



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIOS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS DE LA PROTEÍNA CALMODULINA PARA EL DISEÑO Y  
DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI-CaM**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**ADRIANA VALVERDE CARCAÑO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 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: HERNÁNDEZ MONTES HOMERO**

**VOCAL: NAVARRETE CASTRO ANDRES**

**SECRETARIO: GONZÁLEZ ANDRADE MARTÍN**

**1er. SUPLENTE: SIFUENTES VAZQUEZ LUIS DANIEL**

**2° SUPLENTE: VASQUEZ BOCHM LUZ XOCHIQUETZALLI**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**TORRE DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**MARTÍN GONZÁLEZ ANDRADE** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**ADRIANA VALVERDE CARCAÑO** \_\_\_\_\_

# AGRADECIMIENTOS

A los apoyos de los proyectos de PAPIIT-IA204116 y de supercómputo LANCAD-UNAM-DGTIC-313 para la realización del presente trabajo.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN .....	11
Interacciones moleculares entre blancos moleculares y fármacos.....	11
Características de la unión ligando–receptor .....	12
Mecanismos de acción de algunos complejos receptor-ligando .....	13
La constante de disociación ( $K_d$ ) .....	15
Diseño y descubrimiento de fármacos.....	16
Estrategias para identificar compuestos líderes.....	17
Calcio, un segundo mensajero citoplasmático. ....	19
Calmodulina (CaM) .....	20
Proteínas relacionadas con la CaM .....	21
Fármacos anti-CaM .....	23
MÉTODOS GENERALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE BIOMOLÉCULAS Y LIGANDOS.....	26
MÉTODOS COMPUTACIONALES .....	27
BIOSENSORES FLUORESCENTES .....	28
Biosensores fluorescentes de la CaM .....	29
PRINCIPIOS DE FLUORESCENCIA.....	31
Espectrometría de fluorescencia .....	31
Espectro de fluorescencia.....	33
Fluoróforos y eficiencia cuántica.....	35
Anisotropía de fluorescencia .....	38
Apagamiento colisional .....	39
Efectos sobre el espectro de absorción.....	39
Espectrofluorómetros.....	39
OBJETIVO GENERAL.....	42
OBJETIVOS PARTICULARES .....	42
MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la CaM por fluorescencia.....	42
Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking).....	43
Dinámica molecular (DM) .....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
Estudios de unión de los diferentes ligandos con la CaM, utilizando el biosensor hCaM M124C-mBBr .....	44

Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con calcio.....	45
Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Compuesto 48/80 .....	46
Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción del Compuesto 48/80 con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr .....	47
Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Fluperazina (FPZ).....	49
Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de la Fluperazina (FPZ) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr .....	50
Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Trifluperazina (TFP) .....	51
Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de la Trifluperazina (TFP) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr .....	52
Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con el Rutenio rojo (RRU) .....	53
Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción del Rutenio rojo (RRU) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr .....	54
Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de cada ligando con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr .....	55
Serie de Compuestos “W”.....	55
Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124C-mBBr con la serie de “W” .....	56
Estudios teóricos de unión de los diferentes compuestos a la CaM.....	59
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÉNDICE .....	69
Estudios teóricos .....	69
1) Construcción de estructuras.....	69
2) Obtención de la proteína CaM .....	69
3) Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking).....	69
4) Preparación de DM .....	71
5) Dinámica molecular (DM) .....	74
6) Supercómputo.....	76
7) Análisis de trayectorias .....	79
8) Gráfico de RMS .....	80
9) Gráfico de Residuos vs tiempo (ps) .....	80
Estudios experimentales .....	80
1) Experimentos del método basado en fluorescencia.....	80
2) Análisis y tratamiento de datos experimentales.....	81

# ESTUDIOS DE INTERACCIONES MOLECULARES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA PROTEÍNA CALMODULINA PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI-CaM

## RESUMEN

Los estudios de las interacciones a nivel molecular de los complejos proteína-ligando son la base para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos, así como para describir los mecanismos de acción de los mismos. La Calmodulina (CaM) es una proteína intracelular que une varios antagonistas que son utilizados en la terapéutica de algunas patologías neurodegenerativas como el Alzheimer, enfermedades del comportamiento y algunos tipos de cáncer. Esta proteína actúa como mediadora en el proceso de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  de muchas enzimas y canales iónicos presentes en las células e interacciones a nivel celular con otras proteínas blanco. Las interacciones de la CaM están implicadas en algunos procesos fisiopatológicos entre los que se encuentran la inflamación, la memoria a corto plazo, la invasión viral, la respuesta inmune y el ciclo celular. El objetivo de este trabajo es el estudio de las interacciones a nivel molecular de cinco compuestos bioactivos para la CaM (Trifluperazina, Compuesto 48/80, Fluperazina, Rutenio rojo y la serie de compuestos llamada "W"), a nivel experimental y teórico; utilizando un biosensor fluorescente de la CaM (*hCaM M124C-mBBr*) y herramientas de modelaje molecular, con la finalidad de contribuir al diseño y desarrollo de nuevos fármacos anti-CaM. Para cada compuesto se obtuvieron cinco constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) para los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-ligando en función del grado de saturación de  $\text{Ca}^{2+}$  (número de equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ ), lo cual, resulta novedoso en este trabajo ya que generalmente solo se reportan  $K_{ds}$  a concentración saturante. Los compuestos Trifluperazina (TFP), Compuesto 48-80 (CMP 48/80) y Rutenio rojo (RRU), muestran una  $K_d$  dependiente del grado de saturación de calcio, es decir, a mayor número de equivalentes aumenta la afinidad del ligando por la CaM. Para el caso de Fluperazina (FPZ), la  $K_d$  es independiente del grado de saturación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con respecto a la serie "W", estos no mostraron unirse al biosensor utilizado en este estudio, lo que nos indica posiblemente que estos compuestos no se unen de forma directa a la CaM, si no probablemente a algún complejo CaM-proteína. Por otro lado, los resultados de los estudios teóricos, como las dinámicas moleculares, son consistentes y complementarios con los resultados experimentales obtenidos.

## ABREVIATURAS

A/Å	Amstrongs
AMA	Amantadina
atm	Atmósferas
ATPasa	Adenosinatrifosfato fosfatasa
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	Guanosina Monofosfato cíclico
cm	Centímetros
CMP 48-80	Compuesto 48/80
CMZ	Cloruro de Calmidazolio
CNPasa	Nucleótido Cíclico Fosfodiesterasa
COOH	Ácido carboxílico
CPZ	Clorpromacina
Da	Daltons
$\Delta\Delta I F$	Intensidad de Fluorescencia
$\Delta G$	Energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Entropía
$\Delta S$	Entalpía
DM	Dinámica Molecular
$\varepsilon$	Absortividad molar
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa endotelial, <i>endotelial Nitric Oxide Synthase</i>
$\phi$	Eficiencia cuántica
$F_{0D}$	Intensidad de fluorescencia del estado desplegado
$F_{0N}$	Intensidad de fluorescencia del estado nativo
FPZ	Fluperazina

FRET	Fenómeno de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia, <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	Proteína Verde Fluorescente, <i>Green Fluorescent Protein</i>
hCaM	Calmodulina humana
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de mayor energía, <i>High energy Occupied Molecular Orbit</i>
HTS	Proyección de Alto Impacto, <i>High Throughout Screening</i>
H <sub>U</sub> EX	Fotón de energía excitado
H <sub>U</sub> EM	Fotón de energía emitido
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria medio máxima, <i>The half maximal inhibitory concentration</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible, <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
ITC	Calorimetría de Titulación Isotérmica, <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K	Kelvin
$K_d$	Constante de disociación
$K_i$	Afinidad de unión
$\lambda$	Longitud de onda
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda máxima
L <sub>0</sub>	Concentración de ligando
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energía, <i>Low energy Unoccupied Molecular Orbit</i>
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
mL	Mililitros
M	Molar
mBBr	Fluoróforo monobromobimano
MBC	Malbranqueamidas

Met	Aminoácido Metionina
MLC	Cadena Ligera de la Miosina, <i>Myosin light-chain</i>
MLCK	Cinasa de la Cadena Ligera de la Miosina, <i>Myosin light-chain kinase</i>
M124C	Modificación del aminoácido metionina 124 por una cisteína
N	Normalidad
Na <sup>2+</sup>	Ion Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NH <sub>2</sub>	Radical amino
nm	Nanómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa, <i>Nitric Oxide Synthase</i>
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa neuronal, <i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
ns	Nanosegundos
PDE	Fosfodiesterasa, <i>Phosphodiesterase</i>
P <sub>o</sub>	Concentración de la proteína
ps	Picosegundos
P <sub>T</sub>	Concentración total de la proteína
R	Constante general de los gases
r	Anisotropía
rMLC	Cadena Ligera Reguladora de la Miosina
RMSD	Desviación Media cuadrática, <i>Root-Mean-Square Deviation</i>
RRU	Rutenio rojo
s	Segundos
S <sub>0</sub>	Estado basal
S <sub>1</sub>	Primer singlete excitado
S <sub>1</sub> '	Estado excitado
S <sub>2</sub>	Segundo singlete excitado

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
$\tau$	Tiempo de vida
T°	Temperatura
TFM	Tubos Fotomultiplicadores
TFP	Trifluoperazina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trp	Triptófano
u.a.	Unidades arbitrarias
$\nu$	Frecuencia
W7	(N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftaleno sulfonamida), <i>N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-2-naphthalenesulfonamide HCL</i>
W7I	Isómero de (N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftaleno sulfonamida)
W5	N-naftaleno(6-aminohexil)-1-sulfonamida, <i>N-(6-aminohexyl) naphthalene-1-sulfonamide</i>
W5I	Isómero de clorhidrato de N-naftaleno(6-aminohexil)-1-sulfonamida
W12I	Clorhidrato de N-(4-aminobutil)-2-naftalenosulfonamida, <i>N-(4-Aminobutyl)-2-naphthalene sulfonamide hydrochloride</i>
W13I	Clorhidrato de N- (4 - aminobutil) - 5 - cloro - 2 - naftalenosulfonamida, <i>N-(4-Aminobutyl)-5-chloro-2-naphthalenesulfonamide hydrochloride</i>

## INTRODUCCIÓN

### Interacciones moleculares entre blancos moleculares y fármacos.

Las macromoléculas son elementos fundamentales de los organismos vivos, ya que forman parte esencial de las células. Las proteínas son consideradas macromoléculas y están constituidas por cadenas lineales de aminoácidos que van desde unas decenas hasta varios cientos de estos; participan en diversas funciones celulares tales como: comunicación, soporte, integridad, metabolismo, regulación, etc. La participación de muchas proteínas en diferentes rutas bioquímicas destaca la importancia de estas macromoléculas, ya que la modulación de las rutas metabólicas repercute a nivel sistémico en procesos fisiológicos y patológicos.

Aquellas proteínas que modulan su actividad a través de ligandos endógenos o exógenos son consideradas farmacológicamente blancos moleculares. Las proteínas integran a la clase más numerosa y mejor descrita de blancos moleculares, constituyendo receptores clásicos de hormonas, enzimas, canales iónicos y elementos estructurales (Figura 1). La mayoría de estos actúan en las principales rutas metabólicas claves de regulación en el cuerpo humano o en algún organismo patógeno, y al interactuar con diferentes ligandos pueden inhibir o potenciar su actividad.

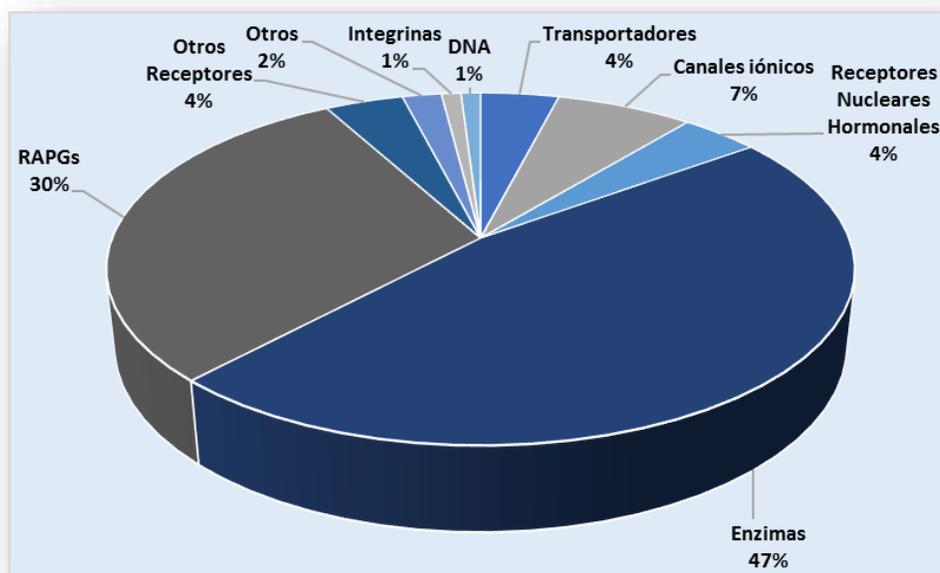


Figura 1. Principales blancos moleculares de fármacos.

Los blancos moleculares participan en la transmisión de señales químicas entre las células, así como en su interior, estos pueden estar localizados en la superficie celular, en el citoplasma o en el núcleo. También pueden ser modulados, ya que regulan diferentes procesos bioquímicos, como conductancia de iones, actividades enzimáticas, transcripción de genes y transducción de señales. Las moléculas como los fármacos, hormonas, toxinas, neurotransmisores y otros mediadores (ligandos) influyen en el comportamiento celular al unirse a los diferentes blancos moleculares.

La interacción molecular de un fármaco con un blanco molecular implica un proceso conocido como reconocimiento molecular, el cual, se presenta en una zona específica de la macromolécula llamada sitio de unión. Las interacciones moleculares que contribuyen a definir la afinidad y especificidad de éstas en el complejo receptor-ligando incluyen interacciones de tipo electrostáticos e iónicos, puentes de hidrógeno, Van der Waals, dipolo-dipolo e hidrofóbicas. De esta manera, los diferentes grupos químicos de ambas partes participan activamente en la formación de enlaces iónicos e inducen la atracción de cargas opuestas en la interfase de las superficies moleculares complementarias que interactúan.<sup>1</sup>



**Figura 2. Interacción receptor-ligando.** Los ligandos libres (L) y los receptores (R) interactúan para formar complejos receptor-ligando (LR), lo que corresponde a la función de unión afín de los receptores.

### **Características de la unión ligando–receptor**

La afinidad y especificidad son dos características importantes en la formación del complejo receptor-ligando (Figura 2). Desde la perspectiva cuantitativa, la afinidad es una medida de la fuerza de la unión no covalente entre el ligando y su receptor, dicho de otra manera, es la probabilidad de que el receptor sea ocupado cuando existe una concentración determinada de ligando. Por otro lado, la especificidad refleja el grado de complementariedad que caracteriza a las interacciones receptor-ligando. La especificidad de estas y los eventos de señalización distales que resultan, determinan en parte el flujo ordenado de información que dirige funciones biológicas estructuradas.<sup>1</sup>

La estructura química del ligando tiene un efecto determinante sobre su actividad (relación estructura-actividad). De acuerdo con la evidencia experimental, se indica que los fármacos interactúan con receptores proteicos que tienen conformaciones tridimensionales específicas, y por lo general, requieren un mínimo de tres puntos de interacción para permitir la unión, pero si se presentan cambios ligeros de estructura o composición del fármaco se puede alterar notablemente su afinidad y especificidad; y por consiguiente su actividad farmacológica.

Existen dos clases de ligandos, los agonistas y los antagonistas. Los primeros poseen actividad intrínseca, es decir, la interacción receptor-ligando activa mecanismos efectores distales que conducen a una respuesta biológica, permitiendo que la información denominada transducción de señales se traduzca en una respuesta celular. Los segundos muestran una función de unión, pero carecen de actividad intrínseca, es decir, se unen a los receptores sin activarlos, con lo que inhiben la capacidad de los agonistas para activar y por lo tanto bloquean las funciones de señalización y las respuestas distales. Los antagonistas se clasifican en reversibles e irreversibles, los reversibles se pueden disociar de su receptor, donde la unión del antagonista impide la unión del agonista a sus receptores (antagonismo competitivo); los irreversibles forman un enlace covalente con su receptor, donde el antagonista y el agonista pueden unirse a los receptores de manera simultánea, pero la unión de antagonistas reduce o impide la acción del agonista (antagonismo no competitivo).

La mayoría de las interacciones receptor-ligando son de tipo reversible (el ligando se une, transmite la señal y después se separa del receptor), esto permite la inducción de eventos de señalización distales una vez que ocurre la asociación receptor-ligando y la ocupación de los receptores, eventos que terminan cuando se produce una disociación del complejo receptor-ligando.

### **Mecanismos de acción de algunos complejos receptor-ligando**

Cuando el complejo receptor-ligando se encuentra anclado en la membrana, se ponen en marcha otros procesos; el proceso en su totalidad, desde que el mensaje extracelular es detectado por la célula hasta producir la o las respuestas finales, lo que se conoce como transducción de señal.<sup>2</sup>

Algunos ejemplos de mecanismos de complejos receptor-ligando son los siguientes:

- 1) Ligandos unidos a receptores intracelulares que funcionan como reguladores de la transcripción, al reconocer y unirse a elementos específicos en el genoma alterando la expresión de las proteínas. Los corticoesteroides y sus receptores son un ejemplo de estos.<sup>3</sup>
- 2) Complejo ligandos-enzimas. Se altera la actividad enzimática, lo cual influye sobre la actividad celular como es el caso de activadores enzimáticos, quienes, al unirse a las enzimas incrementan su actividad.
- 3) Complejos ligandos-canales de calcio. Se modifica su conductancia influyendo sobre la actividad celular. Los antagonistas de los canales de calcio interrumpen el flujo del ion hacia el interior de la célula a nivel de la membrana plasmática, lo cual induce la relajación del músculo liso vascular en la hipertensión y remodelación de la matriz extracelular en las enfermedades del tejido conectivo.<sup>4</sup>
- 4) Complejos proteínas-ligandos de la superficie celular. Estimulan la producción de un segundo mensajero en el interior de la célula que regula respuestas fisiológicas que, a su vez, regulan los ligandos endógenos, estos mecanismos incluyen:
  - a. Receptores como los receptores  $\beta$  adrenérgicos que están acoplados a efectores distales a través de proteínas de la unión del nucleótido de guanina como por ejemplo, las que activan a la adenilato ciclasa, cuyo producto es el AMP cíclico.<sup>5</sup>
  - b. Receptores que activan a las guanilato ciclasas (GC), cuyo segundo mensajero es el GMP cíclico.<sup>6</sup>
  - c. Receptores que activan cinasas como receptores de factores de crecimiento y que fosforilan residuos de tirosina en las proteínas intracelulares.<sup>7</sup>
- 5) Complejos enzimas-inhibidores enzimáticos. La unión de un inhibidor puede impedir la entrada del sustrato al sitio activo de una enzima y obstaculizar que la enzima catalice, disminuyendo su actividad. Debido a que el bloqueo de una enzima puede ser fatal para un organismo patógeno o bien en el organismo

afectado corregir un equilibrio metabólico, muchos fármacos actúan como inhibidores enzimáticos. Dicha unión puede ser de tipo reversible (unión no covalente) o irreversible (unión de forma covalente).

- 6) Proteínas reguladoras-inhibidores. Todas las proteínas tienen funciones específicas. Por ejemplo, en la contracción y relajación del músculo liso, el factor clave es el estado de fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina (rMLC), ya que controla la interacción actina-miosina. Esta fosforilación está catalizada por una cinasa, la cinasa de cadenas ligeras de la miosina (MLCK), que se activa cuando se une al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, posteriormente la miosina fosfatasa, invierte el proceso de fosforilación y relaja el músculo. Por consiguiente, la MLCK y la miosina fosfatasa ejercen un efecto equilibrado, favoreciendo la contracción y la relajación muscular respectivamente.<sup>8</sup>

La importancia de estudiar a detalle las interacciones entre blancos moleculares como son las proteínas y los ligandos (fármacos), radica en comprender y relacionar la estructura-actividad de los complejos proteína-fármaco. Esto último nos permite el descubrimiento, desarrollo y diseño de nuevas entidades moléculas bioactivas, así como una mejor elucidación del mecanismo de acción farmacológica para comprender los posibles efectos colaterales que puedan presentar los fármacos.

### **La constante de disociación ( $K_d$ )**

La capacidad de un fármaco para interactuar con un blanco molecular depende del grado de afinidad del fármaco, que es la probabilidad de que el fármaco llegue y ocupe un sitio de unión en la biomolécula en un instante dado. Por otro lado, de la actividad intrínseca, que es 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).

La relación entre afinidad, concentración de fármaco y ocupación de los receptores puede expresarse a través de la constante de disociación en equilibrio, la concentración del ligando que permite la ocupación de 50% de los receptores en condiciones de

equilibrio. La constante de disociación ( $K_d$ ) es la expresión directa de la afinidad de un complejo receptor-ligando. Cuando la afinidad de un compuesto en el complejo es alta, se requieren concentraciones menores del ligando para producir la ocupación del receptor. Por el contrario, cuando la afinidad es baja, se requieren de concentraciones mayores de ligando para lograr la ocupación del receptor. La  $K_d$  es un parámetro propio para cada ligando en el complejo receptor-ligando y, además, representa la ocupación del 50% de los receptores, de manera independiente a su número.<sup>1</sup>

La capacidad de unión a biomoléculas en diversas ocasiones se encuentra afectada por factores externos y por mecanismos reguladores intracelulares. La cantidad basal de blancos moleculares y la eficiencia de los mecanismos estímulo-respuesta no son iguales en todos los tejidos. 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 (envejecimiento), las mutaciones genéticas y las patologías.

### **Diseño y descubrimiento de fármacos**

A pesar de los avances científicos producidos en el área de las ciencias de la salud, aún encontramos una larga lista de enfermedades que no tienen una opción terapéutica tales como: enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, enfermedad de Huntington<sup>9</sup> o Parkinson), SIDA, algunos tipos de cáncer,<sup>10</sup> enfermedades genéticas, etc. Sin embargo, nuestra sociedad requiere e incluso exige calidad de vida, cualidad que pasa por amortiguar o evitar el dolor, el sufrimiento o incluso las molestias derivadas de una enfermedad concreta.

El descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso complejo y costoso en el cual convergen diversas disciplinas científicas tales como: la biología, la química, la farmacología, la toxicología, entre las más importantes. Inicialmente se identifican los compuestos que se unan a un blanco terapéutico de interés o que muestren actividad biológica (*hits*) en un ensayo. El siguiente paso es encontrar compuestos que tengan propiedades farmacéuticas atractivas como la baja toxicidad y ciertas propiedades farmacocinéticas. Tales compuestos son llamados “líderes o cabezas de serie”.

