

13. Abrir con un editor de textos los archivos en formato pdb 2o60.pdb y el archivo TFP-amber.pdb

14. Copiamos todo el archivo TFP-amber.pdb al archivo 2o60.pdb, al terminar los Ca^{2+} , borrar END, colocar TER.

15. Guardar como 2o60-TFP.pdb

TERMINAL 1

16. Ejecutamos el programa pdb4amber

```
$pdb4amber -i 2o60-TFP.pdb -o 2o60-TFP-amber.pdb
```

17. En un editor de texto abrir 2o60-TFP-amber.pdb, seleccionar el ligando y agregar END al final y guardar ese archivo como 2o60-amber.pdb

18. En una hoja nueva pegar el ligando y guardar como TFP-amber.pdb

TERMINAL 2

19. Generar los archivos de topología y coordenadas del complejo 2o60-TFP-amber.pdb en tleap

```
> complex=loadpdb 2o60-TFP.pdb
```

```
> list
```

```
> check complex
```

```
> desc complex.145
```

```
> desc complex.145.1
```

```
> set complex.145.1 charge +2
```

```
> set complex.146.1 charge +2
```

```
> set complex.147.1 charge +2
```

```
> set complex.148.1 charge +2
```

```
> set complex.148.1 type C0
```

```
> set complex.147.1 type C0
```

```
> set complex.146.1 type C0
```

```
> set complex.145.1 type C0
```

```
> check complex
```

20. Salvamos la topología y coordenadas del complejo sin solvatar

```
> saveamberparm complex 2o60-TFP.top 2o60-TFP.xyz
```

TERMINAL 1

21. verificar que los archivos con topología .top y .xyz se hayan generado.

TERMINAL 2

22. Neutralizamos el sistema proteína-ligando

> addions complex Na+ 0

23. Solvamos el sistema proteína-ligando

> solvateoct complex TIP3PBOX 12.0

24. Salvamos la topología y coordenadas del complejo

> saveamberparm complex 2o60-TFP-WAT.top 2o60-TFP-WAT.xyz

25. Cargamos la proteína sin ligando

> protein=loadpdb 2o60.pdb

> list

> check protein

> set protein.149.1 charge py+2

> set protein.146.1 charge +2

> set protein.147.1 charge +2

> set protein.148.1 charge +2

> set protein.149.1 type C0

> set protein.146.1 type C0

> set protein.147.1 type C0

> set protein.148.1 type C0

> check protein

26. Salvamos la topología y coordenadas de la proteína

> saveamberparm protein 2o60.top 2o60.xyz

27. Salimos del tleap

> quit

VI. Minimización, calentamiento, equilibrio, densidad – súpercomputadora Miztli de la UNAM

Dentro del sistema operativo Ubuntu, entrar a supercómputo

TERMINAL 1

1) ir a la carpeta donde se encuentra el archivo *vpn-ubuntu.txt*

>*gedit vpn-ubuntu.txt* & → enter

>*sudo openvpn – config client.ovpn* → enter

>escribir la contraseña del equipo

>escribir el usuario de supercómputo y password

TERMINAL 2

>ssh mga@132.247.177.99

>escribir el password

- 2) Una vez dentro de supercómputo, crear una carpeta para el ligando en estudio:

>mkdir 2o60-ligando1 → enter

>cd 2o60-ligando1 → enter

>ls → enter

>pwd → enter (nos dará la ruta)

TERMINAL 3

- 3) Dirigirnos a la carpeta donde se encuentran los archivos de los ligandos o fármacos prototipos, procedemos a subir la información generada:

>scp * mga@132.247.177.99:/ (colocar la ruta del paso 3) → enter

>escribir el password (se subirán los archivos a supercómputo el 100%)

TERMINAL 2

- 4) Ir a la carpeta de archivos y subir la minimización:

>ls → enter

>module load amber/14

>module load cuda

>module list

>bsub < min-9_gpu.bsub → enter

>bjobs → enter

>ls → enter

>tail 2o60-ligando1-WAT-min.out

>ls → enter

Esperar a que se encuentre el archivo de salida para continuar el calentamiento.

>bsub < heat-9_gpu.bsub → enter

>bjobs → enter

>ls → enter

Esperar a que se encuentre el archivo de salida para continuar la densidad.

```
>bsub < density-9_gpu.bsub → enter
```

```
>bjobs → enter
```

```
>ls → enter
```

Esperar a que se encuentre el archivo de salida para continuar el equilibrio.

```
>bsub < equil-9_gpu.bsub → enter
```

```
>bjobs → enter
```

```
>ls → enter
```

Esperar a que se encuentre el archivo de salida para continuar con la producción.

```
>bsub < prod-9_gpu.bsub → enter
```

```
>bjobs → enter
```

```
>ls → enter
```

5) Esperar a que se encuentre el archivo de salida para continuar Cerrar terminal

6) En súpercomputo entrar a la carpeta de un ligando donde se encuentran los archivos de éste y crear una carpeta de análisis:

```
>mkdir análisis → enter
```

```
>cd análisis → enter
```

```
>$cp ../../2o60-ligando/análisis/mmpbs*. → enter (copiar todos los archivos de tipo .mmpbs a la carpeta de análisis)
```

```
>ls → enter
```

7) Dentro de la carpeta de análisis correr la dinámica:

```
>ls → enter
```

```
>mmpbsa_gn_nmode.in mmpbs_q_4p.bsub → enter
```

```
>$vi mmpbs_q_4p.bsub → enter
```

```
>i (Cambiar los nombres de los archivos de acuerdo al nombre que se le asignó anteriormente a cada complejo).
```

Presionar la Tecla de ESC y escribir:

```
>:wq → enter
```

```
>module load amber/14
```

```
>module load cuda
```

```
>module list
```

```
>ls → enter
```

```
>bsub < mmpbs_q_4p.bsub
```

```
>ls → enter  
>tail -f progress.cat  
>quit
```