La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación complejo, ya que involucra varias etapas que abarcan desde la identificación de los blancos moleculares hasta las fases clínicas. Durante muchos años se han usado únicamente métodos experimentales pero actualmente se ha enfocado en la investigación de metodologías de química teórica (computacional) para conocer más a fondo el funcionamiento de enzimas y proteínas implicadas en diversas patologías; metodologías para la producción masiva de moléculas y en su modulación posterior para optimizar las propiedades farmacológicas.<sup>11</sup>

El uso de métodos computacionales también llamados métodos “*in silico*” han acelerado el proceso de diseño y desarrollo de fármacos y a su vez, permiten codificar con precisión modelos teóricos con la capacidad de procesar grandes cantidades de información. Adicionalmente estos métodos contribuyen a entender los mecanismos de acción de los principios activos de los medicamentos o mejorar las propiedades de los mismos. Sin embargo, es importante mencionar que los métodos de cómputo no reemplazan a los métodos experimentales, pero si son un excelente complemento.

### **Estrategias para identificar compuestos líderes**

Existen diversas estrategias experimentales y computacionales para identificar compuestos activos que se consideran líderes para implementar un programa de optimización:

- 1) Optimización de fármacos ya probados para su uso clínico. La optimización puede consistir en mejorar la eficacia del fármaco o reducir efectos secundarios.
- 2) Ensayo biológico sistemático de colecciones de compuestos. Un caso típico son las pruebas biológicas de alto rendimiento (*high-throughput screening* [HTS]). En HTS se usan robots para evaluar en pocas horas colecciones con miles o millones de moléculas.

- 3) Uso de información biológica disponible. Por ejemplo, si se conoce el mecanismo de acción de un sustrato se diseñan compuestos que se espera sigan el mismo mecanismo de acción.
- 4) Diseño o identificación de nuevos compuestos asistido por computadora (DiFAC), seleccionar candidatos y optimizar líderes para mejorar las propiedades deseadas y disminuir los efectos adversos.<sup>12</sup>

Una de la estrategia utilizada para el diseño y descubrimiento de fármacos comienza con el conocimiento de la base genética y molecular de una enfermedad particular; con esta información se selecciona un blanco molecular terapéutico. Posteriormente, se diseñan ligandos que interaccionen con el blanco molecular, para realizar el diseño se emplean diferentes estrategias entre las que destacan el diseño computacional y la utilidad de librerías de moléculas bioactivas. El objetivo es encontrar el mejor candidato, el cual, debe ser específico y afín para el blanco molecular en particular de la patología, este además de tener las especificaciones ya mencionadas no debe ser tóxico y demostrar mínimos efectos secundarios.

En el diseño de un agente terapéutico, es importante considerar la naturaleza del blanco molecular, ya que cuando este se encuentra en la superficie exterior de la membrana celular o se secreta, pueden utilizarse proteínas terapéuticas, como anticuerpos monoclonales o péptidos. Sin embargo, cuando el blanco molecular se encuentra en el interior de la célula, pueden emplearse de preferencia fármacos que sean capaces de atravesar la membrana celular, como moléculas pequeñas y de carácter hidrófobo. También se debe contemplar la vía de administración y la forma farmacéutica que sea adecuada para el fármaco.

Conforme aumenta la diversidad y selectividad de los fármacos, resulta evidente que existen múltiples subtipos de receptores. La clonación molecular ha acelerado el descubrimiento de subtipos nuevos de receptores, y su expresión como proteínas recombinantes ha facilitado el descubrimiento de fármacos selectivos para cada subtipo. El incrementar la selectividad de un fármaco en un tejido en particular tiene un beneficio en las respuestas farmacológicas desencadenadas, y suele ser el elemento clave para

que los beneficios terapéuticos del fármaco superen sus efectos adversos y minimice los colaterales.

La búsqueda de nuevos receptores ha rebasado la búsqueda de isoformas de receptores conocidos y se ha orientado a la identificación de cientos de genes en busca de nuevos receptores. Muchos de ellos pueden asignarse a familias conocidas con base en secuencias, y sus funciones tal vez se confirmen por medio de ligandos apropiados. Sin embargo, existen innumerables receptores “huérfanos”, que es el nombre que se les asigna a los receptores que se desconocen sus ligandos. Se espera que la identificación de los ligandos endógenos y de las funciones fisiológicas de receptores huérfanos permita la obtención de nuevos fármacos que controlen estados patológicos aún no tratables.<sup>13</sup>

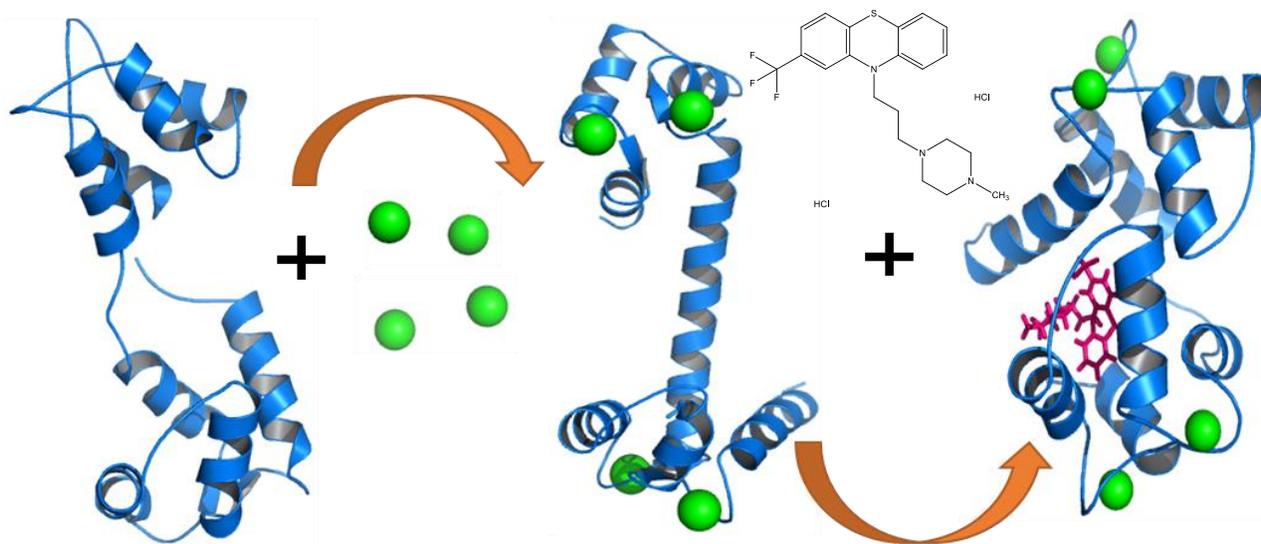
### **Calcio, un segundo mensajero citoplasmático.**

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma es gobernada por varios canales: los de la membrana plasmática que son regulados por las proteínas G, el potencial de membrana, el  $\text{K}^+$  o el mismo  $\text{Ca}^{2+}$ , y canales en regiones especializadas del retículo endoplasmático que responden a Inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) o, en las células excitables, a la despolarización de la membrana y el estado del canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  y sus depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico. El  $\text{Ca}^{2+}$  es eliminado tanto por extracción (intercambiador de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  y ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ ) como por recaptura en el retículo endoplásmico. El  $\text{Ca}^{2+}$  propaga sus señales a través de una amplia variedad de proteínas como enzimas metabólicas, cinasas y proteínas reguladoras de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (por ejemplo., la calmodulina-CaM-), que regulan aún otros efectores finales e intermediarios que modulan una serie de procesos celulares.<sup>13</sup>

La concentración normal del ion calcio en casi todas las células del organismo se encuentra en el intervalo de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  M, cantidad que es insuficiente para activar el sistema de la CaM. Sin embargo, cuando la concentración de calcio aumenta entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, el grado de unión es adecuado para desencadenar diversas acciones intracelulares a través de la CaM.<sup>14</sup>

### Calmodulina (CaM)

La calmodulina (CaM), es una proteína llamada así por Cheung,<sup>15</sup> es una proteína intracelular, conformada por 148 aminoácidos y de bajo peso molecular (16,706 Da),<sup>16</sup> es ubicua y altamente conservada en células eucariotas; posee dos dominios conectados por un segmento flexible. Presenta cambios conformacionales apreciables al unir diferentes ligandos -fármacos, péptidos y moléculas bioactivas- (Figura 3), y actúa como mediadora en el proceso de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  de muchas enzimas y canales iónicos presentes en las células, así como las interacciones a nivel celular que presenta dicha proteína con sus proteínas blanco.



**Figura 3. Representación de la proteína CaM.** A la izquierda libre de ligandos (apo-CaM, 1CFD.pdb), en el centro se observa la CaM unida a cuatro iones de calcio ( $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM, 1CLL.pdb) y a la derecha la CaM se encuentra unida al inhibidor Trifluoperazina (CaM-TFP, 2o60.pdb).

La CaM no tiene una actividad enzimática como tal, pero actúa en respuesta a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para modular una amplia variedad de proteínas y a través de estas interacciones regula un número importante de procesos fisiológicos vitales tales como inflamación, memoria a corto plazo, penetración viral, respuesta inmune y ciclo celular. Estructuralmente la CaM tiene cuatro dominios denominados “EF-hand”, estos están conformados por 2  $\alpha$ -hélices conectados por un asa de 12 residuos de aminoácidos, adquiriendo una estructura de mancuerna.<sup>17</sup>

La CaM presenta diferentes estados conformacionales dependiendo del grado de saturación de  $\text{Ca}^{2+}$ , la CaM libre de  $\text{Ca}^{2+}$  se denomina “apo-CaM” y las  $\alpha$ -hélices de los motivos “EF-hand” están colocadas en paralelo entre sí, mientras la CaM saturada del ion  $\text{Ca}^{2+}$  se conoce como “holo-CaM”. La presencia de la “apo-CaM” es esencial para la supervivencia de las células, y ahora se sabe que algunas enzimas como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la fosfodiesterasa 1 (PDE1), la glicógeno fosforilasa, la miosina de vellosidades y las proteínas neuronales prefieren interactuar con la “apo-CaM”.<sup>18</sup>

La unión del ion  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre de forma secuencial, primero en los sitios del dominio C-terminal de la CaM, siendo los de mayor afinidad y posteriormente en los otros dos sitios del dominio N-terminal. Sin embargo, en presencia de proteínas blanco, la unión a calcio se vuelve cooperativa para los cuatro sitios y la afinidad relativa de estos sitios varía. Como consecuencia, hay un cambio estructural global de la proteína y a su vez cambios característicos entre los dominios terminales, por lo que se expone un par de parches hidrofóbicos entre ambos dominios de la CaM (“forma abierta”),<sup>10</sup> los cuales hacen posible la unión y modulación con alrededor de 100 proteínas de interés farmacológico.<sup>19</sup>

La CaM presenta cadenas laterales de metioninas (Met) en abundancia, representando cerca de la mitad de la superficie hidrofóbica de cada parche, los cuales son los sitios con los que la CaM interacciona y modula a otras proteínas. Estos complejos juegan papeles importantes en diversos procesos celulares tales como: la transcripción genética, la apoptosis, la homeostasis metabólica, la fosforilación y la desfosforilación proteica, la síntesis de proteínas, la división celular, la contracción del músculo liso, la tubulación, la regulación de canales iónicos, la proliferación celular y la quimiotaxis, entre las más importantes.

### **Proteínas relacionadas con la CaM**

Una de las proteínas sensibles a CaM es la fosfodiesterasa 1 (PDE1) para el AMPc que contienen todos los tejidos de mamíferos,<sup>20</sup> donde la inhibición de la activación de PDE1 mediada por CaM se ha relacionado con el efecto terapéutico relajante del músculo liso de algunos fármacos.<sup>21</sup>

Las fosfodiesterasas (PDE) constituyen una familia de proteínas importantes de señales cuyas actividades son gobernadas por una transcripción regulada, así como por segundos mensajeros (nucleótidos cíclicos y  $\text{Ca}^{2+}$ ) e interacciones con otras proteínas de señalización como arrestina  $\beta$  y cinasas. Estas enzimas son metalohidrolasas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos a sus correspondientes 5'-nucleósidos monofosfato en presencia de cationes divalentes, además pueden ser específicos de AMPc, GMPc o bien pueden utilizar ambos sustratos. Las fosfodiesterasas tienen una estructura similar que puede dividirse en tres dominios: un dominio extremo amino ( $\text{NH}_2$ ), una región conservada o dominio catalítico y un extremo carboxilo ( $\text{COOH}$ ). En el caso de la PDE1, existen tres genes (PDE1A, B y C) que dan lugar a múltiples isoformas, teniendo como característica común dos dominios de unión a CaM localizados en el extremo amino. Todas las isoformas de la fosfodiesterasa requieren  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM para su actividad, observándose con la interacción un aumento hasta 10 veces la actividad enzimática. Esta familia también presenta una amplia distribución en tejidos periféricos como corazón, pulmón, riñón, testículo, hígado y músculo.<sup>22</sup>

Otra proteína de gran interés y relacionada con CaM es la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), una enzima reguladora clave en el proceso de relajación-contracción de los músculos lisos. La actividad contráctil en el músculo liso se inicia por una auto-fosforilación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM del MLCK,<sup>23</sup> es decir, en el músculo liso la contracción se ve iniciada por la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC), causando que se desprenda de los filamentos de actina. Esta fosforilación es catalizada por la MLCK dependiente del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. De esta manera, cualquier molécula capaz de evitar la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK podrá interferir con la activación de la cinasa y la consiguiente contracción del músculo liso.<sup>10</sup>

También se encuentran las isoenzimas de la óxido nítrico sintasa -NOS- (iNOS, eNOS y nNOS), quienes son fundamentales para el control de la biosíntesis del óxido nítrico (NO) y funcionalmente “bimodales”, ya que combinan actividades de oxigenasa y reductasa asociadas a diferentes dominios estructurales. El dominio oxigenasa contiene un grupo hemo, mientras que el dominio reductasa se une al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, de este modo, la actividad de las isoenzimas constitutivas de la óxido nítrico sintasa (NOS) está controlada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM intracelular y la sensibilidad al complejo se controla

por la fosforilación en lugares específicos de las enzimas. Este control se ejerce de dos maneras: 1) la mayoría de los agonistas dependientes del endotelio (por ejemplo, la acetilcolina y la bradicina) aumentan la concentración citoplasmática de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ; el consiguiente aumento del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM activa a eNOS o nNOS. 2) La fosforilación de residuos específicos en eNOS la hace más o menos activa a una determinada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Esto puede modificar la síntesis de NO en ausencia de variaciones en la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>8</sup>

De acuerdo con los ejemplos anteriores, la proteína CaM es un blanco molecular de una variedad de fármacos, ya que se encuentra asociada de manera directa o indirecta con algunas patologías como SIDA, Alzheimer, la esquizofrenia y varios tipos de cáncer, neuropatías, dolor, etc. Lo anterior nos indica que la CaM es un blanco molecular y un excelente prototipo para el estudio de múltiples interacciones, enfocándonos al descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas bioactivas que puedan interferir con la regulación, lo que conllevaría al desarrollo de fármacos específicos para las enfermedades implicadas en dichas regulaciones.<sup>24-26</sup>

### **Fármacos anti-CaM**

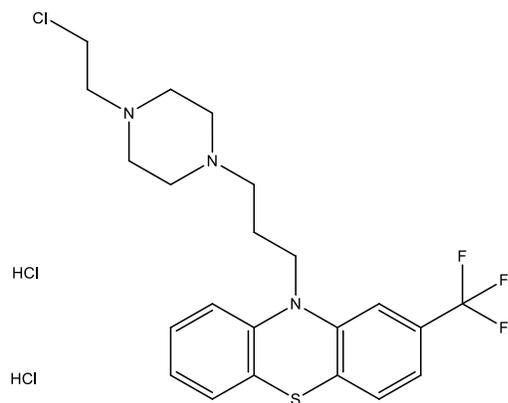
La CaM une varios antagonistas clásicos reportados tales como Trifluoroperazina (TFP), Clorpromacina (CPZ), Flupenazina (FPZ). Malbrancheamidas (MBC), Xantonas, Tamoxifen<sup>27</sup>, Cloruro de calmidazolio (CMZ),<sup>28</sup> Haloperidol<sup>29</sup> y Lubeluzol,<sup>30</sup> entre otros. Estos inhibidores son utilizados en la terapéutica de algunas patologías y pueden actuar en diferentes formas, ya sea uniéndose directamente a la CaM, o bien al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ó  $\text{Ca}^{2+}$ CaM-ligando dependiente (proteína, enzima, fármaco o ion).<sup>10</sup>

Se ha descubierto un amplio grupo de productos naturales obtenidos de animales, plantas y microorganismos que han sido reportados como ligantes de la CaM, siendo los microorganismos una de las fuentes naturales más ricas para la obtención de moléculas con diversas actividades biológicas. Estos productos presentan una diversidad estructural y pertenecen a diferentes categorías de metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides, terpenoides, cumarinas, antraciclina, antraquinonas, lignanos, estilbenoides, así como flavonoides y otros compuestos de tipo fenólicos.<sup>10</sup> Según el estudio químico realizado

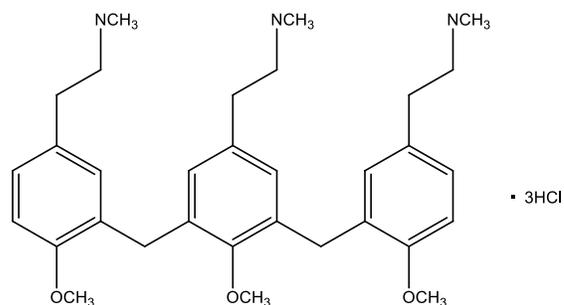
por Madariaga-Mazón y colaboradores, en el ascomiceto *Purpureocillium lilacinum* (Thom) se logró el aislamiento de dos compuestos de tipo xantona-antraquinona, la acremoxantona C y la acremonidina A, de los cuales se evaluó la afinidad por la CaM usando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBR*, indicando que ambos productos interaccionan directamente con la CaM. Dentro de los alcaloides obtenidos a partir del hongo *Malbranchea aurantiaca*, se lograron aislar a la malbranqueamida, malbranqueamida b e isomalbranqueamida b, las que se unen con alta afinidad a la CaM.

La Figura 4, muestra los inhibidores de la CaM estudiados en este trabajo. 1) Trifluoperazina (TFP), es un compuesto fenotiazínico permeable a las células con efectos antiadrenérgicos y antidopaminérgicos que facilitan la elevación inducida por agonistas del calcio citosólico a bajas concentraciones (10  $\mu\text{M}$ ) y antagoniza la CaM a concentraciones más altas. Es un inhibidor potente e irreversible de los canales catiónicos cerrados con cAMP;<sup>31</sup> 2) Compuesto 48/80 (CMP 48-80), reportado únicamente como inhibidor competitivo de CaM con una  $\text{IC}_{50}$  para el complejo CaM-PDE de 0.3  $\mu\text{g/mL}$  y para el complejo CaM-ATPasa de 0.85  $\mu\text{g/mL}$ ;<sup>32</sup> 3) Flupenazina (FPZ), un inhibidor irreversible de la activación inducida por CaM de la CNPasa (nucleótido cíclico fosfodiesterasa) con una  $\text{IC}_{50}$  reportada para el complejo CaM-PDE de 10  $\mu\text{M}$ ;<sup>33</sup> 4) Rutenio rojo (RRU), bloquea la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de las mitocondrias, es un inhibidor de CaM y Troponina C que tiene un mecanismo diferente de inhibición, con una  $\text{IC}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ <sup>34</sup> y 4) La serie de "W" donde N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftaleno sulfonamida (W7), está reportado como antagonista de la CaM,<sup>35</sup> al igual que su forma isomérica W7I, quien además, está reportado como inhibidor de proliferación celular; el N-naftaleno(6-aminohexil)-1-sulfonamida (W5) está reportado como un antagonista de CaM que inhibe las actividades reguladas por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Esto incluye la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK) con una  $\text{IC}_{50}$  de 230  $\mu\text{M}$  y PDE (fosfodiesterasa) dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM con una  $\text{IC}_{50}$  de 240  $\mu\text{M}$ , mientras que W5I sólo está reportado como inhibidor de la CaM;<sup>36, 37</sup> el N-naftaleno(4-aminobutil)-2-sulfonamida (W12I) es un antagonista de CaM que inhibe MLCK (quinasa de la cadena ligera de miosina), con una  $\text{IC}_{50}$  de 300  $\mu\text{M}$ , e inhibidor de la PDE dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM con una  $\text{IC}_{50}$  de 260  $\mu\text{M}$ <sup>38, 39</sup>; finalmente el N-(4-aminobutil)-5-cloronaftaleno-1-

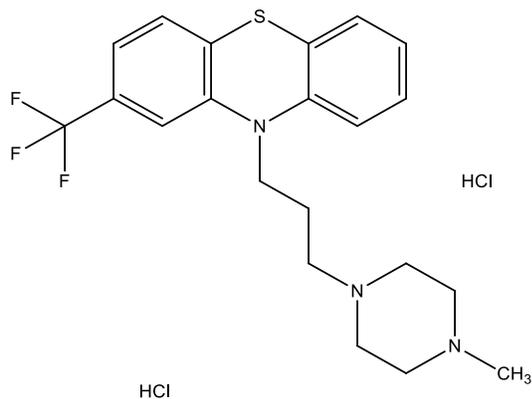
sulfonamida (W13) exhibe actividad antagonista de CaM, así como la inhibición de células de cáncer de mama resistente al tamoxifeno.<sup>37</sup>