VII. Análisis de trayectorias

- 1) Dentro del sistema operativo Ubuntu, entrar a supercómputo

TERMINAL 1

- 2) En el programa de VMD seleccionar:

File → New molecule, Browse → ligando1-WAT.top → OK → tipo → amber7parm
→ load

Browse → 2o60-ligando1-WAT-prod.mdcrd → OK

Tipo → amber coordinates with periodic box → load

Graphics → Representations

Drawing → New Cartoon

Crate Rep → selections → keyword → resname → Apply

Drawing method → bonds → coloring → color ID

VMD main → save coordinates

```
>scanDtraj
```

```
>scanDtraj {matriz-ama.dat} {protein and (some residue as {within 4.0 of {resname  
AMA}})} {protein} {resid} {top} → enter (reemplazar AMA por el ligando en  
estudio).
```

VIII. Gráficas completas de los espectros de fluorescencia obtenidos a partir de la titulación del biosensor hCaM-m1124C mBBR con los diferentes fármacos y prototipos de fármacos a diferentes equivalentes de Ca^{2+} .

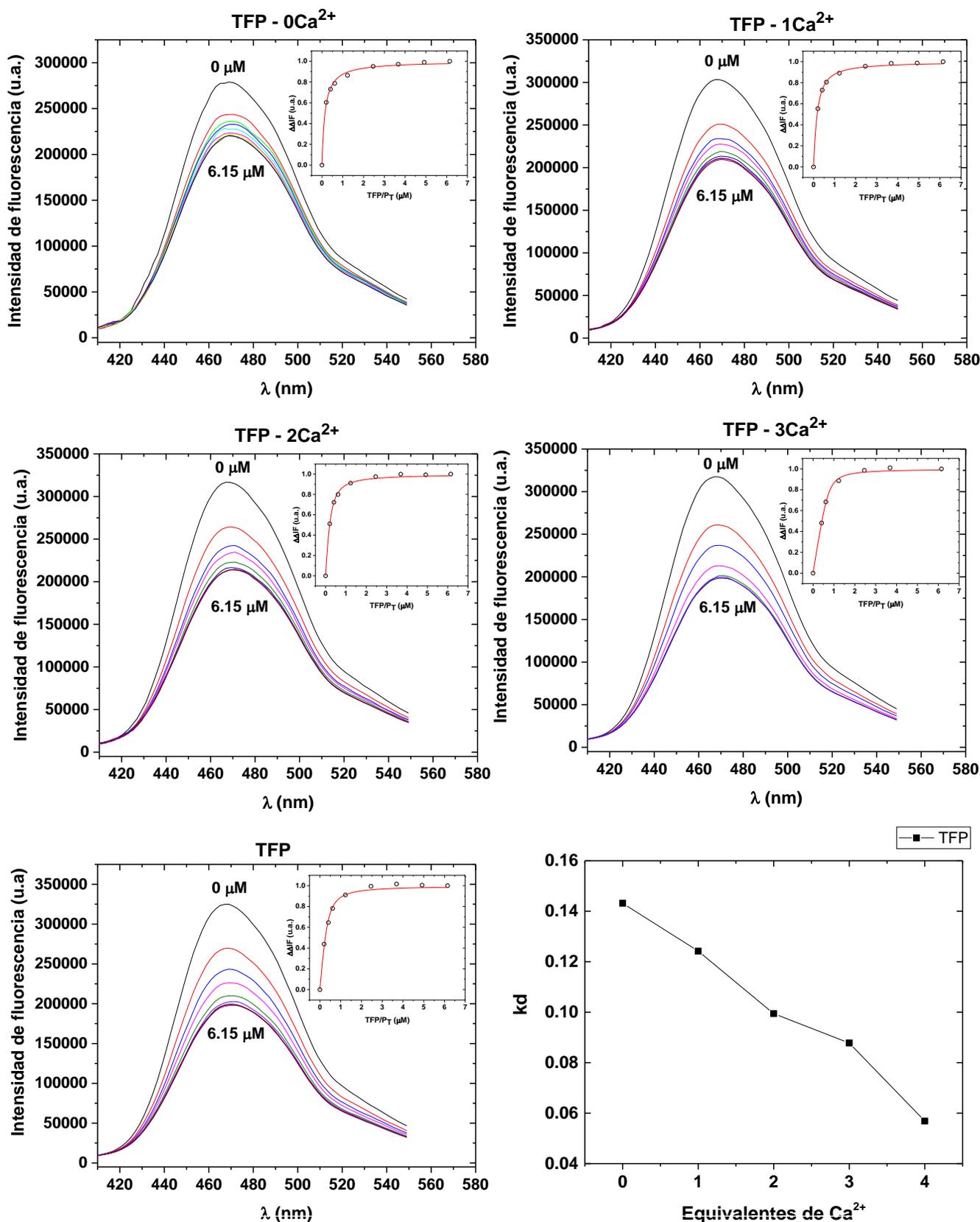


Figura 1S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con TFP. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de TFP, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca²⁺ a una concentración de 10 μM de CaCl₂, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de TFP, se fueron adicionando 0.683 μL (1 μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final de 2 mL.

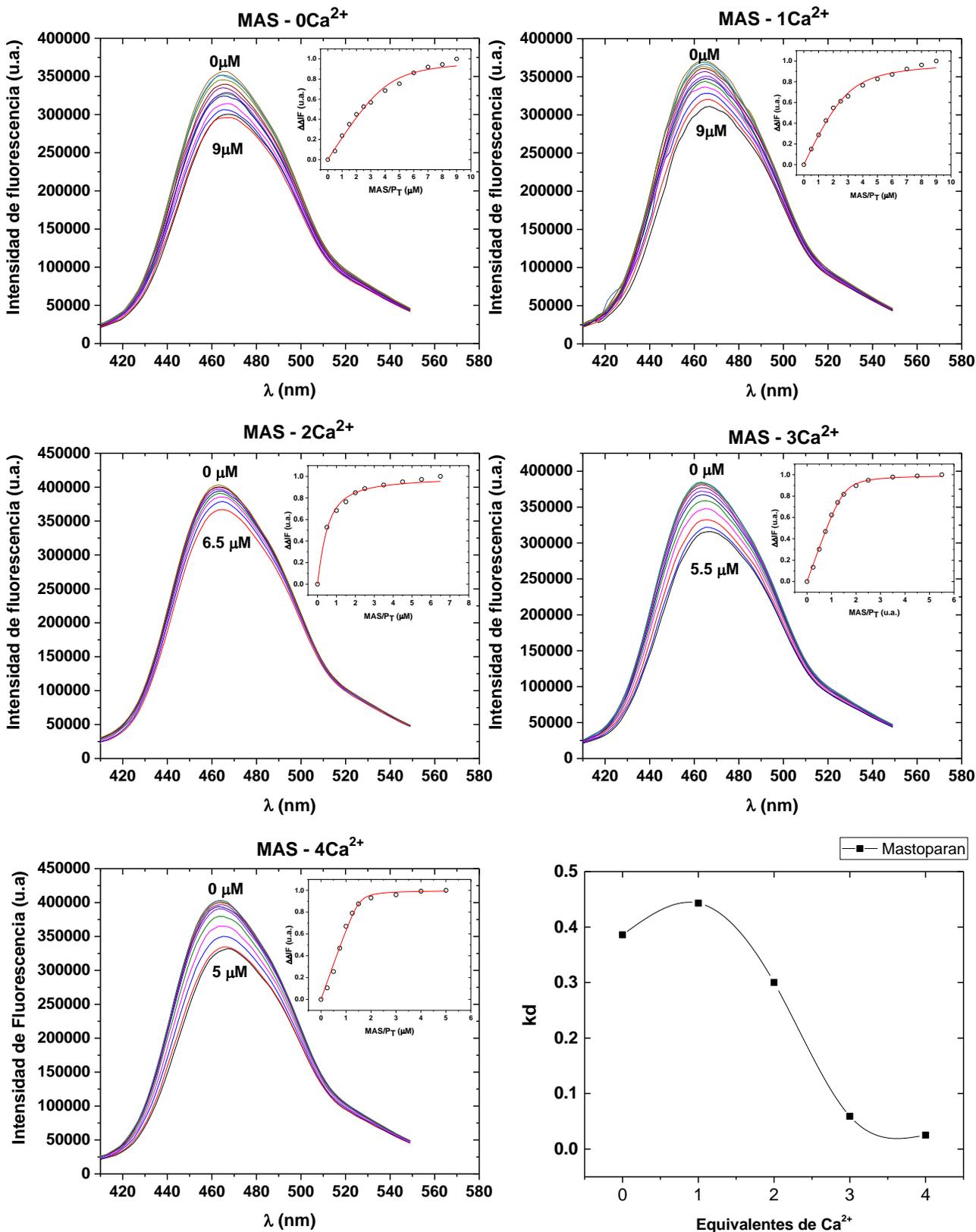


Figura 2S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con MAS. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de MAS, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca^{2+} a una concentración de 10 μM de CaCl_2 , en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 $^\circ\text{C}$ y agitación constante. A partir de la solución de MAS, se fueron adicionando 0.683 μL (1 μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final de 2 mL.