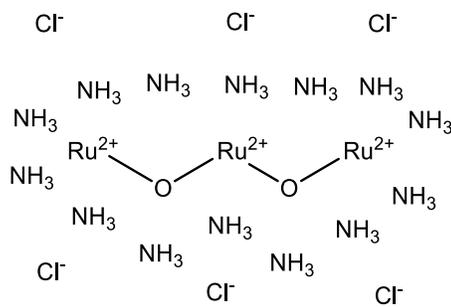
**Fluperazina (FPZ)**



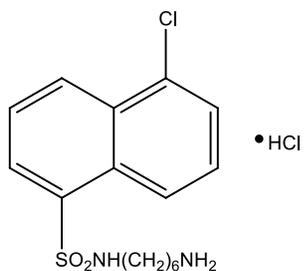
**Compuesto 48/80 (CMP)**



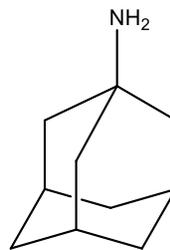
**Trifluperazina (TFP)**



**Rutenio rojo (RRU)**



**W-7 (W7)**

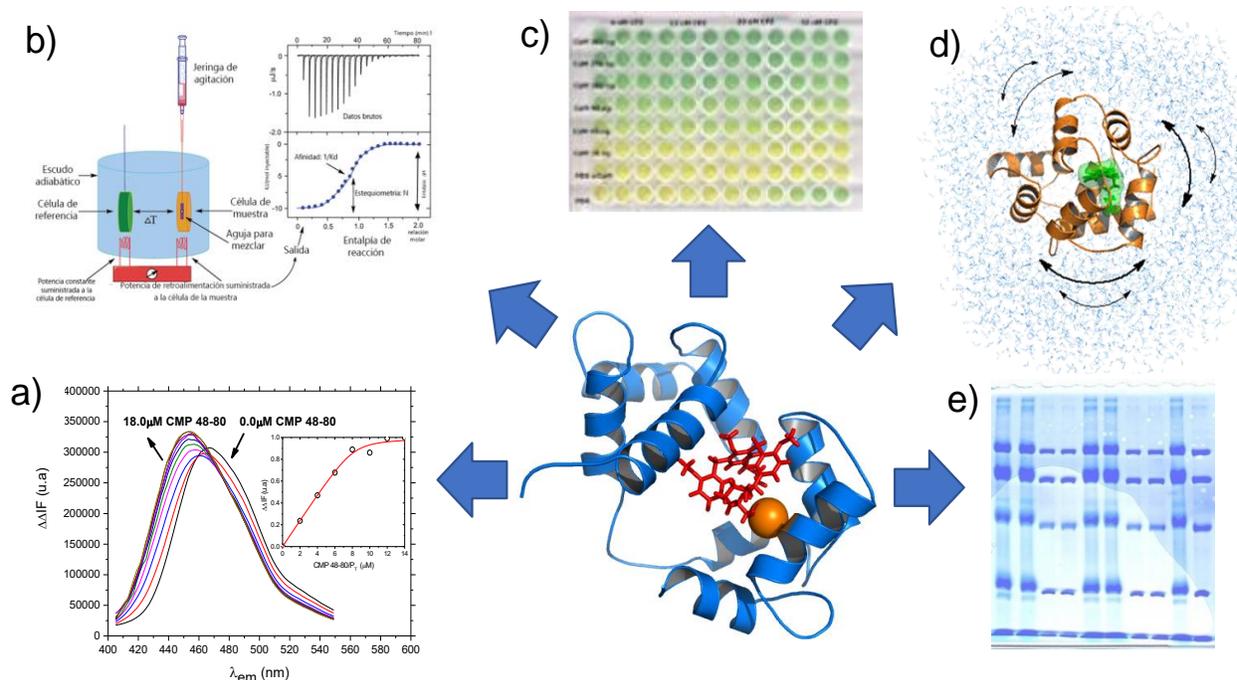


**Amantadina (AMA)**

**Figura 4. Compuestos con propiedades bioactivas para la CaM.**

## MÉTODOS GENERALES UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE BIOMOLÉCULAS Y LIGANDOS

Se han desarrollado diferentes metodologías para estudiar la unión de ligandos a biomoléculas, en el caso particular del complejo CaM-ligando las más utilizadas incluyen: ensayos enzimáticos funcionales, electroforesis en geles de poliacrilamida en estado nativo, cromatografía de afinidad, mutagénesis sitio dirigida, cristalografía de rayos-X, espectroscopia de UV-Visible, dicroísmo circular,<sup>40</sup> espectroscopia de Raman, resonancia magnética nuclear (NMR), calorimetría de titulación isotérmica (ITC),<sup>41</sup> espectroscopia de masas, métodos fluorescentes como transferencia de energía resonante (FRET),<sup>42</sup> métodos computacionales y biosensores fluorescentes.<sup>10, 43</sup> La Figura 5, muestra algunas de la metodologías antes mencionadas. En este trabajo, se utilizaron métodos computacionales y biosensores fluorescentes.



**Figura 5. Técnicas utilizadas para el estudio de las interacciones biomoléculas-ligandos.** a) Ensayos de fluorescencia, b) Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC), c) Ensayos de actividad, d) Métodos *in silico* (Dinámica Molecular), e) Movilidad Electroforética (Nativa).

## MÉTODOS COMPUTACIONALES

### Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)

El acoplamiento molecular se ha convertido en una herramienta cada vez más importante para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Este método se utiliza para modelar la interacción de una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico, lo que nos permite caracterizar el comportamiento de pequeñas moléculas en el sitio de unión de las proteínas de interés y a su vez, explicar los procesos bioquímicos fundamentales.

El proceso de acoplamiento molecular implica dos principales pasos que están relacionados con métodos de muestreo y esquemas de puntuación: 1) la predicción de la conformación del ligando, así como su posición y orientación dentro del sitio de unión; y 2) la evaluación de la afinidad de unión, respectivamente.<sup>44</sup> Por medio de este método, se puede obtener información sobre los sitios probables de unión de ligandos (fármacos) en la proteína diana, en una familia de proteínas similares o con proteínas co-cristalizadas con otros ligandos.

### Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es una simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones de movimiento descritas por Newton.<sup>45</sup> Por medio de este método, se pueden calcular algunas propiedades fisicoquímicas del sistema tales como la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), entropía ( $\Delta S$ ), entalpía ( $\Delta H$ ), solubilidad, viscosidad, presión, temperaturas de cambio de fase, etc., lo cual, permite estimar la afinidad de unión ( $K_d$ ) entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso, describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones de temperatura, presión y grado de solvatación, por mencionar algunas de sus capacidades.<sup>46</sup>

A comparación de otros métodos de simulación molecular al vacío, la DM con solvente explícito nos permite seguir la evolución de dicho sistema a través del tiempo.

Puesto que se pueden monitorear las velocidades de los átomos, calcular la energía cinética y potencial del sistema. Otras de las ventajas de este método son que la DM nos permite observar cambios conformacionales del receptor y del ligando al interactuar entre ellos, siendo de gran utilidad para el diseño de nuevas moléculas prototipo de fármacos.<sup>47</sup> Este tipo de simulación contempla el disolvente (como agua) el cual rodea el complejo proteína-ligando, así como la inclusión de iones para balancear la carga neta del sistema, regular la temperatura o la presión, puede incorporar diferentes entidades químicas (metales, carbohidratos, grupos prostéticos) que usualmente no son consideradas en otros métodos de simulación computacional debido a sus limitaciones en la parametrización de estos. Esto último resulta muy interesante, pues el sistema a analizar adquiere gran representatividad, aunque se debe considerar que la inclusión de estas entidades químicas incrementa la complejidad del sistema de estudio, y en consecuencia el tiempo de computo requerido para la simulación.<sup>48</sup>

## **BIOSENSORES FLUORESCENTES**

Los biosensores son dispositivos biotecnológicos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa y semicuantitativa, conformados por un elemento de reconocimiento biológico (receptor, ácido nucleico, enzima, anticuerpos, entre otros), que interactúa específicamente con un analito y se encuentra asociado a un transductor que nos permite procesar la señal producida de la interacción a un sistema detector, siendo este último de tipo espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. Los biosensores iniciaron su desarrollo y comercialización alrededor de los años 60, orientados a aplicaciones clínicas y de impacto bioquímico. El primer biosensor desarrollado fue un sensor enzimático para determinar la concentración de glucosa en sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa; este biosensor fue diseñado en 1962, acoplado la glucosa oxidasa a un electrodo selectivo de oxígeno.<sup>49</sup>

El interés en el desarrollo de biosensores ha sido particularmente impulsado por el impacto y la precisión analítica de éstos, teniendo un crecimiento vertiginoso de la investigación. También se han promovido por las necesidades de contar con nuevas y mejores herramientas para caracterizar las interacciones que presentan algunas macromoléculas de interés, así como desarrollar a futuro técnicas analíticas rutinarias y

accesibles para el análisis de un gran número de muestras, con selectividad, alta sensibilidad y reproducibilidad.<sup>50</sup>

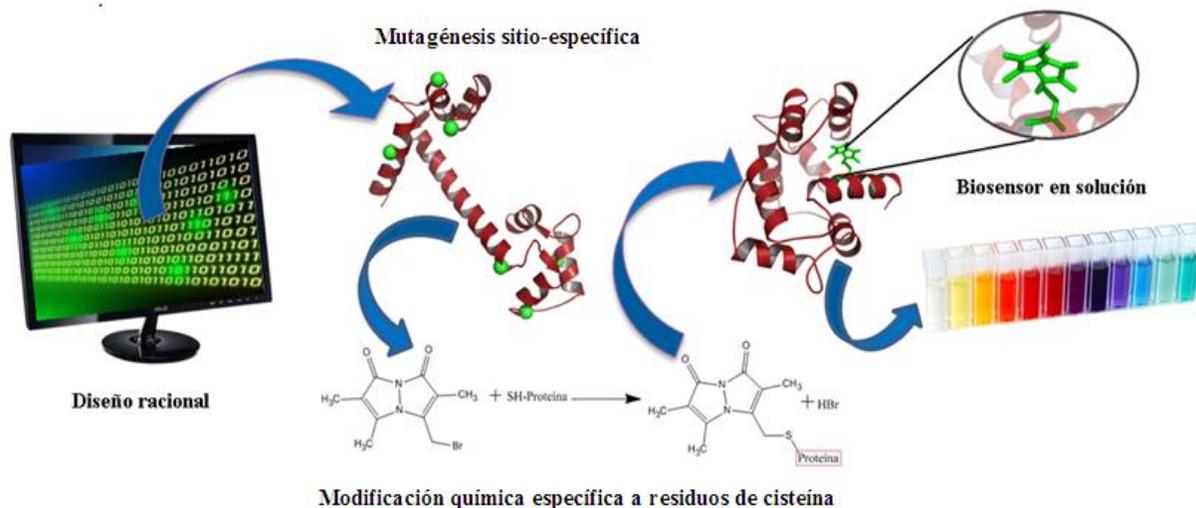
Los biosensores fluorescentes son dispositivos basados en moléculas orgánicas fluorescentes, nanopartículas, proteínas o combinaciones de ambas. Están diseñados para cambiar sus propiedades espectroscópicas (intensidades fluorescentes o corrimientos en la  $\lambda_{\max}$ ) en respuesta a estímulos externos o cambios fisiológicos incluyendo fluctuaciones de pH, homeostasis de iones metálicos, señalización celular, diferencias de potencial de membrana, fosforilación, ubiquitinación, reacciones redox y apoptosis. Un ejemplo de este tipo de desarrollos fue reconocido otorgándole el Premio Nobel de Química 2008 a tres científicos (Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien)<sup>51</sup> quienes descubrieron y desarrollaron la proteína verde fluorescente (GFP, Green Fluorescent Protein), que hoy en día se utiliza para una amplia gama de herramientas.<sup>52</sup>

### **Biosensores fluorescentes de la CaM**

Se han reportado algunos biosensores utilizando como elemento de reconocimiento molecular a la CaM, entre los que se encuentran CaM-Dansyl,<sup>53</sup> CaM-GFP<sup>54</sup> y los reportados por nuestro grupo de trabajo CaM-*mBBR*.<sup>55-57</sup>

La Figura 6, muestra la construcción general de los biosensores fluorescentes, la cual, consta de tres etapas:

- I) Un diseño racional de la posición donde se va a marcar de manera específica a la proteína en cuestión, utilizando herramientas computacionales tales como visualizadores moleculares, datos del área accesible a superficie e información de regiones de interacción, etc.
- II) Mutagénesis sitio-dirigida, en la cual, reemplazamos un aminoácido en particular por un residuo de cisteína y con el grupo tiol altamente reactivo.
- III) Un marcaje sito-específico con compuestos fluorescentes reactivos a los tioles de las cisteínas.



**Figura 6. Procedimiento general para la construcción de biosensores usando un diseño racional, mutagénesis sitio-dirigida y marcaje sitio-específico.**

Los biosensores fluorescentes de la CaM están contruidos con fluoróforos como elemento transductor, el cual, está unido covalentemente a un elemento de reconocimiento molecular (la CaM). En este trabajo, se utilizó el biosensor *hCaM* M124C-*mBBr*, que es altamente sensible y útil en la detección e identificación de la interacción de posibles inhibidores de la CaM, el cual, tiene una eficiencia cuántica de 0.494.<sup>50</sup> En este dispositivo, un fluoróforo llamado monobromobimano (*mBBr*) está químicamente unido en la posición específica 124 de la *hCaM*, este biosensor mantiene las propiedades estructurales y funcionales de la proteína nativa.<sup>50</sup>

Lo interesante de este dispositivo es que permiten detectar la señal fluorescente producida al unir diferentes ligandos a la proteína. Lo anterior, permite determinar afinidades de los ligandos a la CaM a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera dependiente.

## PRINCIPIOS DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es uno de los métodos analíticos más importantes usados en estudios biológicos. Desde la década de 1990, las tecnologías fluorescentes basadas en proteínas se han ampliado y han revolucionado la biología<sup>43</sup> y otras ramas de la ciencia como la bioquímica y la farmacología.

La fluorescencia es una de las categorías de la luminiscencia (la emisión de luz de cualquier sustancia producida a partir de estados excitado electrónicamente), que ocurre típicamente a partir de moléculas aromáticas y se inicia cuando una molécula en estado electrónico basal absorbe un fotón de alta energía, sufriendo una excitación electrónica y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía. Posteriormente, los electrones excitados regresan nuevamente a orbitales de menor energía emitiendo luz de longitud de onda mayor. Un ejemplo de este fenómeno lo lleva a cabo la quinina, un fluoróforo contenido en el agua tónica, que emite luz azul.<sup>58</sup>

### Espectrometría de fluorescencia

La espectrometría de fluorescencia o espectrofluorimetría es el método espectroscópico óptico de mayor sensibilidad usado en mediciones analíticas e investigación científica. Podemos mencionar algunas ventajas tales como: 1) Tiene alto nivel de sensibilidad y el amplio rango dinámico; 2) La instrumentación requerida es conveniente y para la mayoría de propósitos puede adquirirse por un costo razonable y 3) Es un método no destructivo y no requiere grandes cantidades de muestra.

Todos los métodos espectrofotométricos se basan en dos leyes que combinadas se conocen como la ley de Lambert y Beer, en la que se propuso que la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda depende de la cantidad de la especie absorbente con la que se encuentra la luz al pasar por la muestra, según la siguiente ecuación:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = C \epsilon l$$

Donde A= absorbancia, T= transmitancia,  $\epsilon$ = absorptividad molar, c=concentración (mg/L ó mol/L), l: trayectoria de la radiación a través de la muestra (cm)

La energía del fotón de luz absorbido corresponde a la diferencia de energía entre los dos estados. A temperatura ambiente, la energía termal no es adecuada para poblar significativamente los estados excitados. La absorción y la emisión se producen principalmente a partir de moléculas con la energía vibratoria más baja. La diferencia de energía entre los estados  $S_0$  (estado basal) y  $S_1$  (primer estado de singlete) es demasiado grande para poblar termalmente  $S_1$ , y por esta razón se usa luz y no calor para inducir fluorescencia.

En los átomos la absorción involucra la promoción de un electrón de una capa orbital externa hacia un orbital vacío de mayor energía. En moléculas, un electrón es promovido del mayor orbital molecular ocupado (HOMO), al menor orbital molecular desocupado (LUMO). Cuando un electrón en una molécula es trasladado de un orbital a otro, cambia el estado de la molécula y entonces es importante considerar los estados de la molécula involucrados.

Los estados electrónicos de las moléculas excitadas se pueden agrupar en dos categorías: estados singlete y triplete. En los estados excitados singlete, un electrón en un orbital excitado está apareado (spin opuesto) a un segundo electrón en un orbital en el estado basal, es decir, todos los electrones en la molécula tienen sus spins apareados. En consecuencia, el regreso al estado basal es "permitido" por el spin y ocurre rápidamente por emisión de un fotón. Este es el caso de la fluorescencia, y las velocidades de emisión de ésta son típicamente de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , por lo que la vida media de la fluorescencia es cercana a 10 ns. Por otro lado, en los estados excitados triplete un par de electrones tienen sus spins desapareados, esto es el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación que un electrón en el estado basal.

Por otro lado, la fosforescencia es la emisión de luz de estados excitados triplete, en la que el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de spin que el electrón de estado fundamental. Las transiciones al estado fundamental están prohibidas y las velocidades de emisión son lentas ( $10^3$  a  $10^0 \text{ s}^{-1}$ ), de manera que las vidas de fosforescencia son típicamente de milisegundos a segundos. Después de la exposición a la luz, las sustancias de fosforescencia brillan durante varios minutos, mientras que los fósforos excitados vuelven lentamente al estado fundamental. La fosforescencia no suele

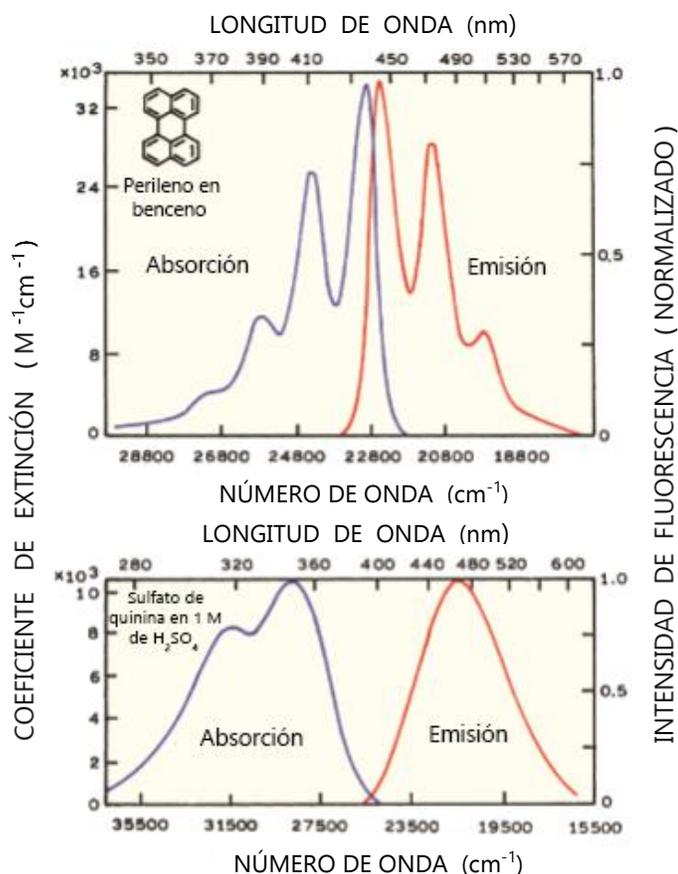
observarse en soluciones fluidas a temperatura ambiente. Esto se debe a que existen muchos procesos de desactivación que compiten con la emisión, tales como los procesos de desintegración no radiativa y apagado. De acuerdo a lo anterior, es importante mencionar que la distinción entre fluorescencia y fosforescencia no siempre es clara.<sup>58</sup>

## **Espectro de fluorescencia**

Un espectro de emisión de fluorescencia es un gráfico de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda (nm) o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), es decir, es la distribución de la longitud de onda de una emisión medida a una sola longitud de onda de excitación constante. Este espectro se observa de manera general independiente de la longitud de onda de excitación (regla de Kasha), aunque existen excepciones, como los fluoróforos que existen en dos estados de ionización, cada uno de los cuales muestra distintos espectros de absorción y emisión.

Por el contrario, un espectro de excitación es la dependencia de la intensidad de emisión, medida a una sola longitud de onda de emisión, al escanear la longitud de onda de excitación. Tales espectros se pueden presentar en una escala de longitud de onda o en una escala de número de onda. La luz de una energía dada se puede describir en términos de su longitud de onda, frecuencia, o número de onda. Las unidades habituales para la longitud de onda son nanómetros, y los números de onda se dan en unidades de  $\text{cm}^{-1}$ . Las longitudes de onda y números de onda son fácilmente interconvertidos tomando el recíproco de cada valor.

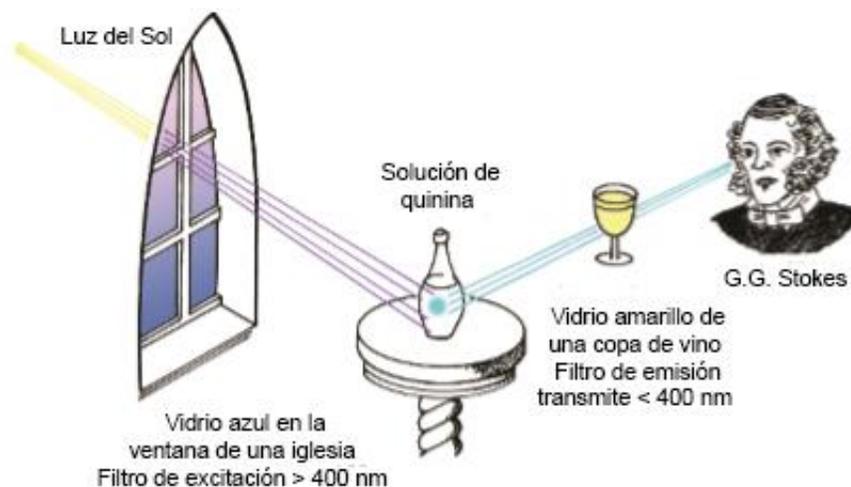
Estos espectros varían ampliamente y dependen de la estructura química del fluoróforo y del disolvente en el que se disuelve. Los espectros de algunos compuestos, como el perileno, muestran una estructura significativa debida a los niveles de energía vibracional individuales de los estados basal y excitado, mientras que otros compuestos, como la quinina, muestran espectros que carecen de la estructura vibracional (Figura 7).



**Figura 7. Espectros típicos de absorción y emisión de fluorescencia, perileno y quinina.** Los espectros de emisión no se pueden presentar correctamente en las escalas de longitud de onda y número de onda. Sin embargo, la presentación del número de onda es correcta en este caso, mientras que las longitudes de onda se muestran por conveniencia. Los espectros de emisión varían ampliamente y dependen de la estructura química del fluoróforo y del disolvente en el que se disuelve. (Figura tomada de *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006. Pág. 4).

En la mayoría de los fluoróforos la emisión es la imagen especular de la absorción  $S_0$  o  $S_1$ , no del espectro total de absorción. De acuerdo con el principio de Franck-Condon, todas las transiciones electrónicas son verticales, es decir, se producen sin cambio en la posición de los núcleos. Como resultado, si una probabilidad de transición particular (factor de Franck-Condon) entre los niveles vibratorios 0 y 1 es mayor en absorción, la transición recíproca también es más probable en la emisión. También según este principio dice que la absorción ocurre tan rápidamente ( $10^{-15}$  s) que no hay tiempo para el movimiento molecular durante el proceso de absorción. Como resultado, la espectroscopia de absorción sólo puede proporcionar información sobre el estado basal medio de las moléculas que absorben la luz. Por el contrario, la emisión de fluorescencia se produce durante un período de tiempo más largo.