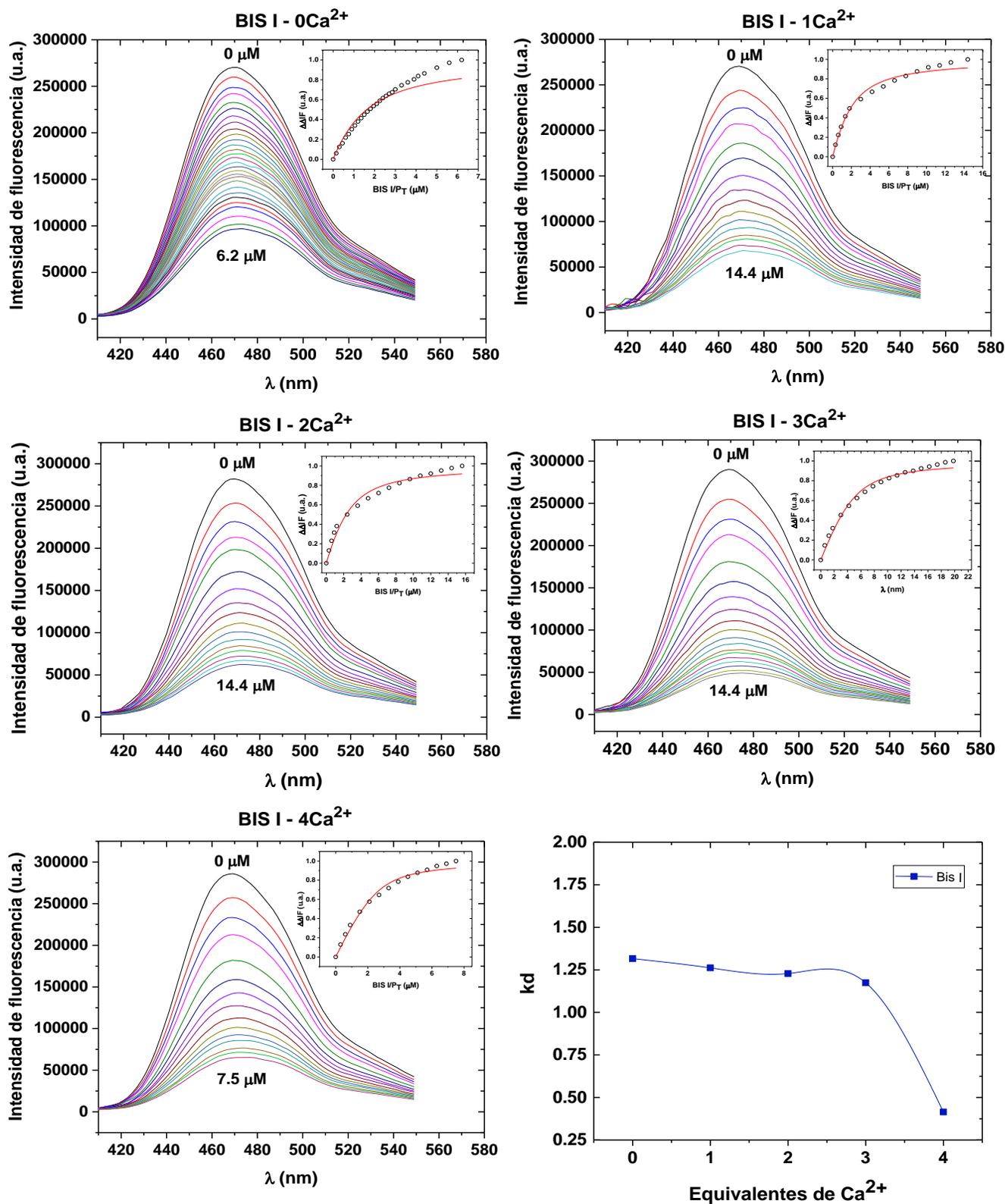


Figura 3S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con BIS I. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de BIS I, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca^{2+} a una concentración de 10 μM de CaCl_2 , en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 $^\circ\text{C}$ y agitación constante. A partir de la solución de BIS I, se fueron adicionando 0.683 μL (1 μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final

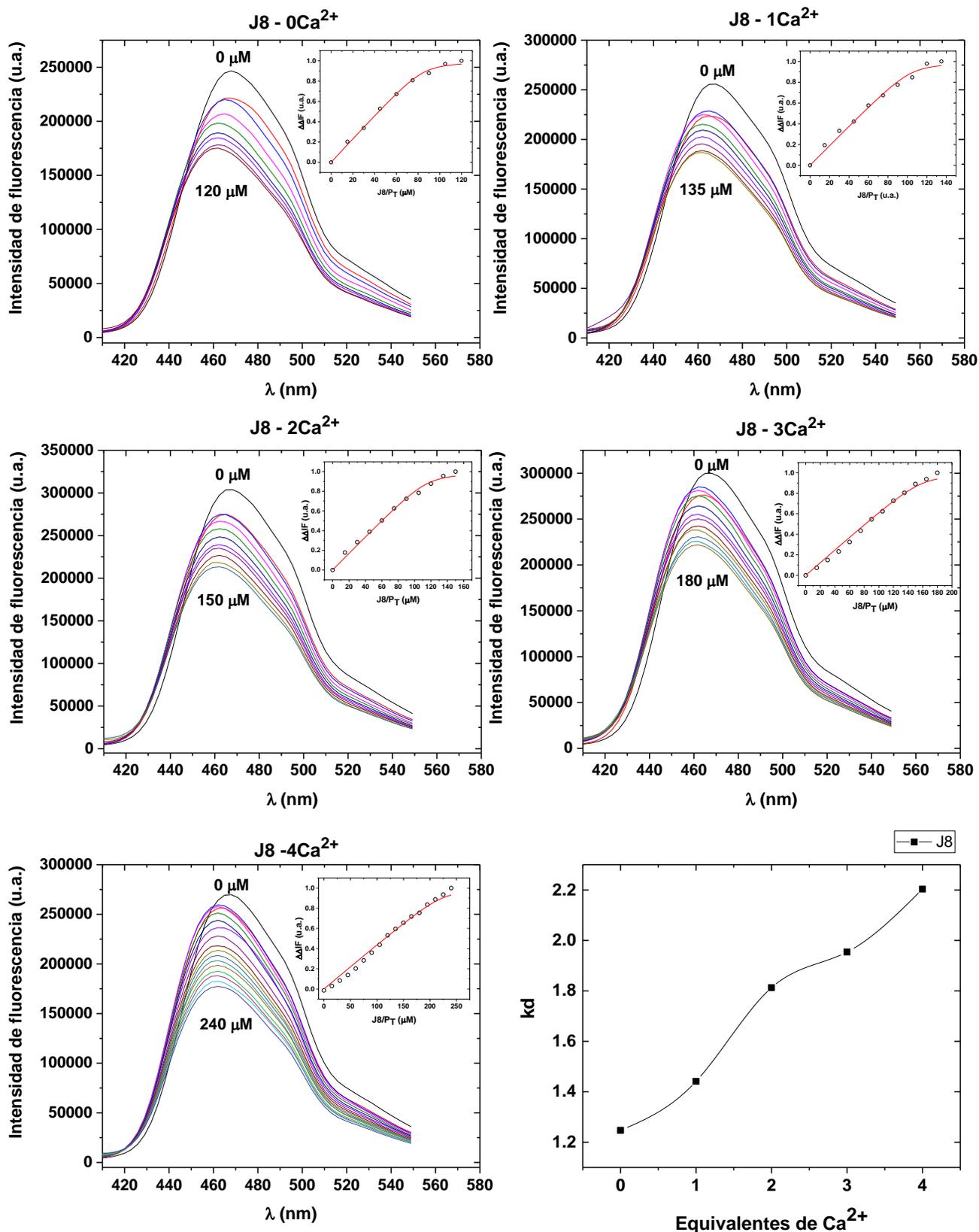


Figura 4S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con J8. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de J8, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca²⁺ a una concentración de 10 μM de CaCl₂, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de J8, se fueron adicionando 0.683 μL (1μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final de 2 mL.

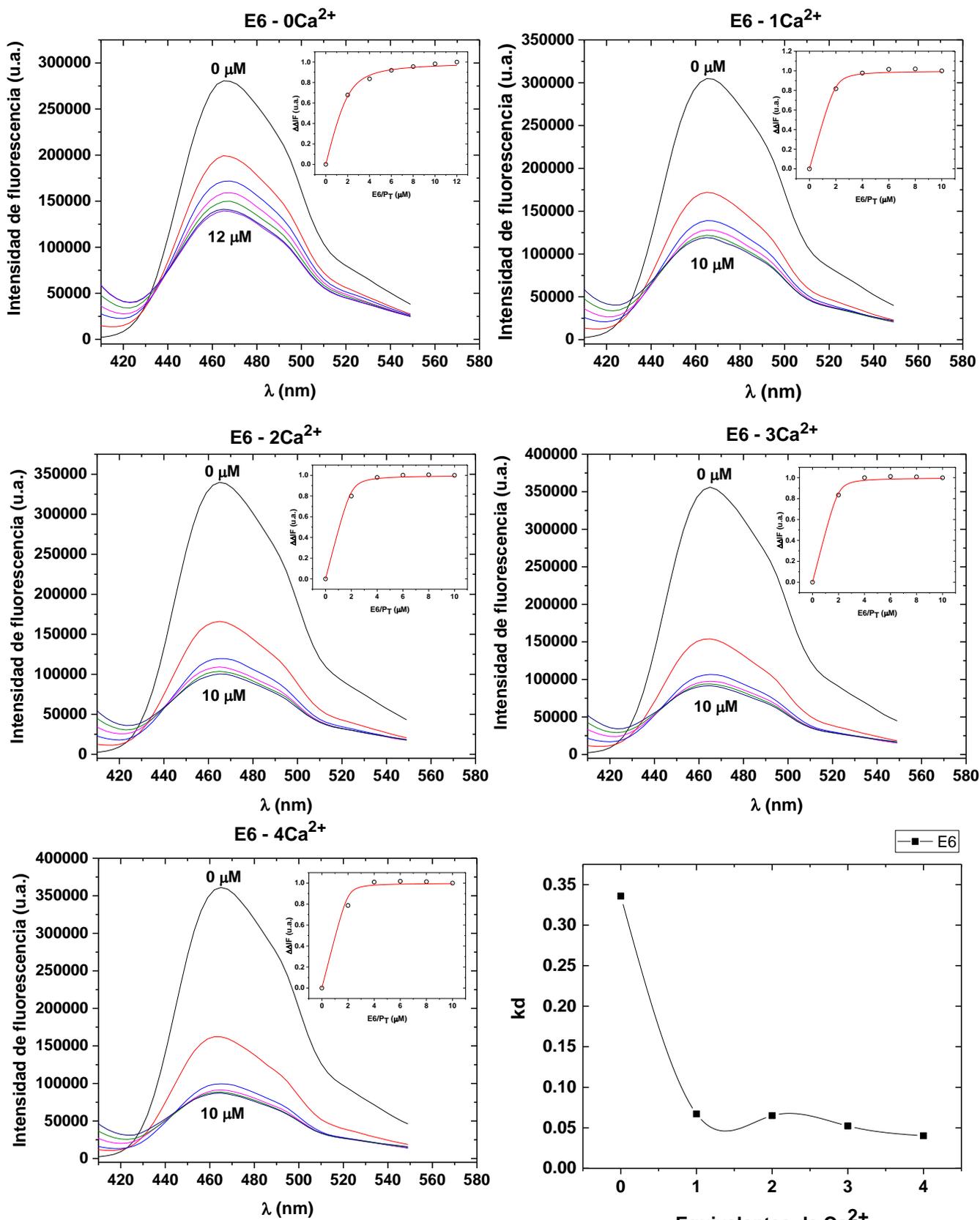


Figura 5S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con E6. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de E6, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca²⁺ a una concentración de 10 μM de CaCl₂, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de E6, se fueron adicionando 0.683 μL (1 μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final de 2 ml