La longitud de tiempo que las moléculas fluorescentes permanecen en el estado excitado proporciona una oportunidad para interacciones con otras moléculas en solución. Las mediciones de absorción son sólo sensibles al medio ambiente inmediato alrededor del fluoróforo, y sólo son sensibles al entorno promediado instantáneamente. Como observó Stokes, la mayoría de los fluoróforos muestran emisiones a energías más bajas que su absorción (Figura 8).

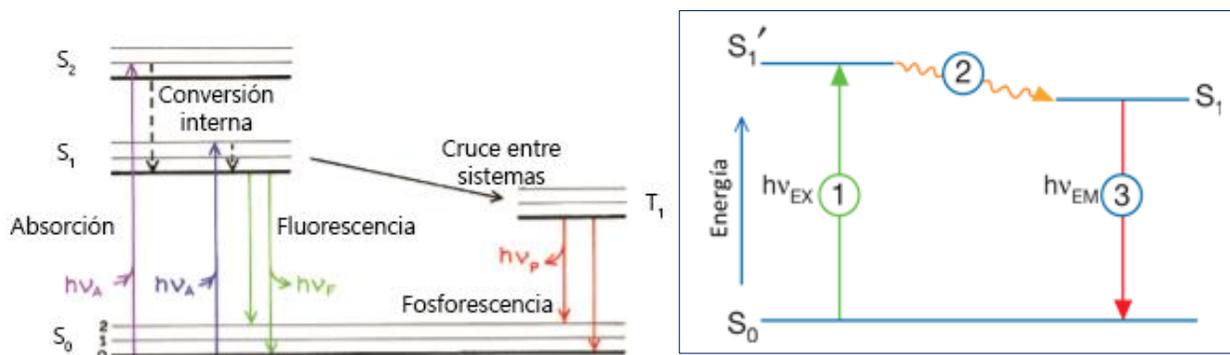


**Figura 8. Esquema experimental para la detección del desplazamiento de Stokes.** Tomada del libro Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2006. Pág. 6

## Fluoróforos y eficiencia cuántica

Los fluoróforos se dividen en dos clases generales intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son los que se encuentran de manera natural en las macromoléculas, como aminoácidos aromáticos o grupos prostéticos. En las proteínas, el fluoróforo dominante es el grupo indol del triptófano (trp), el indol absorbe cerca de 280 nm, y emite alrededor de 340 nm. El espectro de emisión del indol es altamente sensible a la polaridad del disolvente. La emisión del indol puede ser desplazada si el grupo está en el núcleo de una proteína, y su emisión puede cambiar a longitudes de onda más largas cuando este se encuentra accesible al solvente (Por ejemplo, si la proteína se desnaturaliza). Por otro lado, los fluoróforos extrínsecos son aquellos adicionados químicamente a una macromolécula para proveerles fluorescencia cuando éstas carecen de esta propiedad.

El tiempo de vida de la fluorescencia y la eficiencia cuántica son probablemente las características más importantes de los fluoróforos. El tiempo de vida ( $\tau$ ) determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe o difunda en su entorno, y por lo tanto la información disponible de su emisión. La eficiencia cuántica ( $\phi$ ) es un parámetro que relaciona el número de fotones emitidos en relación con el número de fotones absorbidos. Las sustancias con la mayor eficiencia cuántica, aproximándose a la unidad, como las rodaminas, muestran las emisiones más brillantes. Los significados del rendimiento cuántico y la vida útil se representan mejor mediante un diagrama simplificado de Jablonski (Figura 9), llamado así por Alexander Jablonski (padre de la espectroscopía de fluorescencia), el cual, ilustra varios procesos moleculares que pueden ocurrir en estados excitados. Las transiciones radiativas se representan con líneas rectas y las no radiativas con líneas onduladas.<sup>58</sup>



**Figura 9. Diagrama de Jablonski.** A la izquierda, se representan los estados basales, primer excitado singlete y segundo excitado singlete con  $S_0$ ,  $S_1$  y  $S_2$ , respectivamente. Las transiciones entre los estados se dibujan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. Las líneas horizontales numeradas denotan los niveles vibratorios. A la derecha se representan los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de la luz. 1) *Excitación*; se crea un estado excitado ( $S_1'$ ), ya que un fotón de alta energía  $h\nu_{EX}$  es suministrado a una molécula por una fuente externa. 2) *Conversión interna*; las moléculas en las fases condensadas se relajan rápidamente al nivel vibratorio más bajo de  $S_1$ , esto ocurre dentro de  $10^{-12}$  s o menos. Dado que los tiempos de vida de fluorescencia están típicamente próximos a  $10^{-8}$  s, la conversión interna está generalmente completa antes de la emisión. Por lo tanto, la emisión de fluorescencia generalmente resulta de un estado excitado térmicamente equilibrado, es decir, del estado vibratorio de menor energía de  $S_1$ . 3) *Emisión por fluorescencia*: el fotón de energía  $h\nu_{EM}$  es emitido y la molécula retorna a su estado fundamental  $S_0$ . Tomada del libro *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006. Pág. 11

Existen procesos de desactivación del estado excitado o relajación, estos son los procesos radiativos y los procesos no radiativos. Los procesos radiativos se refieren a la disipación de energía en forma de calor. Se habla de procesos no radiativos por los cuales las moléculas en un estado excitado singlete pueden regresar al estado basal sin la

emisión de un fotón, convirtiendo toda la energía de excitación en calor. A éstos se llama conversión interna.

En el caso de las proteínas, es frecuente que éstas se marquen con fluoróforos que tienen longitudes de excitación y emisión más grandes que los aminoácidos aromáticos, una gran variedad de fluoróforos están disponibles comercialmente para modificar químicamente a las proteínas. Las sondas covalentes pueden tener una variedad de grupos reactivos para acoplarse con aminas, sulfhidrilos, o cadenas laterales de las histidinas. La fluoresceína y la rodamina también son usadas como marcadores extrínsecos, ya que no son susceptibles a la polaridad del solvente, además poseen un alto coeficiente de extinción molar cercano a  $80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Típicamente, los fluoróforos tienen un momento dipolar mayor en el estado excitado ( $\mu_E$ ) que en el estado fundamental ( $\mu_G$ ). Después de la excitación, los dipolos pueden reorientarse o relajarse alrededor del  $\mu_E$ , lo que disminuye la energía del estado excitado. A medida que aumenta la polaridad del disolvente, este efecto se hace más grande, dando lugar a la emisión a energías más bajas a longitudes de onda más largas. En general, sólo los fluoróforos polares presentan una gran sensibilidad a la polaridad del disolvente. Las moléculas no polares, tales como hidrocarburos aromáticos no sustituidos, son menos sensibles a la polaridad del disolvente. Los fluoróforos prefieren un ambiente menos polar, lo cual, les brindaría más energía.

Parker y Rees determinaron las eficiencias cuánticas de la fluoresceína, eosina, rodamina B, tionina y antraceno usando bisulfato de quinina como compuesto de referencia con un valor de 0.55 para su eficiencia cuántica absoluta.<sup>59</sup> Estas eficiencias se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Eficiencia cuántica de fluorescencia con referencia al bisulfato de quinina**

Solución	Eficiencia cuántica $\phi$	Valores reportados en la literatura
Bisulfato de quinina en 0.1 N de ácido sulfúrico	0.55	0.55
Rodamina B en etanol	0.69	0.97
Fluoresceína en 0.1 N de hidróxido de sodio	0.85	0.92 0.78 0.84 0.85
Eosina en 0.1 N de hidróxido de sodio	0.23	0.19
Antraceno en etanol	0.28	0.26
Tionina en 0.1 N de ácido sulfúrico	0.024	-

En nuestro caso, utilizamos en la celda de referencia del espectrofluorómetro una solución de rodamina en etanol, ya que ésta es soluble en dicho solvente, además de que es un fluoróforo que tiene la capacidad de excitar y emitir a muchas longitudes de onda con un alto rendimiento cuántico, aproximándose a la unidad con una eficiencia cuántica de 0.97, mostrando las emisiones más brillantes. Por otro lado, el biosensor que utilizamos tiene una eficiencia cuántica de  $\phi=0.494$ .<sup>60</sup>

### Anisotropía de fluorescencia

Las mediciones de anisotropía se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos por luz polarizada y proporcionan información sobre el tamaño y la forma de las proteínas o la rigidez de diversos ambientes moleculares. Mediciones de anisotropía ( $r$ ) se han utilizado para medir las asociaciones proteína-proteína, la fluidez de las membranas, y para inmunoensayos competitivos de numerosas sustancias en los que el analito real desplaza el analito marcado que está unido a un anticuerpo específico donde el analito provoca un cambio en la anisotropía de la etiqueta. Esto da lugar a una disminución de la anisotropía. Los valores de anisotropía se calculan utilizando la relación de mediciones de intensidad polarizada. El uso de una relación de intensidad hace que las mediciones de anisotropía sean independientes de la concentración del fluoróforo, siempre y cuando las mediciones no se distorsionen por autofluorescencia o señal-ruido pobre.<sup>58</sup>

## Apagamiento colisional

Es un proceso bimolecular dependiente del “contacto” entre la molécula excitada y el apagador (quencher). Es un proceso de difusión controlada que requiere que el tiempo de vida del estado excitado sea mayor de  $10^{-9}$  s. Básicamente hay dos mecanismos por los cuales la pérdida “colisional” de la energía de excitación puede ocurrir: intensificación del cruzamiento intersistemas por el apagador, o transferencia de electrones. Una gran variedad de moléculas puede actuar como apagadores colisionales, que incluyen oxígeno, halógenos, aminas y moléculas deficientes de electrones como la acrilamida. El mecanismo de apagamiento varía con el par fluoróforo-apagador.<sup>58</sup>

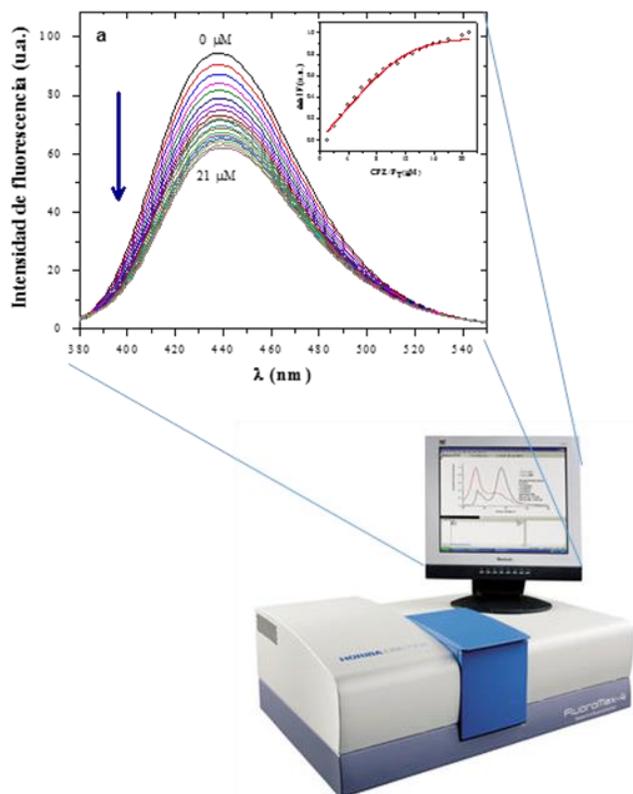
## Efectos sobre el espectro de absorción

- 1) Efecto batocrómico: Desplazamiento a mayor longitud de onda, es decir, a menor frecuencia. ( $\uparrow$  de  $\lambda_{\max}$ )
- 2) Efecto hipsocrómico: Desplazamiento a menor longitud de onda, es decir, a mayores frecuencias. ( $\downarrow$  de  $\lambda_{\max}$ )
- 3) Efecto hiperocrómico: Desplazamiento a mayor intensidad. ( $\uparrow$  de la absorbancia)
- 4) Efecto hipocrómico: Desplazamiento a menor intensidad. ( $\downarrow$  de la absorbancia)

## Espectrofluorómetros

En este equipo se mide principalmente la transmitancia de compuestos que emiten un determinado tipo de radiación al ser excitados o irradiados por una luz con una longitud de onda concreta. Con este equipo es posible registrar ambos espectros de emisión y excitación. La mayor parte de la instrumentación comercialmente disponible produce espectros en la escala de longitud de onda, y tales espectros son más familiares y más fáciles de interpretar visualmente (Figura 10).

Para un instrumento ideal, los espectros de emisión directamente registrados deben representar la tasa de emisión de fotones o la potencia emitida a cada longitud de onda, en un intervalo de longitud de onda determinado por las anchuras de la rendija y la dispersión del monocromador de emisión. De forma similar, el espectro de excitación representaría la emisión relativa del fluoróforo en cada longitud de onda de excitación.



**Figura 10. Espectrofluorímetro y espectro de fluorescencia.** representación de un espectrofluorímetro y a su vez, el tipo de espectros que se obtienen a partir de dicho equipo, siendo la intensidad de fluorescencia (u.a) con respecto a la longitud de onda emitida (nm).

Para la mayoría de los fluoróforos, los rendimientos cuánticos y los espectros de emisión son independientes de la longitud de onda de excitación. Como resultado, el espectro de excitación de un fluoróforo puede ser superponible en su espectro de absorción. Sin embargo, estos espectros de absorción y excitación idénticos se observan raramente porque la intensidad de excitación es diferente en cada longitud de onda. Los espectros de emisión registrados en diferentes instrumentos pueden ser diferentes debido a las sensibilidades dependientes de la longitud de onda de los instrumentos.<sup>58</sup>

El espectrofluorómetro que nosotros utilizamos cuenta con los siguientes componentes:

- 1) **Fuente de luz:** Es necesario el uso de una fuente que tenga una salida relativamente alta, ya que los fotones correspondientes a la fluorescencia que pasan a través del monocromador de emisión son una pequeña fracción del total de la intensidad. En nuestro caso, se utilizó una lámpara de arco de xenón de alta

presión, ya que produce un espectro continuo de alta intensidad (200-1000 nm). Además, emiten luz como resultado de la recombinación de electrones con átomos ionizados de xenón, los cuales, son generados por la colisión de los átomos de xenón con los electrones que fluyen a través del arco.

- 2) **Selector de longitud de onda:** La  $\lambda$  de fluorescencia es usualmente seleccionada a través de un monocromador de alta eficiencia para maximizar la habilidad de detectar bajos niveles de luz y así, evitar problemas debidos a la dispersión. La eficiencia puede ser maximizada eligiendo el "ángulo de brillo" (*blaze angle*), el cual es determinado por la forma y ángulo de la herramienta usada para generar la rejilla. Para la calibración se utiliza una lámpara de baja presión de mercurio que tiene la forma de un pequeño cilindro de 5 mm de diámetro y se ajusta en el contenedor de la celda mediante un bloque que tiene la forma de la celda.
- 3) **Filtros ópticos:** Sirven para minimizar la interferencia debida a la dispersión y desviación de la luz.
- 4) **Celdas:** tienen las cuatro caras lisas, ya que en la mayoría de los instrumentos los fotones son detectados en un ángulo de  $90^\circ$  con respecto al haz de incidencia. La geometría de  $90^\circ$  es usada para minimizar cualquier interferencia en la detección de la luz fluorescente. En la mayoría de los casos las celdas están elaboradas de silica fusionada (cuarzo) pero si la longitud de onda de excitación y fluorescencia se encuentran sobre 300 nm se pueden utilizar celdas de plástico. Los procesos de desactivación de  $S_1(0)$  son usualmente dependientes de altas temperaturas por lo tanto el contenedor de la celda debe de ser termoestable.
- 5) **Detectores:** Casi todos los espectrofluorímetros usan tubos fotomultiplicadores (TFM), considerados los mejores como fuente de corriente, la cual es proporcional a la intensidad de la luz. Un TFM consiste en un fotocátodo y una serie de electrodos (dynodes), los cuales, son etapas de amplificación, que transforman la energía de luz en números y amplifica, detectando el número de fotones por unidad de tiempo.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar las interacciones a nivel molecular de cinco compuestos bioactivos para la CaM, experimental y teóricamente, utilizando un biosensor fluorescente de CaM y herramientas de modelaje molecular para contribuir al diseño y desarrollo de nuevos fármacos anti-CaM.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Revisión bibliográfica de las moléculas bioactivas Trifluperazina (TFP), Compuesto 48/80 (CMP 48-80), Fluperazina (FPZ), Rutenio rojo (RRU) y la serie "W").
2. Determinar las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) de las moléculas bioactivas en función del grado de saturación de calcio, utilizando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBR*.
3. Construcción de estructuras tridimensionales de los compuestos.
4. Realizar el acoplamiento molecular de los compuestos con la CaM, utilizando el software AutoDock4.
5. Realizar estudios de dinámica molecular de los complejos CaM-ligando, utilizando el programa *Amber 14*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la CaM por fluorescencia

La determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) 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 compuesto de 2 mM en Tris 50 mM, pH 7.0 a 25 °C. La  $\lambda_{ex}$  del biosensor de CaM fue de 381 nm y la  $\lambda_{em}$  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  $\lambda_{max}$  en función de la concentración del compuesto a evaluar, utilizando la siguiente ecuación:

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

donde  $P_0$  y  $L_0$  es la concentración de proteína y ligando presentes,  $K_d$  es la constante de disociación.

## **Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)**

Este proceso se realizó con el algoritmo genético Lamarckian (LGA), utilizando los parámetros recomendados inicialmente a excepción del número de evaluaciones, el cual fue de 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 fueron los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) sobre el sistema operativo UNIX en el nuevo equipo de supercómputo de la UNAM (Miztli supercomputer).

## **Dinámica molecular (DM)**

Se utilizó el programa *Amber*, un software que permite que todos los átomos de un sistema vibren y se trasladen por un período de tiempo, integrando las ecuaciones de movimiento de Newton, bajo un campo potencial empírico que aproxima las energías de los sistemas moleculares representando los átomos como esferas cargadas y los enlaces como resortes con propiedades especiales. Los sistemas se parametrizaron para predecir propiedades energéticas y estadísticas de los sistemas, a la vez que aportan información sobre la conformación y estabilidad de los mismos en solución; en nuestro caso, de la interacción CaM-ligando. Cada complejo CaM-ligando se preparó utilizando el módulo LEaP a partir del programa *Amber*, donde se adicionaron todos los hidrógenos de los aminoácidos y se neutralizó el sistema con Na<sup>+</sup>, posteriormente el complejo se solvató en una caja octahedra de moléculas de agua con el modelo explícito TIP3P localizada a 12 Å a partir de la superficie de la proteína (ver apéndice).

Las simulaciones fueron realizadas a una presión de 1 atm y 298.15 K. A continuación, la Dinámica Molecular (DM) consistió en una etapa de minimización de la estructura inicial, seguido de 50 ps de calentamiento desde 0 a 298.15 K, 50 ps para equilibrar el volumen, 500 ps para equilibrar el sistema a una presión de 1 atm y finalmente un tiempo de 20 ns. Después de terminar la Dinámica Molecular se analizaron los resultados con el protocolo de MM/PBSA en modos normales para obtener los parámetros energéticos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudios de unión de los diferentes ligandos con la CaM, utilizando el biosensor *hCaM M124C-mBBR*

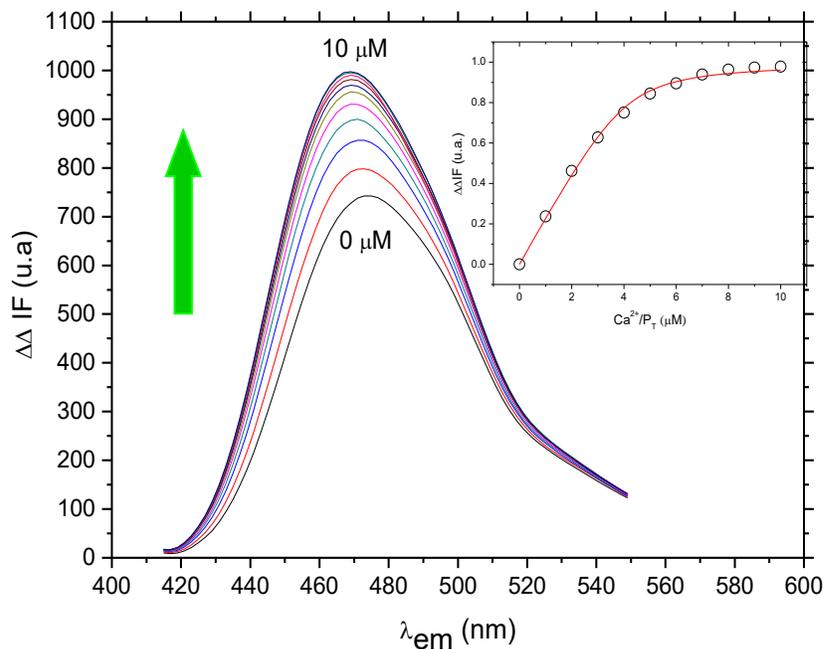
En este trabajo se estudiaron cinco compuestos prototipos y fármacos anti-CaM [Trifluperazina (TFP), Compuesto 48-80 (CMP 48/80), Fluperazina (FPZ), Rutenio rojo (RRU) y una serie nombrada "W" (W5, W5I, W7, W7I, W12 y W13)], utilizando a la Amantadina (AMA) y a la Trifluperazina (TFP) como control negativo y control positivo, respectivamente. Se obtuvieron parámetros de unión por medio de las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) de los complejos  $Ca^{2+}$ -CaM-ligando en función del grado de saturación de  $Ca^{2+}$  (número de equivalentes de  $Ca^{2+}$ ) que une la CaM.

La Tabla 2, muestra los datos experimentales y teóricos obtenidos para cada uno de los complejos estudiados. Todos los ligandos muestran una constante de disociación ( $K_d$ ) en el rango  $\mu M$  a saturación de  $Ca^{2+}$ , congruente con la literatura. Sin embargo, nosotros determinamos  $K_{ds}$  experimentales con diferentes grados de saturación de  $Ca^{2+}$ , observando una diferencia de afinidades en función de los equivalentes del ion  $Ca^{2+}$ . En general, al saturar la CaM con  $Ca^{2+}$  ( $4Ca^{2+}$ -CaM) se observa una mayor afinidad para los compuestos Compuesto 48-80 (CMP 48/80), Trifluperazina (TFP) y Rutenio rojo (RRU), solo para la Fluperazina (FPZ) la  $K_d$  es independiente del grado de saturación de  $Ca^{2+}$ .