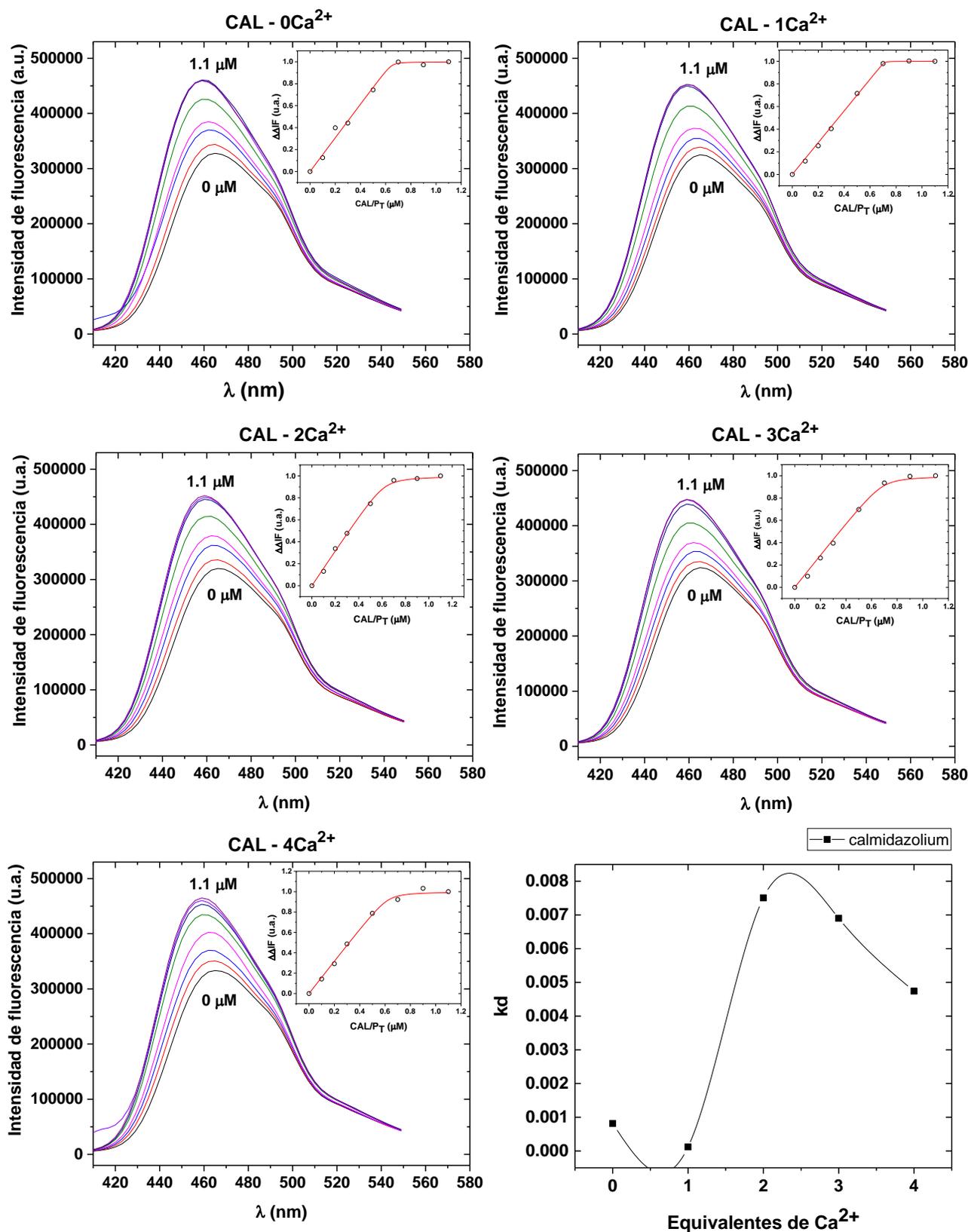


Figura 6S. Espectros de fluorescencia y titulación del biosensor con CAL. Para todos los espectros de fluorescencia se realizaron curvas de titulación con el biosensor hCaM-124mmBr (1 μM), utilizando una solución 20 mM de CAL, a 0, 1, 2, 3, 4 equivalentes de Ca²⁺ a una concentración de 10 μM de CaCl₂, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de CAL, se fueron adicionando 0.683 μL (1 μM) de manera continua hasta alcanzar la saturación del sistema en un volumen final

Anexo

Teoría de la fluorescencia

Principios de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias son excitadas por la absorción de energía en forma de radiación electromagnética y se fundamenta en un proceso mecánico cuántico, este proceso es representado por el diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 23).

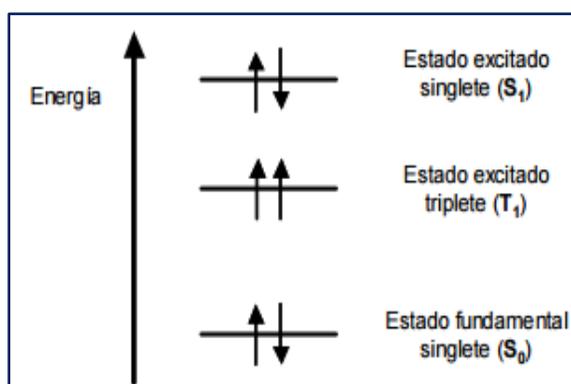


Figura 23. Diagrama de Jablonski. En este diagrama se muestra el proceso mecánico cuántico implicado en la formación de un estado electrónico de la molécula excitada por absorción óptica y consecuente emisión de fluorescencia. Dicho proceso se lleva a cabo en tres etapas. Etapa 1: Excitación, mediante una fuente externa (es decir, luz) se suministra un fotón de alta energía $E = h \cdot \nu_{Ex}$, pasando de un estado electrónico "basal" (S_0) a un estado electrónico "excitado" (S_1') de mayor energía, produciendo una transición electrónica en donde un electrón es promovido desde el orbital molecular ocupado más externo al orbital molecular desocupado más cercano al mismo. Etapa 2: El fluoróforo sufre cambios conformacionales y está sujeto a múltiples interacciones con el medio ambiente molecular, de este modo, parte de la energía del estado electrónico superior se disipa durante el tiempo de vida del estado excitado, produciendo un estado de excitación singlete relajado (S_1) desde el cual se origina la emisión de fluorescencia. Etapa 3: Emisión de fluorescencia, el fotón de energía es emitido, pero a una longitud de onda mayor (menor energía) y así la molécula del fluoróforo retorna a su estado basal S_0 .

Procesos de disipación de energía

En el proceso de emisión de energía de excitación como se menciona con anterioridad se está sujeto a múltiples interacciones por lo que la emisión se puede dar en forma de radiación electromagnética (transición radiativa) o bien parte de esa energía puede degradarse en forma de calor o a través de moléculas con las que interactúa (transferencia no radiativa). Las tasas de emisión de fluorescencia son

típicamente de 10^{-8} segundos, de manera que se genera una vida típica de fluorescencia cerca de 10 ns así, la fluorescencia se presenta únicamente mientras se ejerce el estímulo. La Figura 24, esquematiza los procesos de disipación de energía.