Una de las ventajas de utilizar el biosensor *hCaM M124C-mBBR* para este estudio, es que este dispositivo tiene la capacidad de monitorear más de un ligando a la vez en nuestro caso el ion calcio y los diferentes ligandos. Lo anterior nos permite calcular sus respectivas  $K_{ds}$  de los ligandos a diferentes equivalentes de  $Ca^{2+}$  de manera dependiente. Este biosensor es altamente sensible con una eficiencia cuántica de 0.494, lo que permite realizar determinaciones cuantitativas minimizando los errores estadísticos.

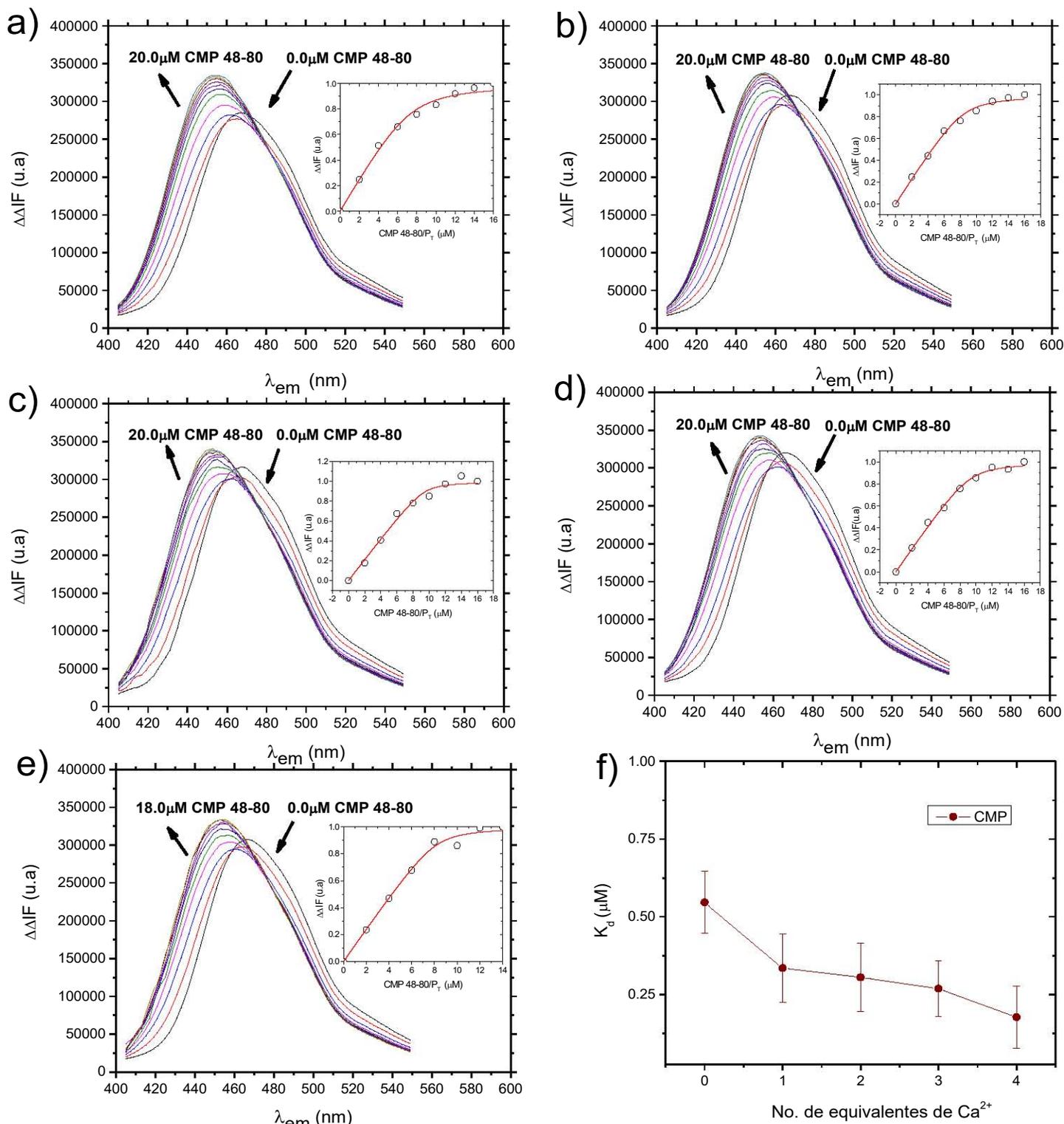
## Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con calcio

La Figura 11, muestra la titulación del biosensor fluorescente con calcio, observando un aumento en la intensidad de fluorescencia en función del grado de saturación con calcio (efecto hipercrómico), la constante de disociación ( $K_d$ ) calculada es de  $2.35 \times 10^{-6}$  M con una estequiometría de 4.18. La proteína posee 4 sitios de unión a calcio dos de alta afinidad (sitio III y IV) y otros dos de baja afinidad (sitios I y II), los cuales se han reportado que se unen de manera secuencial.<sup>61</sup> En nuestro caso, calculamos las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) con diferentes equivalentes hasta la concentración saturante del biosensor, es decir, con 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10  $\mu\text{M}$  de calcio.



**Figura 11.** Espectros de fluorescencia de la titulación del biosensor *hCaM-M124C-mBBr* con  $\text{Ca}^{2+}$ , en el gráfico muestra el ajuste de unión.

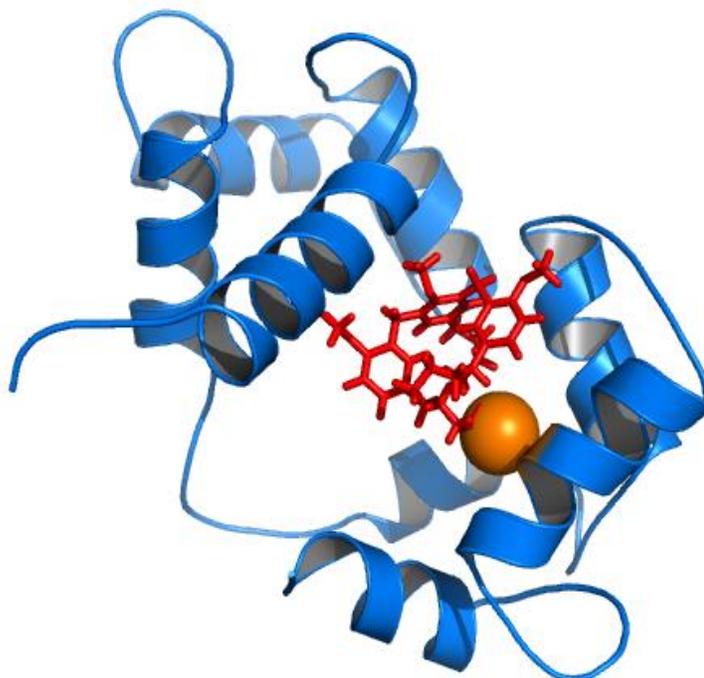
## Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Compuesto 48-80



**Figura 12.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hCaM M124-mBBr* con Compuesto 48-80 (CMP 48-80). a) *hCaM M124-mBBr* con CMP 48-80 sin Ca<sup>2+</sup>, para los espectros b, c, d, e) *hCaM M124-mBBr* con CMP 48/80 con uno, dos, tres y cuatro equivalentes de Ca<sup>2+</sup>, respectivamente. El re-gráfico muestra la titulación con CMP 48/80, la línea sólida muestra el ajuste realizado. Se utilizó Tris a 50mM (pH 7.0), *hCaM M124-mBBr* a 332.0 μM, CaCl<sub>2</sub> a 0.5 mM, λ<sub>ex</sub>=381 nm, λ<sub>em</sub>= 405-550 nm. f) Tendencia de las K<sub>ds</sub> obtenidas con respecto a cada equivalente de Ca<sup>2+</sup> para el Compuesto 48/80 (CMP 48-80).

## Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción del Compuesto 48/80 con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr

La Figura 12 muestra los espectros de fluorescencia de las diferentes titulaciones del Compuesto 48/80 (CMP 48-80) con el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr* y su respectivo re-gráfico. Este re-gráfico muestra las diferencias de intensidad de fluorescencia con respecto a la relación de la concentración de ligando entre la proteína total, el ajuste nos calcula la constante de disociación ( $K_d$ ) del mismo. Los espectros presentan un aumento (alrededor del 8.00 %) en la intensidad de fluorescencia (efecto hiperocrómico) y un ligero desplazamiento (3.00 %) hacia menores longitudes de onda (efecto hipsocrómico). Este comportamiento puede deberse a la interacción directa del Compuesto 48/80 (CMP 48-80) con la CaM, donde el cambio conformacional favorece por un lado el ambiente hidrófobo de CaM y por otro, puede haber una conjugación del fluoróforo *mBBr* con el Compuesto 48/80 (CMP 48-80) como se puede visualizar en el modelo estructural del biosensor *hCaM M124C-mBBr* con el Compuesto 48/80 (CMP 48-80) (Figura 13).

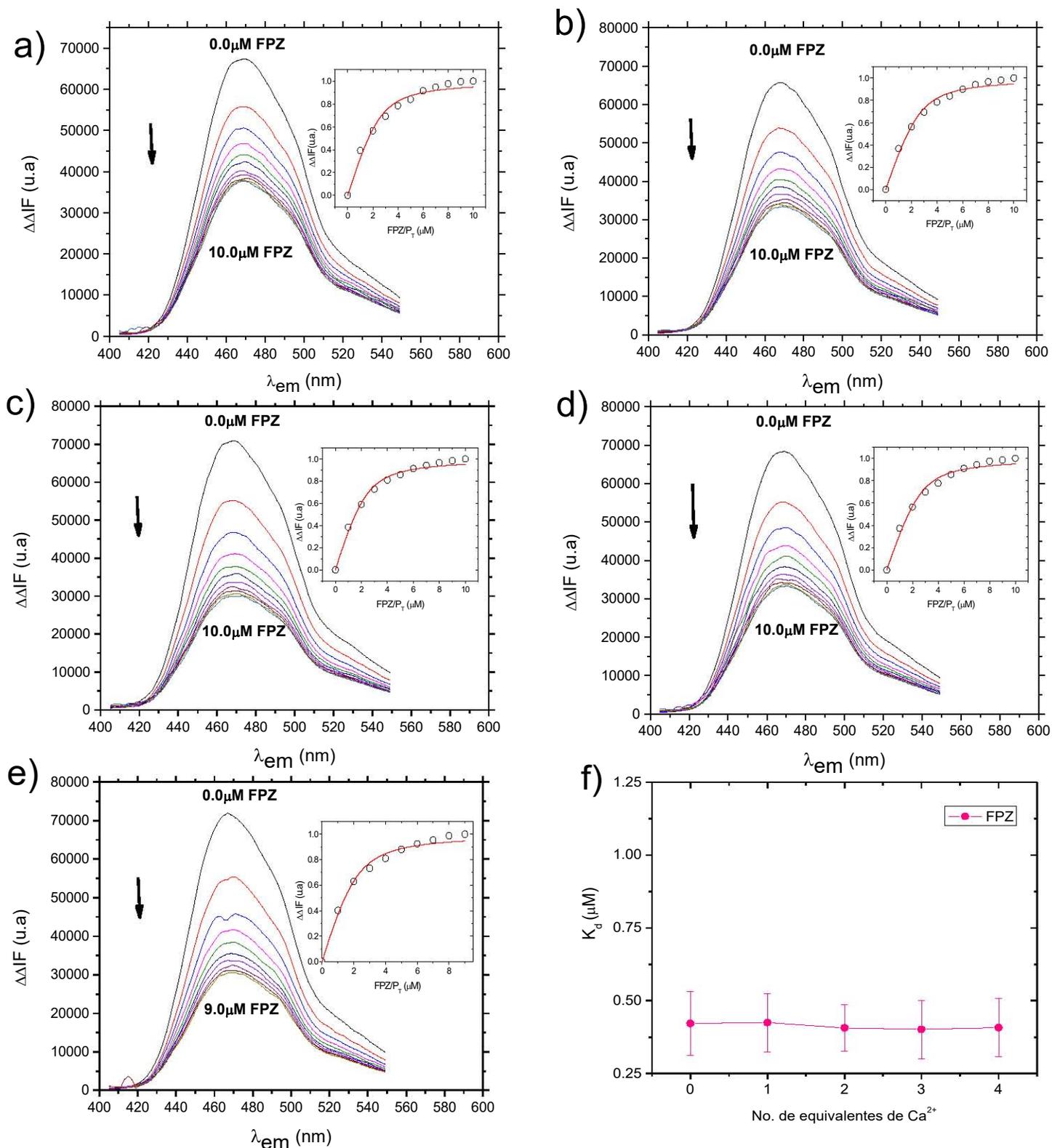


**Figura 13.** Modelo estructural del complejo CaM-CMP 48-80. En color azul se representa a la CaM, de color rojo el Compuesto 48/80 (CMP 48-80) y finalmente con la esfera naranja se representa el fluoróforo mBBr.

La Figura 12 f), muestra la tendencia general de la constante de disociación ( $K_d$ ) en función de los equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde se observa una disminución de la  $K_d$  en función del número de equivalentes de calcio adicionado, es decir, hay un aumento en la afinidad del Compuesto 48/80 por la CaM. Las  $K_{ds}$  calculadas se encuentran en el rango de 0.18-0.54  $\mu\text{M}$ , lo que representa un aumento de aproximadamente tres veces entre 0 y 4 equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Datos reportados en la literatura para el complejo CaM-CMP 48-80 indican que existe una inhibición de tipo competitiva al menos para los complejos CaM-PDE y CaM-ATPasa con una  $\text{IC}_{50}$  de 0.3 y 0.83  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Cabe mencionar que la  $\text{IC}_{50}$  es un parámetro farmacológico utilizado para estimar la potencia de un fármaco en ciertas condiciones particulares (temperatura, concentración, pH, etc.), por lo tanto, los datos anteriores no son del todo comparables con las  $K_{ds}$  calculadas en este trabajo, ya que esta última representa un parámetro de unión medido directamente entre la CaM y el compuesto, el cual, nos refleja la afinidad del ligando por la CaM.

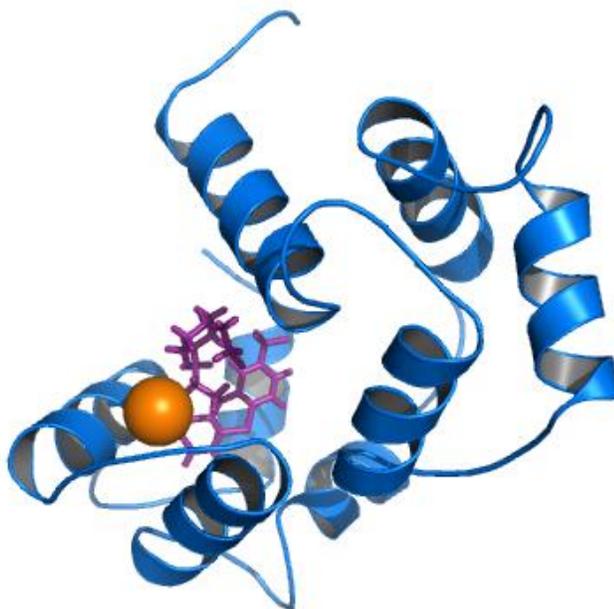
## Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Fluperazina (FPZ)



**Figura 14.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hCaM M124-mBBr* con Fluperazina (FPZ). a) *hCaM M124-mBBr* con FPZ sin  $\text{Ca}^{2+}$ , para los espectros b, c, d, e) *hCaM M124-mBBr* con FPZ con uno, dos, tres y cuatro equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente. El re-gráfico muestra la titulación con FPZ, la línea sólida muestra el ajuste realizado. Se utilizó Tris a 50mM (pH 7.0), *hCaM M124-mBBr* a 332.0  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  a 0.5 mM,  $\lambda_{ex}=381$  nm,  $\lambda_{em}=405-550$  nm. f) Tendencia de las  $K_d$ s obtenidas con respecto a cada equivalente de  $\text{Ca}^{2+}$  para la Fluperazina (FPZ).

## Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de la Fluperazina (FPZ) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr

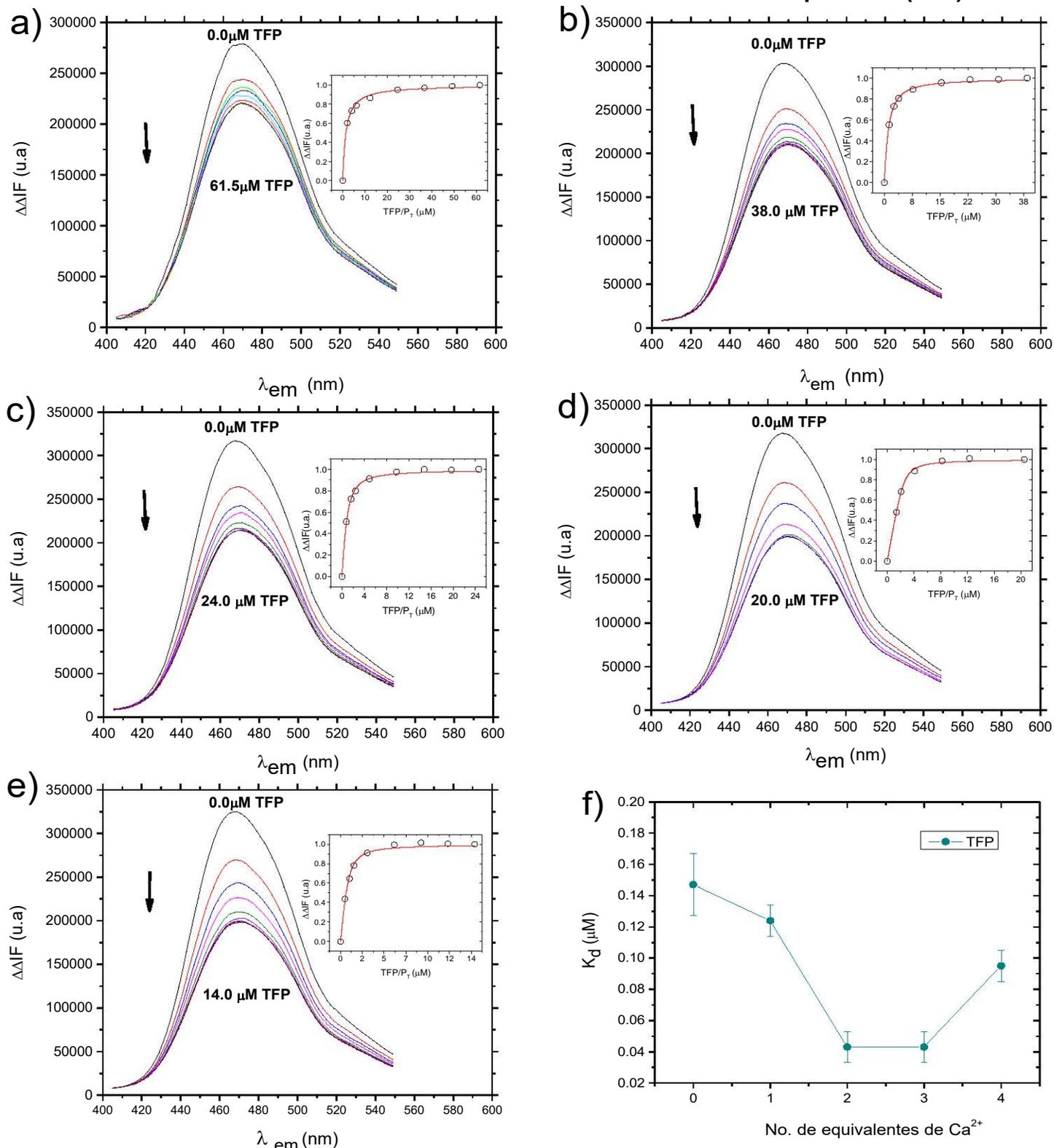
La Figura 14, muestra los espectros de fluorescencia de las diferentes titulaciones de la Fluperazina (FPZ) con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* y sus respectivos re-gráficos. Los espectros muestran una disminución aproximadamente del 57.55 % en la intensidad de fluorescencia (efecto hipocrómico) hasta su saturación con la Fluperazina (FPZ). Este ligando no desplaza la  $\lambda_{\max}$  (efecto batocromico o hipsocrómico) como el caso del Compuesto 48-80 (CMP 48/80). Este comportamiento puede ser atribuido a que la Fluperazina (FPZ) interacciona directamente con el fluoróforo (*mBBr*), como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Modelo estructural del complejo CaM-FPZ. En color azul se representa a la CaM, en color morado al ligando Fluperazina (FPZ) y con la esfera de color naranja el fluoróforo *mBBr* del biosensor en la posición 124 de la proteína.

La Figura 14 f), muestra la tendencia general de la  $K_d$  en función de los equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde no se observa un cambio significativo. Por lo que podemos decir que la Fluperazina (FPZ) tiene una afinidad por la CaM independiente del grado de saturación de calcio en la CaM. Las  $K_{ds}$  calculadas tiene un valor aproximado de  $0.4 \mu\text{M}$ , datos reportados para el complejo CaM-FPZ indican que existe una inhibición para el complejo CaM-PDE con una  $\text{IC}_{50}$  de  $10 \mu\text{M}$ .

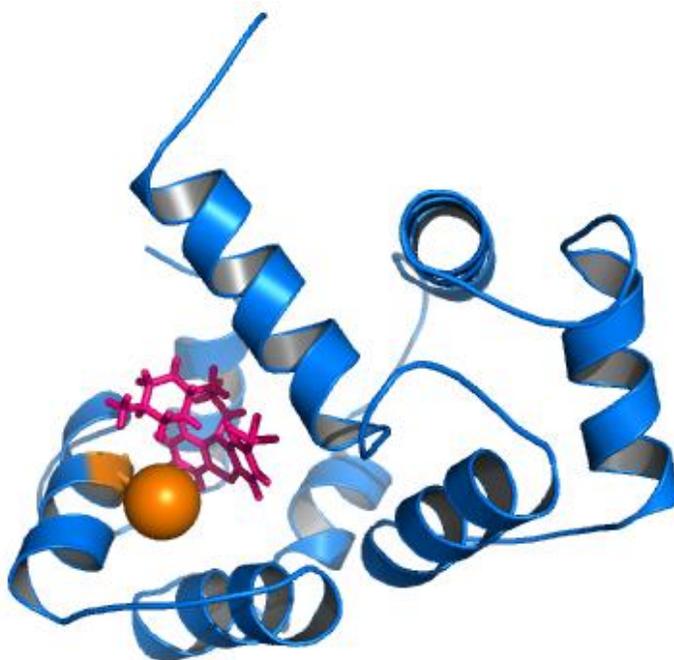
## Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con Trifluperazina (TFP)



**Figura 16.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hCaM M124-mBBr* con la Trifluperazina (TFP). a) *hCaM M124-mBBr* con la TFP sin Ca<sup>2+</sup>, para los espectros b, c, d, e) *hCaM M124-mBBr* con TFP con uno, dos, tres y cuatro equivalentes de Ca<sup>2+</sup>, respectivamente. El re-gráfico muestra la titulación con TFP, la línea sólida muestra el ajuste realizado. Se utilizó Tris a 50 mM (pH 7.0), *hCaM M124-mBBr* a 332.0 μM, CaCl<sub>2</sub> a 0.5 mM, λ<sub>ex</sub>=381 nm, λ<sub>em</sub>= 405-550 nm. f) Tendencia de las K<sub>d</sub>'s obtenidas con respecto a cada equivalente de Ca<sup>2+</sup> para la TFP.

## Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de la Trifluperazina (TFP) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr

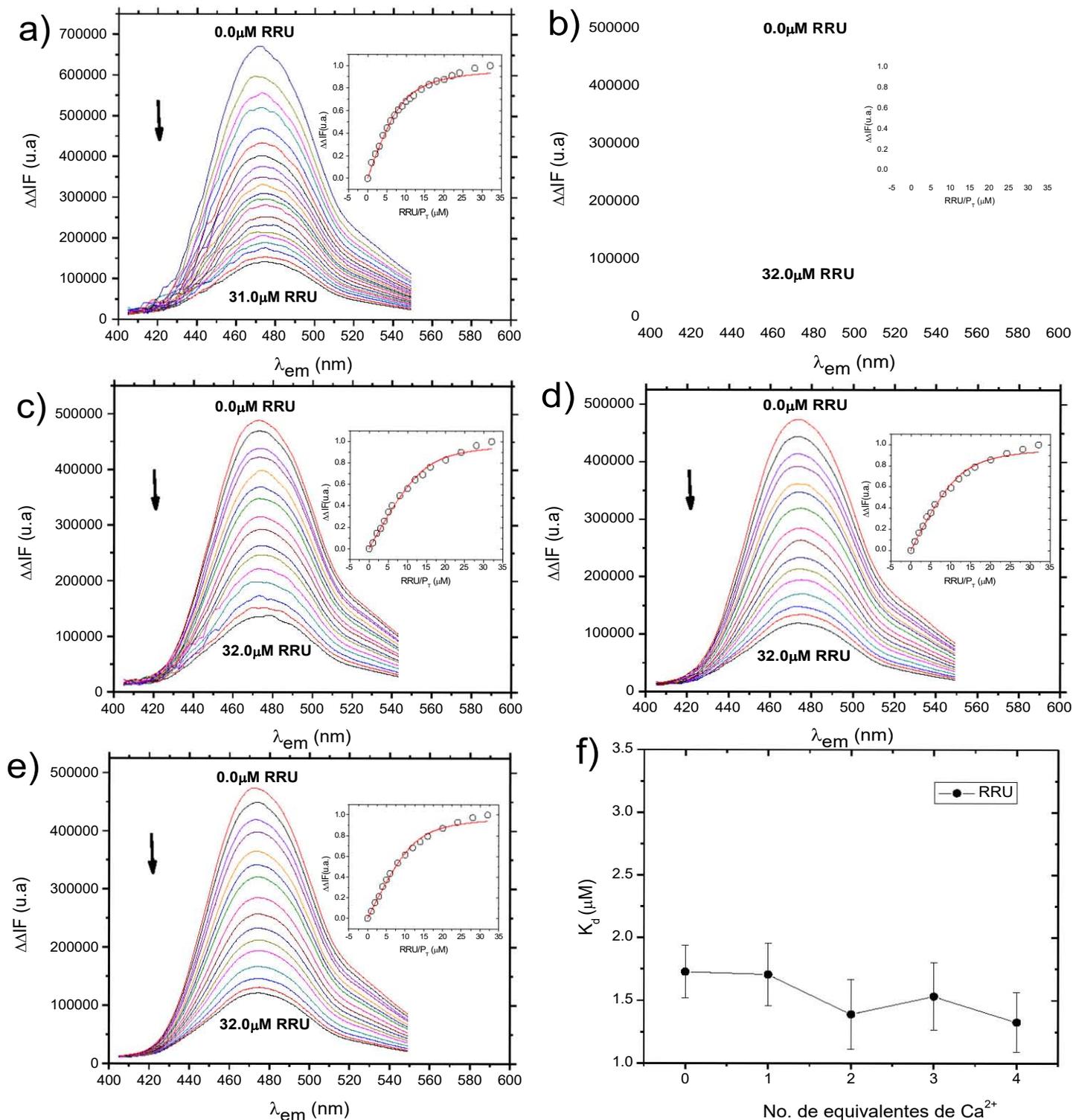
La Figura 16, muestra los espectros de fluorescencia de las diferentes titulaciones del compuesto Trifluperazina (TFP) con el biosensor fluorescente *hCaM M124-mBBr* y su respectivo re-gráfico obteniendo por medio del ajuste la constante de disociación ( $K_d$ ) de la Trifluperazina (TFP) para cada equivalente de  $Ca^{2+}$ . Los espectros de fluorescencia muestran una disminución (38.60 %) en la intensidad de fluorescencia (efecto hipocrómico) hasta saturación. Este efecto puede ser atribuido al cambio del microambiente del fluoróforo *mBBr* y a la interacción directa de la Trifluperazina (TFP) con el *mBBr* (Figura 17).



**Figura 17.** Estructura del complejo CaM-TFP. De color azul se representa a la CaM, mientras que de color magenta a la Trifluperazina (TFP) y finalmente con la esfera de color naranja se representa al fluoróforo *mBBr* del biosensor en la posición 124 de la CaM.

La Figura 16 f), muestra la tendencia en general de las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) en función de los equivalentes de  $Ca^{2+}$ , donde observamos una disminución directamente proporcional de la constante de disociación ( $K_d$ ) con respecto al número de equivalentes de calcio, es decir, hay un aumento en la afinidad a saturación de calcio. Las  $K_{ds}$  estimadas se encuentran en el rango de 0.62-5.23  $\mu$ M, observando un aumento en la afinidad y/o estabilidad de unión del complejo  $Ca^{+2}$ -CaM-TFP.

## Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr con el Rutenio rojo (RRU)

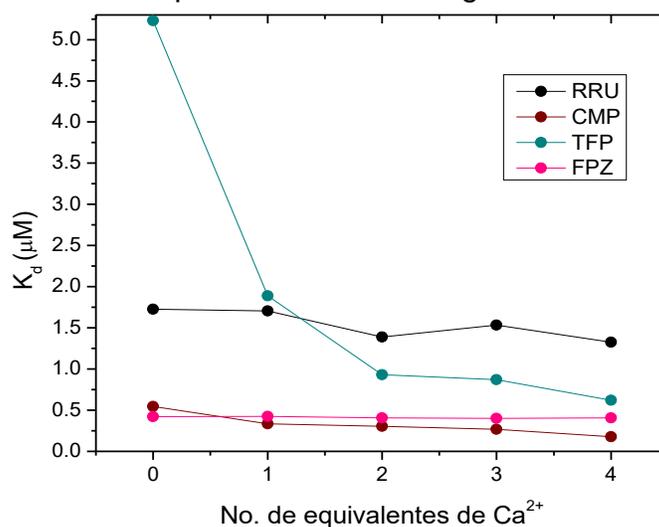


**Figura 18.** Espectros de fluorescencia y curvas de titulación de *hCaM M124-mBBr* con el Rutenio rojo (RRU). a) *hCaM M124-mBBr* con el Rutenio rojo (RRU) sin Ca<sup>2+</sup>, para los espectros b, c, d, e) *hCaM M124-mBBr* con el Rutenio rojo (RRU) con uno, dos, tres y cuatro equivalentes de Ca<sup>2+</sup>, respectivamente. El re-gráfico muestra la titulación con el Rutenio rojo (RRU), la línea sólida muestra el ajuste realizado. Se utilizó Tris a 50 mM (pH 7.0), *hCaM M124-mBBr* a 332.0 μM, CaCl<sub>2</sub> a 0.5 mM, λ<sub>ex</sub>=381 nm, λ<sub>em</sub>=405-550 nm. f) Tendencia de las K<sub>d</sub>'s obtenidas con respecto a cada equivalente de Ca<sup>2+</sup> para el Rutenio rojo (RRU).

## Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción del Rutenio rojo (RRU) con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBR

La Figura 18, muestra los espectros de fluorescencia de las diferentes titulaciones del compuesto Rutenio rojo (RRU) con el biosensor fluorescente *hCaM M124-mBBR* y su respectivo re-gráfico obteniendo una constante de disociación ( $K_d$ ) del RRU de acuerdo con el grado de saturación de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio del modelo de ajuste realizado. Los espectros presentan una disminución o apagamiento de la intensidad de fluorescencia (alrededor del 74.33 %). Este comportamiento puede ser atribuido a los mismos fenómenos que en los casos anteriores, adicionando un efecto de apagamiento de tipo iónico.

La tendencia general de la constante de disociación ( $K_d$ ) en función de los equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 18 f), muestra una disminución directamente proporcional al número de equivalentes de calcio. Las  $K_{ds}$  estimadas se encuentran en el rango de 1.32-1.72  $\mu\text{M}$ , observando una disminución en la  $K_d$  de un poco menos de la mitad de equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , aparentemente esta la diferencia es mínima, pero a nivel celular estas diferencias pueden ser críticas para activar o inhibir alguna ruta metabólica. Datos reportados en la literatura para el complejo CaM-RRU indican que la inhibición de la CaM con Rutenio rojo (RRU) tiene un mecanismo diferente y reportan una  $\text{IC}_{50}$  de 15  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, cabe mencionar que las técnicas o métodos utilizados son enzimáticos, es decir, métodos indirectos en el que concluyen que el Rutenio rojo (RRU) puede tener diferentes sitios de unión a comparación de los antagonistas clásicos reportados.<sup>34</sup>



**Figura 19.** Tendencia general de las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) de los compuestos estudiados en función del número de equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **Efecto de la concentración de calcio sobre la interacción de cada ligando con el biosensor fluorescente hCaM-M124-mBBr**

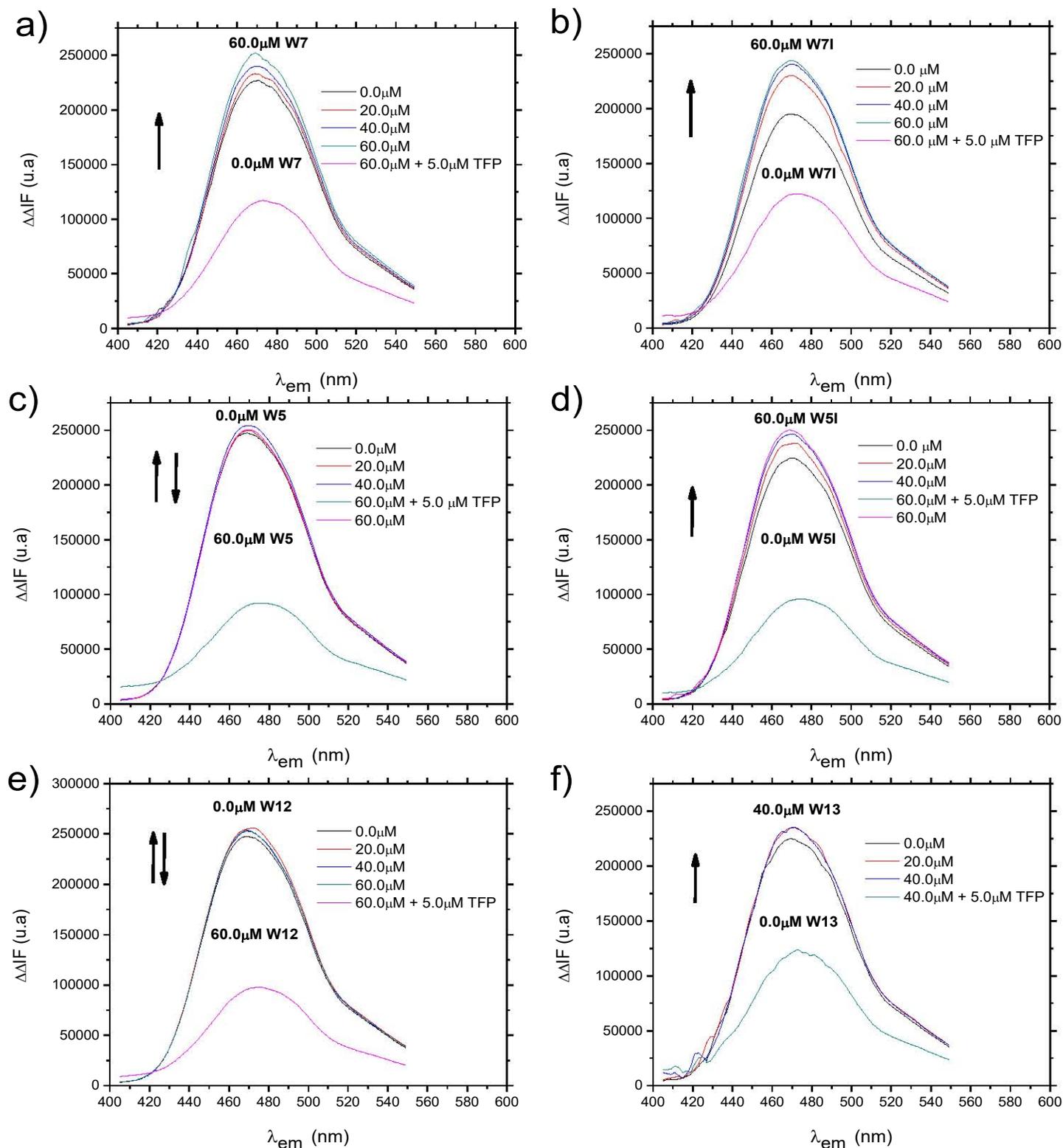
La Figura 19, se muestra la tendencia general de las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) en función del número de equivalentes de  $Ca^{2+}$ . Para los compuestos Trifluoperazina (TFP), Compuesto 48/80 (CMP 48-80) y Rutenio rojo (RRU) se observa una disminución de la constante de disociación ( $K_d$ ) al aumentar los equivalentes de  $Ca^{2+}$ , lo que nos indica que estos ligandos presentan una mayor afinidad a la CaM a saturación del ion. Desde el punto de vista fisiopatológico y farmacológico la importancia de estos resultados puede ayudar a interpretar los mecanismos de acción en que estos fármacos y prototipos de fármaco actúan en los diferentes tejidos, por ejemplo, en el tejido muscular. Para el caso de la Fluperazina (FPZ) se observa que su constante de disociación ( $K_d$ ) es independiente de la concentración de equivalentes de calcio que presente la CaM, por lo que este prototipo de fármaco puede actuar con la misma afinidad en cualquier tejido donde se una a la CaM.

Farmacológicamente estos resultados nos pueden aportar información relacionada con los efectos colaterales que pueden llegar a presentar los fármacos o prototipos de fármacos a nivel sistémico. Por ejemplo, el caso del Compuesto 48/80 (CMP 48-80) donde puede aumentar hasta tres veces su afinidad por el complejo  $4Ca^{2+}$ -CaM con respecto a la CaM. Lo anterior puede direccionar a este fármaco a inhibir a la CaM en condiciones donde haya una concentración saturante de calcio (tejido muscular) y disminuir el complejo CaM-CMP 48-80 en condiciones de bajas concentraciones de calcio (tejido neuronal). Por lo que direccionar a estos fármacos hacia un complejo específico, puede atenuar posibles efectos colaterales.

### **Serie de Compuestos "W"**

Se estudió la interacción de una serie de compuestos reportados como antagonistas e inhibidores de la CaM, llamada serie "W", la cual, comprende 6 compuestos análogos del N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naftaleno sulfonamida (W7) con el objetivo de realizar un análisis estructura-función. Sin embargo, esta serie de compuestos no mostraron respuestas similares con el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr*.

### Titulación del biosensor fluorescente hCaM-M124C-mBBr con la serie de "W"

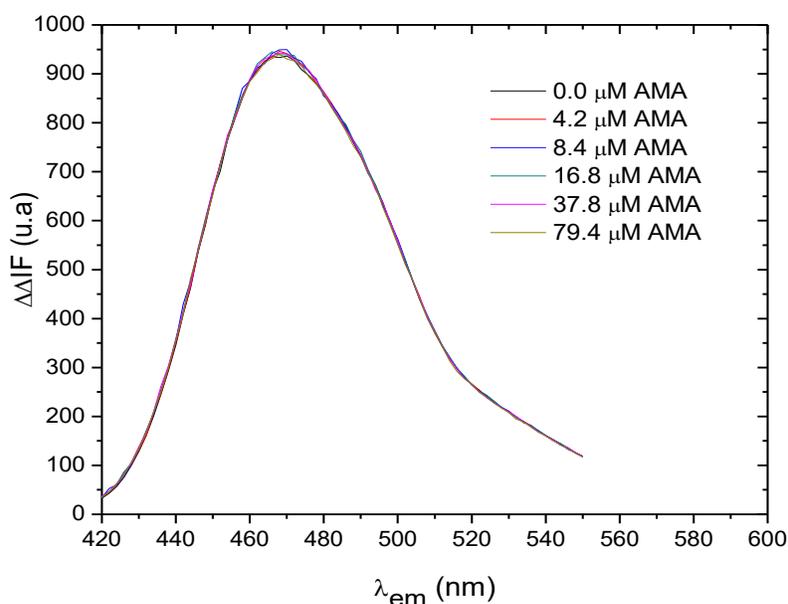


**Figura 20.** Espectros de fluorescencia de *hCaM* M124-mBBr con la serie de compuestos "W". El biosensor *hCaM* M124-mBBr con a) W7, b) W7I, c) W5, d) W5I, e) W12 y f) W13 sin  $Ca^{2+}$ , finalmente se añadió Trifluperazina (TFP) como control positivo. Se utilizó Tris a 50 mM (pH 7.0), *hCaM* M124-mBBr a 332.0  $\mu M$ ,  $\lambda_{ex}$ =381 nm,  $\lambda_{em}$ = 405-550 nm.

La Figura 20, muestra los espectros de fluorescencia del biosensor fluorescente observando para la mayoría de los casos (W7, W7I, W5I, W12 y W13) un mínimo aumento en la intensidad de fluorescencia (efecto hipercrómico) a una concentración de 60.0  $\mu\text{M}$  para estos compuestos. Esta concentración es de 2 a 3 veces mayor que cualquier otro compuesto utilizado para saturar al biosensor en las mismas condiciones experimentales. Además, a la posterior adición de 5.0  $\mu\text{M}$  de Trifluperazina o TFP (control positivo) se observa una disminución significativa de la señal fluorescente (efecto hipocrómico) del biosensor en todos los casos.

Estos resultados nos pueden indicar que esta serie de compuestos no interaccionan directamente con la CaM o que nuestro sistema no es capaz de detectar este tipo de interacción para estos compuestos. Sin embargo, pueden estar inhibiendo algún complejo proteína-CaM, ya que todas las  $\text{IC}_{50}$  reportadas en la literatura son obtenidas utilizando ensayos enzimáticos. <sup>35, 37-39</sup>

La Amantadina (AMA) es un fármaco antiviral con un farmacóforo totalmente diferente a los fármacos anti-CaM. Por lo que fue utilizado en este trabajo como control negativo, este no muestra respuesta alguna al adicionarlo al biosensor *hCaM M124C-mBBR* a una concentración 79.4  $\mu\text{M}$ , aproximadamente dos veces más que cualquier compuesto anti-CaM (Figura 21).



**Figura 21.** Espectros de fluorescencia de *hCaM M124-mBBR* con Amantadina (AMA). *hCaM M124-mBBR* con Amantadina (AMA) a diferentes concentraciones de la misma.

**Tabla 2. Propiedades de unión experimentales y teóricas de los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-Ligandos**

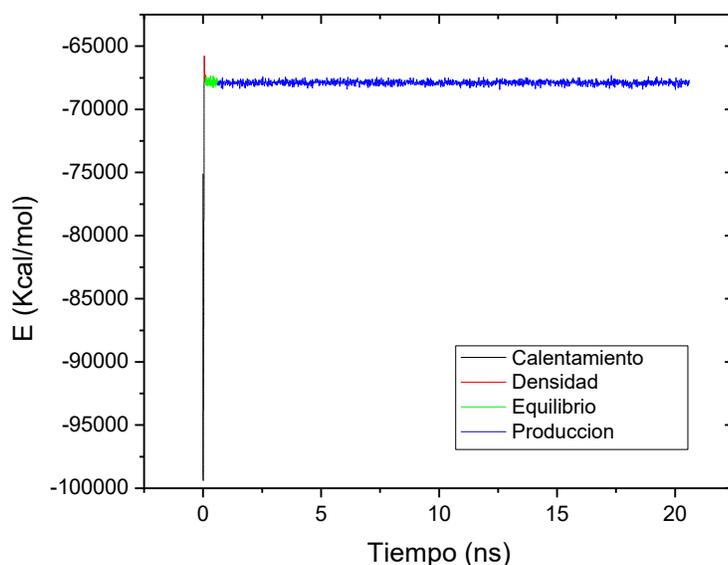
Complejo	Experimental					Teórico			
	K <sub>d</sub> <sup>1</sup> (μM)					ΔG <sub>exp</sub> <sup>2</sup> (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	ΔS	ΔH
	Equivalentes de Ca <sup>2+</sup>								
0	1	2	3	4					
CaM - <b>TFP</b>	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.01	-9.60	-26.88 ± 11.39	-6.25 ± 2.86	-33.13 ± 3.86
CaM - <b>CMP</b>	0.54 ± 0.17	0.33 ± 0.11	0.30 ± 0.11	0.27 ± 0.09	0.18 ± 0.10	-9.20	-19.38 ± 6.27	-25.87 ± 4.72	-45.25 ± 4.12
CaM - <b>FPZ</b>	0.42 ± 0.11	0.42 ± 0.10	0.41 ± 0.08	0.40 ± 0.10	0.41 ± 0.10	-8.71	-23.69 ± 7.22	-4.73 ± 3.89	-28.42 ± 3.30
CaM - <b>RRU</b>	1.72 ± 0.21	1.70 ± 0.35	1.39 ± 0.28	1.53 ± 0.27	1.32 ± 0.24	-8.02	-	-	-
CaM - <b>AMA</b>	-	-	-	-	-	-	+117.69 ± 21.20	+15.50 ± 5.10	+133.30 ± 13.80

<sup>1</sup> constante de disociación aparente.