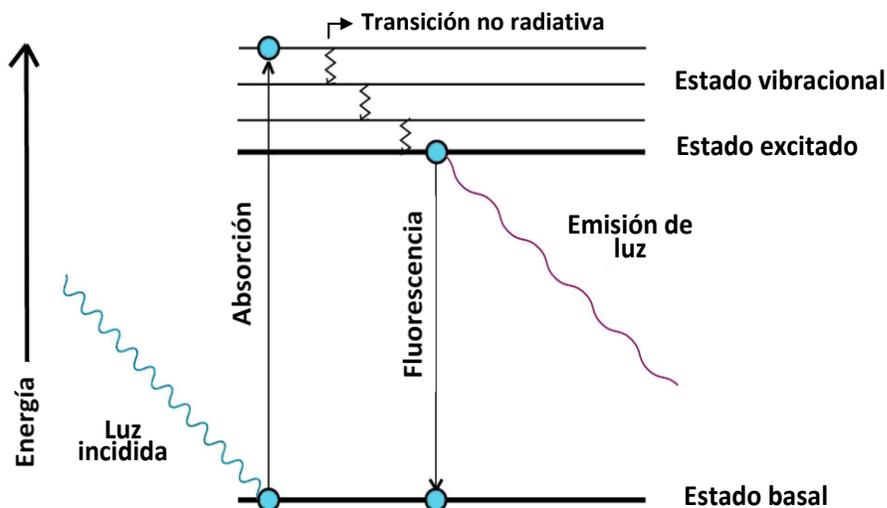


Figura 24. Procesos de disipación de energía Los procesos del fenómeno de fluorescencia en el estado de excitación tienen dos consecuencias importantes. 1) debido a que la energía que se disipa durante el tiempo de vida del estado excitado, el fotón de energía emitido $h\nu_{Ex}$, es de menor energía que el fotón que el fluoróforo ha absorbido previamente, por lo tanto, la longitud de onda de emisión es mayor que la de excitación; 2) no todas las moléculas que se excitaron inicialmente por absorción retornan al estado basal de energía por emisión de fluorescencia. Existen otros procesos, por ejemplo: el fenómeno de “apagamiento colisional”, transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET), conversión interna o desactivación no radiativa y formación de un fotoproducto, las cuales pueden disminuir la cantidad de moléculas en el estado excitado y por tanto disminuir el rendimiento cuántico de fluorescencia.

Apagamiento colisional

En el proceso de apagamiento colisional la intensidad de fluorescencia de un determinado fluoróforo disminuye sin cambiar el espectro de emisión, este fenómeno puede ser el resultado de las interacciones del fluoróforo en el estado excitado con otras moléculas como el solvente o por la formación de complejos del estado basal no fluorescente. Existe otro proceso como el auto apagamiento, el cual es la disminución de la fluorescencia debida a la alta concentración del fluoróforo, el cual al disminuir su concentración aumenta la fluorescencia, esto ocurre en moléculas como la calceurina o carboxifluoresceína, las cuales se emplean para medir la pérdida de contenido de liposomas o de organelos [87].

En la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia, la transferencia de energía se da entre un grupo donante y un grupo aceptor, la limitante para que ocurra este fenómeno deriva en la capacidad del grupo donante fluorescente de excitar al aceptor, si ambos se encuentran a una distancia apropiada (entre 1 y 10 nm), aunado a esto, la excitación de moléculas del grupo aceptor puede ocurrir por transferencia directa de energía de las moléculas donadoras excitadas y ésta se manifiesta como una reducción en la intensidad de emisión del aceptor de fluorescencia, así el fluoróforo donante excitado presenta fluorescencia a una determinada longitud de onda y la aproximación estrecha de un segundo fluoróforo con una banda de absorción que se superpone con la banda de emisión del donante, lo que conduce a la excitación del aceptor por el donante y la fluorescencia resultante es de mayor longitud de onda.

[Importancia de la espectroscopia de fluorescencia](#)

La espectroscopia de fluorescencia es un método muy utilizado en mediciones analíticas y en la investigación científica, especialmente en bioquímica y biomedicina. Dos posibles razones por las que se ha incrementado el uso de esta técnica espectroscópica son: 1) su gran sensibilidad (ng a pg) 2), el alto nivel de evolución alcanzado tanto por los instrumentos requeridos, como por los fluoróforos diseñados para aplicaciones específicas. Aun cuando una de las aplicaciones más utilizadas de la fluorescencia es el marcaje de macromoléculas (como una alternativa al marcaje con isotopos radiactivos), puede ser usada por ejemplo para realizar estudios de dinámica molecular, análisis estructural de proteínas, cuantificación de iones en compartimentos celulares, microscopia confocal, análisis de potencial de membrana, interacciones entre macromoléculas, entre los más importantes.

Espectrofluorómetro

Un espectrofluorómetro está constituido de una lámpara de arco de Xenón la cual emite luz blanca en un amplio intervalo de λ (240-690 nm). El rayo de luz es colectado por un monocromador primario el cual selecciona la λ que va a incidir la muestra. El rayo de luz incide sobre la cubeta que contiene la muestra, posteriormente la emisión de fluorescencia es colectada por un sistema de lentes y pasa a través de un monocromador secundario o de emisión el cual separa la fluorescencia emitida por la muestra de la luz de excitación, con una longitud de onda determinada, posteriormente llegan a un fotomultiplicador el cual traduce una señal electrónica proporcional a la intensidad de luz incidente en la muestra y amplifica esta señal mediante la conversión del número de fotones por unidad de tiempo, finalmente la luz incide en un fotodetector el cual traduce los fotones de fluorescencia en una señal eléctrica cuantificable (Figura 25).