<sup>2</sup>ΔG<sub>exp</sub>=RT ln K<sub>d</sub>, R=1.986x10<sup>-3</sup> kcal/mol, T=298.15 K y K<sub>d</sub>=μM

## Estudios teóricos de unión de los diferentes compuestos a la CaM

Se realizaron estudios teóricos de unión de los compuestos a la CaM, a través de acoplamiento y reconocimiento molecular para formar los complejos CaM-ligando y estudiarlos posteriormente con la Dinámica Molecular (DM) para calcular los parámetros termodinámicos teóricos de la unión. Los estudios de Dinámica Molecular comprenden diferentes etapas secuenciales, las cuales son: minimización, calentamiento, densidad, equilibrio y producción.



**Figura 22.** Gráfica del progreso de la Dinámica Molecular (DM) de la Trifluoperazina (TFP).

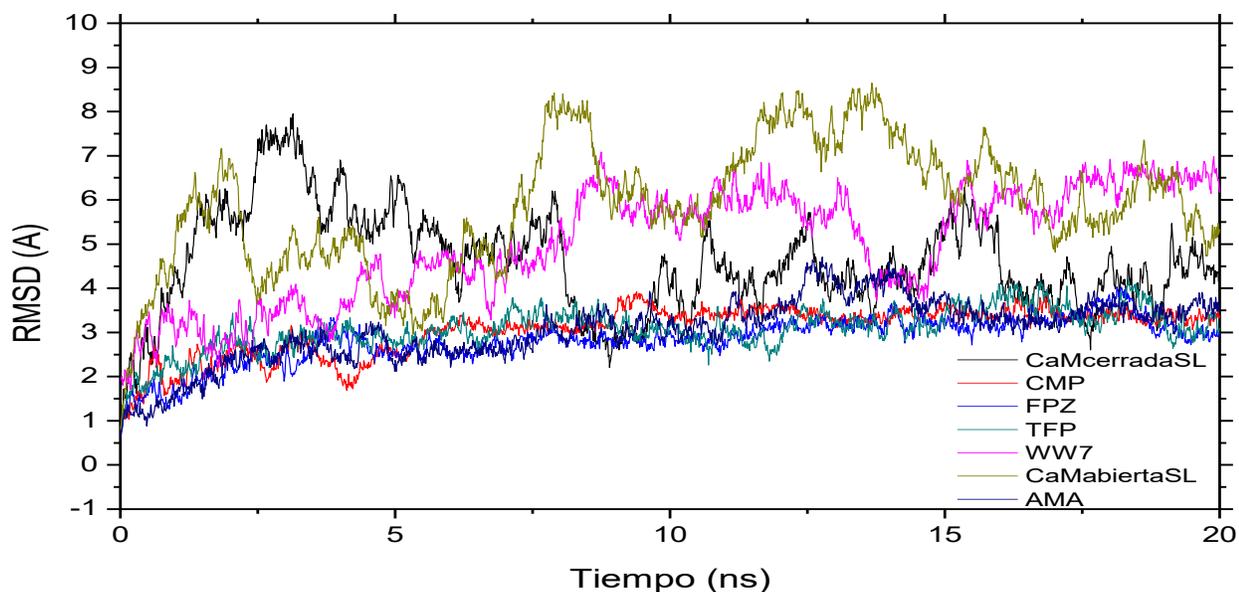
La Figura 22, muestra el progreso de las diferentes etapas para el sistema  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM-ligandos, en la cual, se observa que las etapas de calentamiento y densidad son las menos estables energéticamente en comparación con las de equilibrio y producción, manteniendo estas últimas una estabilidad energética adecuada para poder realizar los análisis correspondientes.

La Tabla 2, muestra los parámetros termodinámicos teóricos obtenidos a partir de los estudios de Dinámica Molecular realizados para cada compuesto. Todos ellos presentan un  $\Delta G$  menor a cero, excepción para la Amantadina (AMA); lo cual es consistente con los datos experimentales. La mayor contribución energética es proporcionada por el componente entálpico ( $\Delta H$ ) en todos los casos, lo que nos indica una mayor estabilidad y posiblemente una buena afinidad entre el complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM

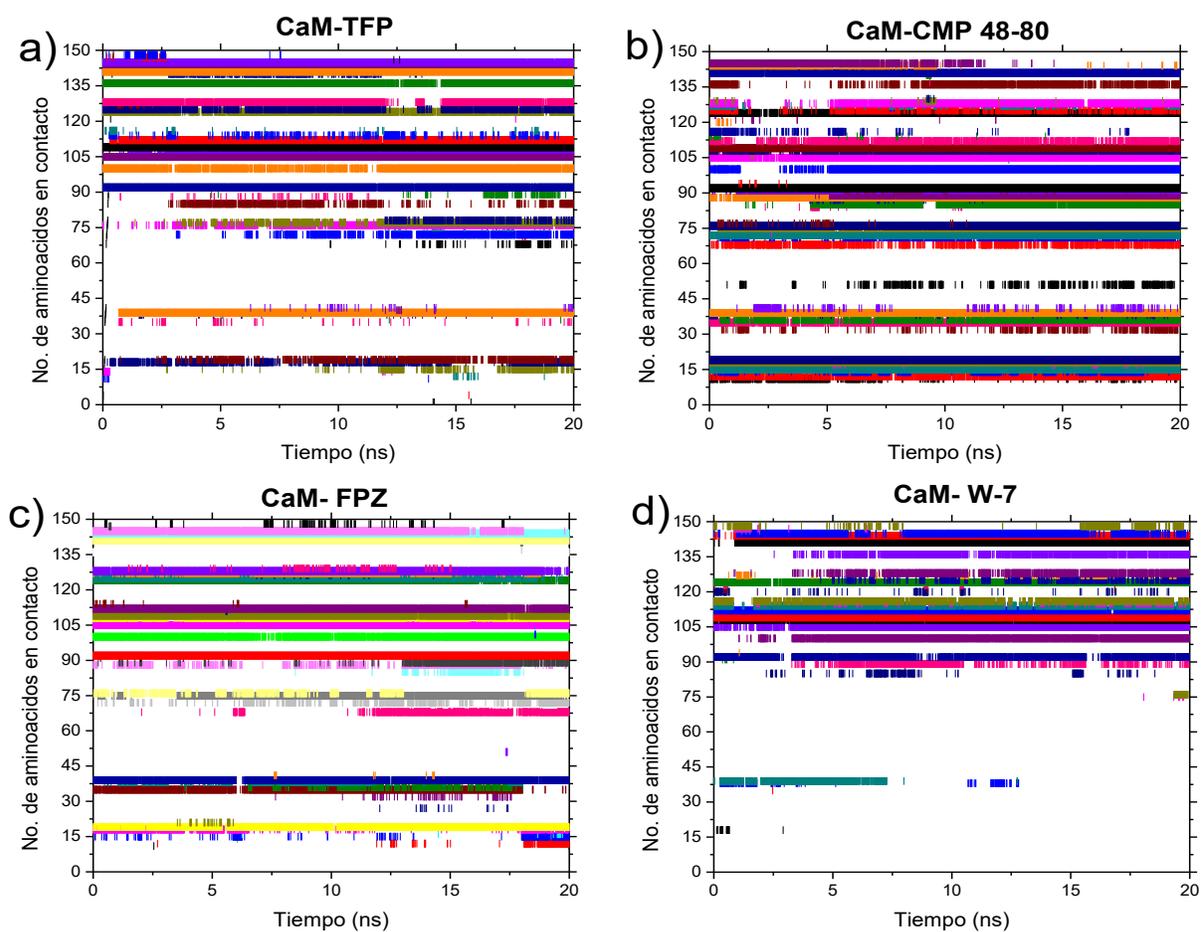
con cada uno de los compuestos. Para el caso del Rutenio rojo (RRU) no se realizaron los estudios de Dinámica Molecular debido a que no fue posible parametrizar al rutenio con las herramientas de AmberTools y, en consecuencia, tampoco se lograron obtener los parámetros termodinámicos teóricos para este compuesto.

Los videos de todas las trayectorias de Dinámica Molecular se encuentran disponibles en el enlace (<http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-adriana/videos.html>). Los videos muestran la trayectoria de la Dinámica Molecular de 20 ns donde se puede apreciar que en los complejos  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con Trifluperazina (TFP), el Compuesto 48-80 (CMP 48/80) y con la Fluperazina (FPZ) la CaM mantiene la forma cerrada, mientras que para el complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con Amantadina (AMA) a pasar de mantener la forma cerrada de la CaM se observa como la Amantadina AMA se desprende y se aleja de la CaM. Finalmente, para el caso del complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con W7 se observa que la CaM tiende a ser inestable a pesar de que el compuesto W7 se mantiene unida a la CaM. Estas apreciaciones visuales están en concordancia con las gráficas de los valores de la desviación media cuadrática (RMSD) del complejo vs Tiempo (ns) (Figura 23).

La Figura 23, muestra los valores de la desviación media cuadrática (RMSD) del complejo en función del tiempo, en nanosegundos, de las Dinámicas Moleculares de la CaM comparándolas con el estado “abierto” y “cerrado” de la proteína en ausencia del ligando, donde se observa que para los complejos  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con Trifluperazina (TFP), el Compuesto 48/80 (CMP 48-80) y la Fluperazina (FPZ) los valores de RMSD son entre 1.5 y 3.5 Å durante toda la trayectoria, mientras que para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM con el compuesto W7 y la CaM en estado “abierto” y “cerrado” las RMSD se encuentran entre 3.5 y 8.5 Å. Estos resultados se pueden interpretar en el contexto de que la CaM es un sistema dinámico, el cual, puede fluctuar entre la conformación “abierto” y “cerrado” y por tal motivo, cuando iniciamos la dinámica en la forma “abierto” la CaM tendería a cerrarse y viceversa (video 1CLL y 1a29, en <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-adriana/videos.html>), lo cual explicaría las fluctuaciones elevadas en los valores de la desviación media cuadrática (RMSD) observadas en la gráfica. Por otro lado, mientras la CaM este unida a un ligando, las fluctuaciones en los valores de la desviación media cuadrática (RMSD) se estabilizarían a una conformación en este caso la forma “cerrado” obteniendo los valores de la desviación media cuadrática (RMSD) bajos.



**Figura 23.** Valores de la desviación media cuadrática (RMSD) en función del tiempo de las Dinámicas Moleculares de la CaM en su forma “abierta” y “cerrada” sin ligando, así como las Dinámicas Moleculares de la CaM con cada uno de los ligandos estudiados.



**Figura 24.** Gráfica del número de aminoácidos en contacto en función del tiempo (ns)

Otro análisis realizado a partir de los datos de las Dinámicas Moleculares es identificar el número de contactos entre los aminoácidos de la CaM y el ligando a lo largo de la trayectoria, lo cual, nos relaciona de manera indirecta el grado de afinidad de la interacción, es decir, del ligando por la CaM. La Figura 24, muestra el análisis del número de contactos mencionados anteriormente para los complejos de  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con el Compuesto 48/80 (CMP 48-80), con la Fluperazina (FPZ), con la Trifluperazina (TFP) y con el compuesto W7, donde se observa que la densidad de interacciones entre los ligandos y la proteína refleja de forma indirecta la afinidad de estos; por ejemplo la constante de disociación ( $K_d$ ) a saturación para el Compuesto 48/80 (CMP 48-80) es de  $0.18 \mu\text{M}$  siendo el complejo que presenta el mayor número de contactos a lo largo de la trayectoria, en comparación de una densidad menor de contactos observada para los complejos  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con Fluperazina (FPZ) y  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con Trifluperazina (TFP), los cuales, tienen una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $0.41$  y  $0.62 \mu\text{M}$ , respectivamente; y para el caso del W7 (Figura 24 d) sólo se presenta una densidad de contactos en una región de la CaM, observando algunos contactos únicamente al inicio de la dinámica molecular de dicho complejo. (ver video CaM-W7, en <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-adriana/videos.html>).

## CONCLUSIONES

Los estudios de las interacciones proteína-ligando a nivel molecular son la base para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. La utilización de diversas técnicas complementarias sería la mejor opción para hacer interpretaciones adecuadas de éstas. Dentro de las técnicas disponibles para este tipo de estudios, las técnicas directas como los biosensores, presentan ventajas sobre otras técnicas indirectas como los ensayos enzimáticos, ya que estos últimos pueden presentar resultados falsos positivos en algunas ocasiones. En este trabajo estudiamos la interacción de cuatro compuestos reportados y una serie de seis análogos de W7 como antagonistas e inhibidores de la CaM utilizando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBr* y herramientas de modelaje molecular (Acoplamiento Molecular y Dinámica Molecular). El biosensor utilizado nos permitió obtener valores de las constantes de disociación ( $K_{ds}$ ) en función del grado de saturación de calcio, obteniendo así cinco valores de  $K_{ds}$  para cada compuesto, reportados por primera vez para estos. La relación entre el grado de afinidad (como la  $K_d$ ) y el número de equivalentes de calcio nos permite extrapolar estos resultados con los efectos farmacológicos de los fármacos y prototipos de fármacos estudiados. En el caso de la serie "W", los estudios con el biosensor *hCaM M124C-mBBr* nos indican que probablemente estos compuestos no se unen de forma directa a la CaM, si no al complejo CaM-proteína, ya que en datos reportados en la literatura estos compuestos inhiben la reacción enzimática con la cual fueron ensayados. Por otro lado, los resultados de los estudios teóricos son complementarios y consistentes con los resultados experimentales. 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 ayudar para el desarrollo y diseño de nuevas entidades moleculares direccionadas a inhibir a la CaM.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo nos dan la pauta para complementar los datos obtenidos y proponer nuevas estrategias. Entre los estudios complementarios que proponemos se encuentran:

- 1.- La realización de estudios simultáneos entre el biosensor y los ensayos enzimáticos para la serie "W".
- 2.- El uso de una técnica alternativa directa como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para corroborar los datos de la unión.
- 3.- Estudios de dinámica molecular con más tiempo para realizar mejores análisis e interpretaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waldman, S. A. Farmacología molecular. In *Farmacología y terapéutica*, Waldman, S. A., Ed.; México, 2010; Chapter Capítulo 5. Interacciones fármaco-receptor, 1378.
2. Schnek, A., Massarini, A., *Curtis. Biología*. 7a ed.; 2008: México, 2008; 1160.
3. Tata, J. R., Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3, 702-710.
4. Abernethy, D. R.; Schwartz, J. B., Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med* 1999, 341, 1447-1457.
5. Oldham, W. M.; Hamm, H. E., Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9, 60-71.
6. Lucas, K. A.; Pitari, G. M.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K. P.; Waldman, S. A., Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000, 52, 375-414.
7. Citri, A.; Yarden, Y., EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7, 505-516.
8. Rang, H. P., Dale, M.M., *Rang and Dale's Pharmacology*. 7th ed.; British, 2012; 777.
9. Jimenez-Sanchez, M.; Lam, W.; Hannus, M.; Sonnichsen, B.; Imarisio, S.; Fleming, A.; Tarditi, A.; Menzies, F.; Ed Dami, T.; Xu, C.; Gonzalez-Couto, E.; Lazzeroni, G.; Heitz, F.; Diamanti, D.; Massai, L.; Satagopam, V. P.; Marconi, G.; Caramelli, C.; Nencini, A.; Andreini, M.; Sardone, G. L.; Caradonna, N. P.; Porcari, V.; Scali, C.; Schneider, R.; Pollio, G.; O'Kane, C. J.; Caricasole, A.; Rubinsztein, D. C., siRNA screen identifies QPCT as a druggable target for Huntington's disease. *Nat Chem Biol* 2015, 11, 347-354.
10. Madariaga-Mazon, A., Calmodulin: Biochemical Promiscuity And Its Benefits. 2016, XL, 305-323.
11. Messeguer, A., Los químicos y el descubrimiento de fármacos. *consolider* 2010.
12. Saldivar, F., Prieto, F. D., Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química* 2016, 51-58.
13. Brunton, L. L., Lazo, J.S., *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Undécima ed.; México, 2007; 2017.
14. Hall, J. E., *Guyton & Hall. Tratado de Fisiología Médica*. 12a ed.; España, 2011 1112.
15. Cheung, W. Y., Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980, 207, 19-27.
16. Chin, D.; Means, A. R., Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 2000, 10, 322-328.
17. Marshall, C. B.; Nishikawa, T.; Osawa, M.; Stathopoulos, P. B.; Ikura, M., Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 460, 5-21.
18. Menyhard, D. K., Comparative computational analysis of active and inactive cofactors of nitric oxide synthase. *J Phys Chem B* 2009, 113, 3151-3159.
19. Nijjar, M. S.; Nijjar, S. S., Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca<sup>2+</sup> overload and inhibition of Ca<sup>2+</sup> + calmodulin-stimulated adenylyl cyclase in rat brain (review). *Int J Mol Med* 2000, 6, 377-389.
20. Goraya, T. A.; Cooper, D. M., Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal* 2005, 17, 789-797.
21. Masciarelli, S.; Horner, K.; Liu, C.; Park, S. H.; Hinckley, M.; Hockman, S.; Nedachi, T.; Jin, C.; Conti, M.; Manganiello, V., Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest* 2004, 114, 196-205.

22. Dousa, T. P., Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 1999, 55, 29-62.
23. Gonzalez-Andrade, M.; Mata, R.; Madariaga-Mazon, A.; Rodriguez-Sotres, R.; Del Pozo-Yauner, L.; Sosa-Peinado, A., Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs. *J Mol Recognit* 2013, 26, 165-174.
24. Gaidos, G.; Panaitiu, A. E.; Guo, B.; Pellegrini, M.; Mierke, D. F., Identification and Characterization of the Interaction Site between cFLIPL and Calmodulin. *PLoS One* 2015, 10, e0141692.
25. Zhou, Y.; Tzeng, W. P.; Wong, H. C.; Ye, Y.; Jiang, J.; Chen, Y.; Huang, Y.; Suppiah, S.; Frey, T. K.; Yang, J. J., Calcium-dependent association of calmodulin with the rubella virus nonstructural protease domain. *J Biol Chem* 2010, 285, 8855-8868.
26. Hasan, R.; Leeson-Payne, A. T.; Jaggar, J. H.; Zhang, X., Calmodulin is responsible for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Sci Rep* 2017, 7, 45098.
27. Lam, H. Y., Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 118, 27-32.
28. Lee, J.; Kim, M. S.; Kim, M. A.; Jang, Y. K., Calmidazolium chloride inhibits growth of murine embryonal carcinoma cells, a model of cancer stem-like cells. *Toxicol In Vitro* 2016, 35, 86-92.
29. Nakazawa, K.; Ito, K.; Koizumi, S.; Ohno, Y.; Inoue, K., Characterization of inhibition by haloperidol and chlorpromazine of a voltage-activated K<sup>+</sup> current in rat pheochromocytoma cells. *Br J Pharmacol* 1995, 116, 2603-2610.
30. Bruno, C.; Cavalluzzi, M. M.; Rusciano, M. R.; Lovece, A.; Carrieri, A.; Pracella, R.; Giannuzzi, G.; Polimeno, L.; Viale, M.; Illario, M.; Franchini, C.; Lentini, G., The chemosensitizing agent lubeluzole binds calmodulin and inhibits Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II. *Eur J Med Chem* 2016, 116, 36-45.
31. Huerta-Bahena, J.; Villalobos-Molina, R.; Garcia-Sainz, J. A., Trifluoperazine and chlorpromazine antagonize alpha 1- but not alpha2- adrenergic effects. *Mol Pharmacol* 1983, 23, 67-70.
32. Gietzen, K.; Adamczyk-Engelmann, P.; Wuthrich, A.; Konstantinova, A.; Bader, H., Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. *Biochim Biophys Acta* 1983, 736, 109-118.
33. Winkler, J. D.; Thermos, K.; Weiss, B., Differential effects of fluphenazine-N-mustard, on calmodulin activity and on D1 and D2 dopaminergic responses. *Psychopharmacology (Berl)* 1987, 92, 285-291.
34. Masuoka, H.; Ito, M.; Nakano, T.; Naka, M.; Tanaka, T., Effects of ruthenium red on activation of Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 169, 315-322.
35. Li, M. X.; Hoffman, R. M.; Sykes, B. D., Interaction of cardiac troponin C with calmodulin antagonist [corrected] W7 in the presence of three functional regions of cardiac troponin I. *Biochemistry* 2006, 45, 9833-9840.
36. Hidaka, H.; Asano, M.; Tanaka, T., Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 1981, 20, 571-578.
37. Hidaka, H.; Sasaki, Y.; Tanaka, T.; Endo, T.; Ohno, S.; Fujii, Y.; Nagata, T., N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78, 4354-4357.
38. Asano, M.; Suzuki, Y.; Hidaka, H., Effects of various calmodulin antagonists on contraction of rabbit aortic strips. *J Pharmacol Exp Ther* 1982, 220, 191-196.

39. Tanaka, T.; Ohmura, T.; Hidaka, H., Calmodulin antagonists' binding sites on calmodulin. *Pharmacology* 1983, 26, 249-257.
40. Figueroa, M.; Gonzalez-Andrade, M.; Sosa-Peinado, A.; Madariaga-Mazon, A.; Del Rio-Portilla, F.; Gonzalez Mdel, C.; Mata, R., Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2011, 26, 378-385.
41. Wu, G.; Gao, Z.; Dong, A.; Yu, S., Calcium-induced changes in calmodulin structural dynamics and thermodynamics. *Int J Biol Macromol* 2012, 50, 1011-1017.
42. Shibata, A. C.; Maebashi, H. K.; Nakahata, Y.; Nabekura, J.; Murakoshi, H., Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern. *PLoS One* 2015, 10, e0121109.
43. Ai, H. W., Fluorescent sensors for biological applications. *Sensors* 2014, 14, 17829-17831.
44. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M., Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011, 7, 146-157.
45. Landau, L. D., Lifshitz, E.M., Berestetskii, V. B., Teoría Clásica de los Campos. 2008, 2.
46. Cossio-Perez, R.; Palma, J.; Pierdominici-Sottile, G., Consistent Principal Component Modes from Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *J Chem Inf Model* 2017.
47. Lozano, J., Scior, T., What do you know about... Molecular Dynamics? *Rev Mex Cienc Farm* 2014, 86-88.
48. Cai, W., *Molecular Dynamics*. In: Konings R.J.M., *Comprehensive Nuclear Materials*. Amsterdam, 2012; Vol. 1, 265.
49. Jiménez, C., León, D, Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 2009, 16, 144-154.
50. Gonzalez-Andrade, M.; Figueroa, M.; Rodriguez-Sotres, R.; Mata, R.; Sosa-Peinado, A., An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Anal Biochem* 2009, 387, 64-70.
51. Lucas, J. J., El descubrimiento de las proteínas fluorescentes y su utilidad en la investigación biomédica (Premio Nobel de Química de 2008). *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2009, 99-112.
52. Garritz, A., Shimomura, Chalfie y Tsien: los señores de la proteína verde bioluminiscente de la medusa *Aequorea victoria*. *Educación Química* 2009, 75-76.
53. Douglass, P. M.; Salins, L. L.; Dikici, E.; Daunert, S., Class-selective drug detection: fluorescently-labeled calmodulin as the biorecognition element for phenothiazines and tricyclic antidepressants. *Bioconjug Chem* 2002, 13, 1186-1192.
54. Dikici, E.; Deo, S. K.; Daunert, S., Drug detection based on the conformational changes of calmodulin and the fluorescence of its enhanced green fluorescent protein fusion partner. *Analytica Chimica Acta* 2003, 500, 237-245.
55. González-Andrade, M.; Rivera-Chávez, J.; Sosa-Peinado, A.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R., Development of the fluorescent biosensor h calmodulin (hCaM)L39C- monobromobimane(mBBr)/V91C-mBBr, a novel tool for discovering new calmodulin inhibitors and detecting calcium. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 54, 3875-3884.
56. Figueroa, M.; González-Andrade, M.; Sosa-Peinado, A.; Madariaga-Mazón, A.; Del Río-Portilla, F.; Del Carmen González, M.; Mata, R., Fluorescence, circular dichroism, NMR, and docking studies of the interaction of the alkaloid malbrancheamide with calmodulin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2011, 26, 378-385.