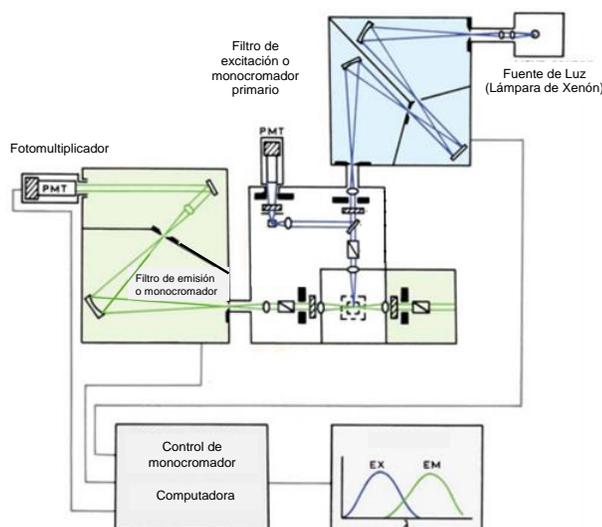


Figura 25. Esquema representativo de los componentes y funcionamiento de un espectrofluorómetro.

Fluoróforos

Los fluoróforos son moléculas en las cuales ocurren procesos de fluorescencia, generalmente moléculas orgánicas poli aromáticas o heterociclos con más de dos anillos (quinina, fluoresceína, piridina 1, etc). Existen dos clases generales de fluoróforos en las biomoléculas: **extrínsecos** e **intrínsecos**; los primeros son aquellos que de forma natural están presentes y corresponden principalmente a los

aminoácidos aromáticos de las proteínas. Por ejemplo, el grupo indol del triptofano en las proteínas. Por el contrario, un fluoróforo extrínseco es aquel que se incorpora a una biomolécula que no presenta fluorescencia por si misma. Por ejemplo, nuestros biosensores de CaM (REF) o el 1,6-difenil- 1,3,5 hexatrieno (DPH) que se utiliza para medir fluidez de membranas.

Existen dos parámetros a caracterizar de un fluoróforo, el primero es el **tiempo de vida de la fluorescencia**, el cual es el tiempo promedio entre su excitación y retorno al estado fundamental, el segundo parámetro es el **rendimiento cuántico** (ϕ), expresado en la siguiente ecuación, el cual hace referencia a la cantidad de fotones emitidos con respecto al número de fotones absorbidos

$$\Phi_F = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{fotones absorbidos}}$$

Estándares utilizados en fluorescencia

La forma de estimar el rendimiento cuántico de un fluoróforo es mediante la comparación con los rendimientos cuánticos conocidos de estándares. Los rendimientos cuánticos de estos compuestos son característicos y altos; independientemente de la longitud de onda de excitación. El uso de estándares incluye a su vez la medida de la intensidad de la fluorescencia. El estándar más representativo es la Rodamina 101 el cual se encuentra disuelta en etanol y tiene el mayor rendimiento cuántico $\phi=1$. Por otro lado, la Quinina y la Fluoresceína fueron las primeras moléculas fluorescentes en ser descubiertas y actualmente se utilizan también como estándares [87].

Efectos sobre el espectro de emisión

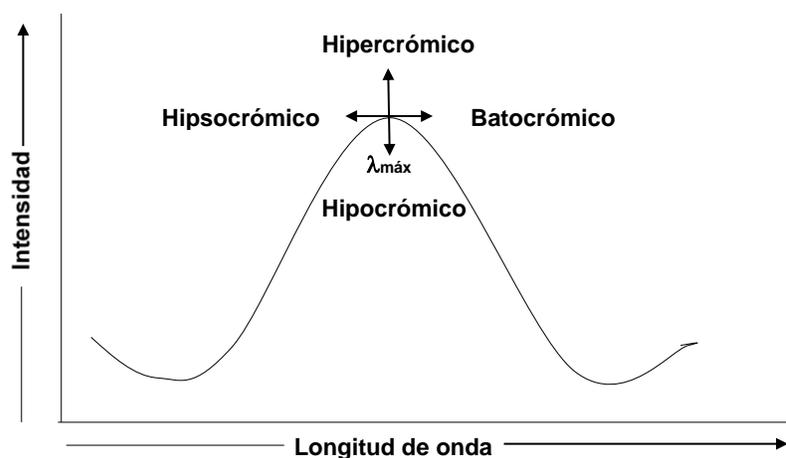


Figura 26. Cambios en la posición e intensidad de absorción.

La **Figura 26** muestra los cuatro diferentes efectos que presentan los espectros de emisión de fluorescencia, efecto batocrómico, hipsocrómico, hipocrómico e hipercrómico.

Efecto Batocrómico: Fenómeno que se presenta cuando la λ de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más grandes o de menor energía por efecto del solvente ya que se sabe que el orbital anti enlazante es más polar que aquel en estado fundamental, por esto, si se compara la absorción de dos disolventes de distinta polaridad, el disolvente más polar estabilizará más al orbital anti enlazante, por lo que la transición electrónica será de menor contenido energético, es decir, se requiere una λ superior. También se puede presentar este efecto por la presencia de distintos sustituyentes químicos, sobre todo aquellos grupos que poseen pares de electrones libres (amino, carboxilo, nitro, amidas, carbonilo, hidroxilo y halógenos) [88].

Efecto Hipsocrómico: El cambio de un máximo de absorción a una λ más corta, es causado generalmente por la eliminación de la conjugación o el cambio en la polaridad del disolvente, lo producen aquellos grupos que atraen electrones por resonancia (nitro, acetilo, hidroxilo, éter, carboxi y éster), en este caso un aumento en la polaridad del disolvente produce un desplazamiento en las bandas de los estados electrónicos, ya que los enlaces de puente de hidrógeno o las interacciones

electrostáticas con disolventes polares, estabiliza a los electrones no enlazantes del estado excitado [88].

Efecto Hipocrómico: Efecto que produce un desplazamiento hacia una menor absorbancia [88].

Efecto Hipercrómico: Efecto que produce un aumento en la absorbancia, el caso más conocido es la hipercromicidad del ADN, que ocurre cuando el dúplex se desnaturaliza, dando dos cadenas sencillas que absorben más en el ultravioleta y por último, si degradamos este ADN de hélice sencilla a nucleótidos libres, de nuevo aumenta la absorbancia [88].