57. Figueroa, M.; González, M. d. C.; Rodríguez-Sotres, R.; Sosa-Peinado, A.; González-Andrade, M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R., Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009, 17, 2167-2174.
58. Lakowicz, J. R., *Principle of Fluorescence Spectroscopy*. 3a ed.; Springer US: USA, 2006; 954.
59. Parker, C. A., Ress, W.A., Correction of Fluorescence Spectra and Measurement of Fluorescence Quantum Efficiency *Analyst* 1960, 85, 587-600.
60. González-Andrade, M.; Figueroa, M.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R.; Sosa-Peinado, A., An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry* 2009, 387, 64-70.
61. Ohki, S. Y.; Yazawa, M.; Yagi, K.; Hikichi, K., Mastoparan binding induces Ca(2+)-transfer between two globular domains of calmodulin: a <sup>1</sup>H NMR study. *J Biochem* 1991, 110, 737-742.

# APÉNDICE

## Estudios teóricos

### 1) Construcción de estructuras

1. Dentro del sistema operativo Windows, abrir el programa Hyperchem Professional y realizar las estructuras de cada compuesto prototipo de fármaco para la CaM.
2. Una vez dibujada cada estructura, construir con hidrógenos y optimizar.
3. Guardar como *.hin* y como *.pdb*

### 2) Obtención de la proteína CaM

1. Dentro Ubuntu, un sistema operativo basado en GNU/Linux, abrir una terminal para posteriormente abrir el programa Pymol.
2. Seleccionar plugin → pdb load service → escribir *2o60* → enter
3. Guardar la proteína como *proteína 2o60.pdb*

### 3) Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, abrir una terminal (T1) y escribir *adt* → enter para abrir el programa AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute).
2. Una vez abierto el programa adt, seleccionar lo siguiente: file → read molecule → *proteína 2o60*
3. Quitar L (lines) y seleccionamos R
4. Seleccionar: ligand → input → open → cambiar formato a *.pdb* y seleccionar el fármaco o ligando en estudio.
5. Seleccionar: ligand → C aromatics → aromatic → ok
6. Seleccionar: ligand → output → save as *pdbqt*
7. Seleccionar: grid → macromolecule → choose *2o60* → ok + save → ok
8. Seleccionar: grid → set map → choose ligand → *.pdbqt*
9. Seleccionar: grid → gridbox
10. Tanto para "x", "y" & "z" colocarlos en 100 Å
11. Seleccionar: file → close saving
12. Seleccionar: grid → output → save → *2o60-ligando* → save

13. En una terminal 2 (T2) ir a la carpeta en donde se encuentra el archivo guardado anteriormente.
14. Escribir:  
`>ls` → enter  
`>autogrid4 -p 2o60-ligando.gpf`  
(autogrid nos permite realizar mapas electroestáticos)
15. En el programa ADT seleccionar: docking → macromolecule → set rigid → 2o60.pdbqt → open
16. Seleccionar: docking → ligand → choose → (seleccionar el ligando en estudio) → select → accept
17. Seleccionar: search parameters → genetic algorithm → number of GA Runs: 250 → accept
18. Seleccionar: docking → output → Lamarckian → 2o60-ligando1.dpf → save
19. En la T2 ir a la carpeta en donde se guardó el archivo de 2o60-ligando1.dpf
20. Escribir:  
`>ls` → enter  
`>autodock4 -p 2o60-ligando1.dpf -l 2o60-ligando1.dlg &` → enter  
`>top` → enter
21. Oprimir las teclas Ctrl + C
22. Escribir:  
`>ls` → enter  
`>tail -f 2o60-ligando1.dlg` → enter
23. Repetir para cada uno de los ligandos.
24. En terminal 3 (T3) ir a la carpeta del fármaco o ligando en estudio
25. Escribir:  
`>ls` → enter  
`>gedit ligando1.dlg &` → enter
26. Una vez abierto el programa Gedit, verificar que el Docking haya terminado y buscar en la tabla de "Clustering histogram" los mejores grupos con los que se une el ligando a la proteína CaM.
27. Regresar a la T3 y escribir: `pymol 2o60.pdb 2o60-ligando1.dlg` → enter
28. En el programa Pymol seleccionar: all → action → present → publication
29. Seleccionar: Plugin → load service → 1a29

30. Alinear con el siguiente comando dentro del programa Pymol: > align 1a29, 2o60sinp\_ → enter
31. Observar en dónde se une el ligando con la CaM
32. Save as → ligando1-(ranking) p.ej. W7-2 → save
33. Repetir para todos los ligandos
34. Realizar Docking siguiendo todos los pasos anteriores, pero para el punto 9 y 10 seleccionar: Gridbox center → center on ligand y para “x”, “y” & “z” colocarlos en 30 Å cada uno.

#### 4) Preparación de DM

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu abrir terminal 4 (T4) e ir a la carpeta donde se encuentra el complejo y escribir: >pymol 2o60.pdb → enter
  2. En el programa Pymol seleccionar: all → action → present → publication
  3. Seleccionar: file → open files → 2o60-ligando1.dlg
  4. Salvar la molécula seleccionando: file → save molecule → 2o60-ligando1.dlg → ok y cambiar nombre a *ligando1-docking.pdb*
- NOTA: Es importante tener siempre la macromolécula (2o60.pdb) en la carpeta en donde se guarden todos los archivos del ligando en estudio.
5. En terminal 5 (T5) ir a la carpeta donde se encuentra el ligando en estudio y escribir:
    - >gedit *ligando1-docking.pdb* → enter
    - >gedit *2o60.pdb* → enter
  6. Dentro del programa Gedit para *2o60.pdb*, quitarle a 2o60 el péptido si es que tiene (cadena B), quitar H<sub>2</sub>O (hasta abajo)
  7. Juntar las terminaciones TER

HETAM

Escribir: TER → enter

8. Dentro del programa Gedit para *ligando1-docking.pdb*, copiar todo y pegar en el archivo de *2o60.pdb* hasta el final y escribir lo siguiente:

ATOM

TER

END

9. Seleccionar: file → save as → *2o60-ligando1.pdb* → save
10. Cerrar el programa Gedit
11. En T5 ir a la carpeta donde se encuentran los archivos del ligando en estudio y escribir:  
>*pymol 2o60-ligando1.pdb* para visualizar el complejo.
12. Seleccionar en el programa Pymol: all → present → publication
13. Cerrar programa Pymol
14. En T5 ir a la carpeta donde se encuentran los archivos del ligando en estudio y escribir:  
>*pdb4amber -i 2o60-ligando1.pdb -o 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter  
>*ls* → enter  
>*gedit 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter
15. Verificar en Gedit, que en los aa #148 los calcios se encuentren bien enumerados.
16. Seleccionar únicamente el ligando
17. Oprimir las teclas ctrl+x y ctrl+v (en otra pestaña nueva). Guardar como *ligando1-amber.pdb*
18. En la pestaña de *2o60-ligando1-amber.pdb* ahora guardar a la CaM como *2o60-amber.pdb* (una vez quitado el fármaco).
19. Cerrar el programa Gedit
20. Abrir un navegador web y entrar a la siguiente página:  
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg/submit.html> abrir el archivo del ligando: *ligando1-amber.pdb*, copiar y pegar en el navegador web.
21. En el navegador en la parte de Chirality y EM seleccionar: NO
22. En el navegador seleccionar Run PRODRG
23. Una vez procesado y mostrada la molécula, copiar todo lo que se encuentra en la parte de SYBYL2 hasta H's.
24. En la T5 escribir:  
>*vi ligando1-amber.pdb*  
>*i*
25. Pegar lo seleccionado en el paso 23
26. Oprimir la tecla ESC

27. Escribir:

>:wq → enter

>ls → enter

>rn *ligando1* → enter

>ls para verificar que se encuentre el archivo de salida *ligando1.mol2*

28. Abrir terminal 6 (T6) y escribir el siguiente comando:

>source *leaprc.gaff* → enter

>list → enter

29. Para cargar el fármaco escribir:

>*ligando1=loadmol2 ligando1.mol2* → enter

>list → enter

30. Para subir parámetros escribir:

>*loadamberparams ligando1.frcmod*

>*check ligando1* → enter (debe decir OK!)

31. Para la proteína escribir los siguientes comandos:

>*protein=loadpdb 2o60-amber.pdb* → enter

>list → enter

>*check protein* → enter

>*set protein.149.1 type C0* → enter

>*set protein.150.1 type C0* → enter

>*set protein.151.1 type C0* → enter

>*set protein.152.1 type C0* → enter

>*set protein.149.1 charge +2* → enter

>*set protein.150.1 charge +2* → enter

>*set protein.151.1 charge +2* → enter

>*set protein.152.1 charge +2* → enter

>*check protein* → enter (debe decir OK!)

>*saveamberparm protein 2o60-ligando1.top 2o60-ligando1.xyz* → enter

32. Para el complejo ligando-CaM escribir los siguientes comandos:

>*complex=loadpdb 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter

>list → enter

>*check complex* → enter

```
>saveamberparm complex3 2o60-ligando1-WAT.top 2o60-ligando1-WAT.xyz
```

```
→ enter
```

## 5) Dinámica molecular (DM)

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, abrir una terminal 1 (T1) y abrir el archivo del complejo con refinamiento con la CaM y sin péptido: *2o60-Rligando1.pdb*
2. Copiar en una misma carpeta el archivo del complejo con refinamiento y de la proteína sin péptido, ambos archivos deben ser del tipo .pdb

3. En T1 escribir:

```
>pymol 2o60-Rligando1.pdb 2o60sinp.pdb → enter
```

4. En el programa Pymol seleccionar: All → Action → present → publication (para visualizar y verificar la posición del fármaco).

5. Cerrar programa Pymol

6. Abrir un navegador web y entrar a la siguiente página: <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg/submit.html> abrir el archivo del complejo con refinamiento: *2o60-Rligando1.pdb*, copiar y pegar en el navegador web.

7. En el navegador en la parte de Chirality y EM seleccionar: NO

8. En el navegador seleccionar Run PRODRG

9. Una vez procesado y mostrado el complejo, copiar todo lo que se encuentra en la parte de SYBYL2 (All H) y pegar en una hoja nueva de gedit, posteriormente guardar como .mol2, p. ej. *ligando1-D.mol2*

10. En T1 escribir los siguientes comandos:

```
>atechamber -i ligando1-D.mol2 -fi mol2 -o ligando1.mol2-fo mol2 -rn ligando1  
-nc -s 2 → enter
```

```
>ls → enter
```

```
>parmchk -i ligando1.mol2 -f mol2 -o ligando1.frcmod → enter
```

```
>ls → enter
```

11. En otra terminal (T2) escribir los siguientes comandos:

```
>tleap -s -f leaprc.ff99sb → enter
```

```
>source leaprc.gaff → enter
```

```
>list → enter
```

- >*ligando1=loadmol2 ligando1.mol2* → enter
  - >*loadamberparams ligando1.frcmod* → enter
  - >*list* → enter
  - >*check ligando1* → enter (debe decir unit is Ok!)
  - >*savepdb ligand1 ligand1-amber.pdb* → enter
12. En T1 buscar con *ls* el archivo *ligand1-amber.pdb*
  13. Abrir el archivo *2o60sinp.pdb* y *ligand1-amber.pdb* con el programa *gedit*
  14. Copiar todo con *ctrl+a*, *ctrl+c* del archivo *ligand1-amber.pdb* y en el archivo de *2o60sinp.pdb* al terminar los  $\text{Ca}^{2+}$  sustituyendo la palabra *END* por *TER* → enter, pegar con *ctrl+v* y guardar como *2o60sinp.pdb*
  15. En T1 escribir los siguientes comandos:
    - >*ls* → enter
    - >*pdb4amber -l 2o60-ligando1.pdb -o 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter
    - >*ls* → enter
    - >*gedit 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter
  16. Seleccionar a partir del fármaco con *ctrl+x* y agregamos *END*
  17. Guardar sólo la proteína como *2o60-amber.pdb*
  18. En una nueva hoja de *gedit* pegar el ligando seleccionado del paso 16 y guardar el archivo como *ligando1-amber.pdb*
  19. En T1 escribir: *ls*
  20. En T2 escribir los siguientes comandos:
    - >*complex=loadpdb 2o60-ligando1-amber.pdb* → enter
    - >*set complex.149.1 type C0*
    - >*set complex.150.1 type C0*
    - >*set complex.151.1 type C0*
    - >*set complex.152.1 type C0*
    - >*set complex.149.1 charge +2*
    - >*set complex.150.1 charge +2*
    - >*set complex.151.1 charge +2*
    - >*set complex.152.1 charge +2*
    - >*check complex* (debe decir Unit is Ok)
    - >*saveamberparm complex 2o60-ligando1.top 2o60-ligando1.xyz* → enter
  21. En T1 escribir: *ls* y buscar los archivos de tipo *.top* y *.xyz*

22. En T2 escribir los siguientes comandos:

```
>additions complex Na+ 0
>solvateoct complex TIP3PBOX 12 → enter
>saveamberparm complex 2o60-ligando1-WAT.top 2o60-ligando1-WAT.xyz
>protein=loadpdb 2o60-amber.pdb → enter
>set protein.149.1 type C0
>set protein.150.1 type C0
>set protein.151.1 type C0
>set protein.152.1 type C0
>set protein.149.1 charge +2
>set protein.150.1 charge +2
>set protein.151.1 charge +2
>set protein.152.1 charge +2
>saveamberparm protein 2o60.top 2o60.xyz → enter
>saveamberparm ligando1 ligando1.top ligando1.xyz → enter
```

23. En T1 escribir: *ls*

24. En T2 escribir: *quit* → enter

## 6) Supercómputo

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, abrir una terminal T1 e ir a la carpeta donde se encuentra el archivo *vpn-ubuntu.txt* escribir los siguientes comandos:

```
>gedit vpn-ubuntu.txt & → enter
>sudo openvpn – config client.ovpn → enter
>escribir la contraseña del equipo
>escribir el usuario de supercómputo y password
```

2. En T2 escribir el siguiente comando:

```
>ssh mga@132.247.177.99
>escribir el password
```

3. Una vez dentro de supercómputo, crear una carpeta para el ligando en estudio con el siguiente comando:

```
>mkdir 2o60-ligando1 → enter
>cd 2o60-ligando1 → enter
```

>ls → enter

>pwd → enter (nos dará la ruta)

4. En terminal 3 (T3) ir a la carpeta donde se encuentran los archivos de los ligandos o fármacos prototipos

Subir información con el siguiente comando:

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

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

5. En T2 ir a la carpeta de archivos y escribir:

>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 (archivo de salida)

>ls → enter

NOTA: Hasta que termine o se encuentre el archivo de salida continuar con el siguiente paso.

>bsub < heat-9\_gpu.bsub → enter

>bjobs → enter

>ls → enter

NOTA: Hasta que termine o se encuentre el archivo de salida continuar con el siguiente paso.

>bsub < density-9\_gpu.bsub → enter

>bjobs → enter

>ls → enter

NOTA: Hasta que termine o se encuentre el archivo de salida continuar con el siguiente paso.

>bsub < equil-9\_gpu.bsub → enter

>bjobs → enter

>ls → enter

NOTA: Hasta que termine o se encuentre el archivo de salida continuar con el siguiente paso.

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

```
>bjobs → enter
```

```
>ls → enter
```

NOTA: Hasta que termine o se encuentre el archivo de salida continuar con el siguiente paso

6. Cerrar terminal

7. Repetir los pasos 1 y 2 para entrar a supercómputo

8. Entrar a la carpeta de un ligando donde se encuentran los archivos de éste y crear una carpeta de análisis con el comando:

```
>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
```

9. Dentro de la carpeta de análisis escribir los siguientes comandos:

```
>ls → enter
```

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

```
>$vi mmpbs_q_4p.bsub → enter
```

```
>i (insertar)
```

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
```

```
>ctrl+C (para salir)
```

## 7) Análisis de trayectorias

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, repetir los pasos 1 y 2 para entrar a supercómputo del punto 6 (supercómputo)
2. Entrar a la carpeta donde se encuentran los archivos
3. Comprimir los archivos de cada ligando con el siguiente comando:  

```
>tar czvf 2o60-ligando1.tar.gz 2o60-ligando1/ → enter
```

```
>ls → enter
```

```
>ls -las → enter
```
4. En T2 dentro de la carpeta de resultados escribir:  

```
>scp mga@132.247.177.99:/(escribir la ruta de la carpeta donde se quieren colocar los resultados en el equipo)/ *.gz . → enter
```
5. Descomprimir archivos con el comando:  

```
>tar zxvf ligando1.tar.gz → enter
```

```
>ls → enter
```

```
>vmd → enter
```
6. En el programa de VMD seleccionar:  
File → New molecule, Browse → ligando1-WAT.top → OK → tipo → amber7parm → load (observar que carguen todos los átomos)  
Browse → 2o60-ligando1-WAT-prod.mdcrd → OK  
Tipo → amber coordinates with periodic box → load (verificar que sean 2000 fragmentos)  
Graphics → Representations  
Drowing → New Cartoon  
Crate Rep → selections → keyword → rename → Apply  
Drowing method → bonds → coloring → color ID  
VMD main → save coordinates  

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

## 8) Gráfico de RMS

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, abrir una terminal (T1) e ir a la carpeta de resultados donde se encuentra la Proteína-ligando → análisis → *cp backbone .*  
→ *gedit backbone* → enter  
> *trajin ../2o60-ligando1-WAT-prod.mdcrd*  
> *reference ../2o60-ligando1-WAT-equil.rst*  
> *rms reference* (cambiar y salvar)
2. En T1 ir a la carpeta de análisis y escribir el siguiente comando:  
> *cpptraj ../2o60-ligando1-WAT.top*  
> <*backbone\_rms.in*  
> *ls* → enter  
> *ctrl+C*  
> *xmgrace 2o60-ligando1-WAT-backbone.rms.* → enter

## 9) Gráfico de Residuos vs tiempo (ps)

1. Dentro del sistema operativo Ubuntu, abrir el programa Excel y seleccionar: file  
→ open → browse → all files (seleccionar el archivo del ligando en matrix) → delimitar → next → finish
2. En (x) → número de pasos  
En (y) → residuos en contacto  
Find and select → find what: number of column  
replace with: number of residuos
3. Repetir para cada ligando

## Estudios experimentales

### 1) Experimentos del método basado en fluorescencia

1. Conocer el peso molecular de cada compuesto en estudio
2. Realizar los cálculos correspondientes para obtener una concentración del ligando aproximadamente de 1 $\mu$ M en 2000 $\mu$ L de Buffer o DMSO según el compuesto.
3. Las condiciones del espectrofluorómetro son las siguientes:

Filtros de excitación= 1.0 nm, Filtros de emisión= 2.0 nm, base de tiempo: 1.0 seg  $\lambda_{ex}$ = 381 nm,  $\lambda_{em}$ = 405-550 nm con un paso de: 2.0 nm, celda de vidrio de 1.0 cm.

4. Las concentraciones de los reactivos utilizados son las siguientes:  
Buffer Tris a 50mM (pH 7.0), hCaM M124-mBBr a 332.0  $\mu$ M, CaCl<sub>2</sub> a 0.5mM
5. Realizar los cálculos correspondientes para conocer la cantidad, en  $\mu$ L, que hay que añadir de biosensor a la celda. En nuestro caso, agregar 6.0  $\mu$ L de biosensor según el siguiente cálculo:

$$\frac{(2000 \mu\text{L en celda})(1\mu\text{M de ligando})}{(332.0 \mu\text{M})} = 6.0 \mu\text{L de biosensor}$$

6. Realizar los cálculos correspondientes para conocer la cantidad, en  $\mu$ L, que hay que añadir de CaCl<sub>2</sub> a la celda. En nuestro caso, agregar 2.5  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> para cada sitio de Ca<sup>2+</sup>, tomando en cuenta que a 10.0 $\mu$ M hay saturación de Ca<sup>2+</sup> según el siguiente cálculo:

$$\frac{(10.0 \mu\text{M})}{4} = 2.5 \mu\text{M de Calcio}$$

7. Realizar las titulaciones de al menos 10 repeticiones del biosensor hCaM M124-mBBr con el compuesto. Iniciar con 0.0  $\mu$ M de compuesto hasta saturación del mismo y sin equivalentes de Ca<sup>2+</sup>. Realizar las titulaciones para dos, tres y cuatro equivalentes de Ca<sup>2+</sup>.
8. Repetir para cada ligando.

## 2) Análisis y tratamiento de datos experimentales

1. Dentro del sistema operativo Windows, abrir el programa Origin
2. Seleccionar: import  $\rightarrow$  multiples ASCII
3. Seleccionar archivos de tipo IFX  $\rightarrow$  adicionar  $\rightarrow$  start new columns  $\rightarrow$  ok
4. Seleccionar todas las columnas de longitud de onda e intensidad de fluorescencia con ctrl+C
5. Abrir new workbook y pegar con ctrl+V
6. Seleccionar todas las columnas y seleccionar el gráfico de líneas.
7. Para cada longitud de onda e intensidad de fluorescencia seleccionar: análisis  $\rightarrow$  signal processing  $\rightarrow$  smothing

8. Copiar todas las longitudes de onda e intensidades de fluorescencia corregidas y pegar en el programa Excel.
9. Dentro de Excel, dar clic en autosum → max → enter
10. Aplicar para todas las intensidades de fluorescencia
11. Copiar las intensidades de fluorescencia máximas y pegar como: paste special → transpose, paste: values, operation: none.
12. Normalizar de 0 a 1 según la siguiente ecuación:  $(IF-IF) / (IF-UIF)$ , donde en negritas son los valores fijados y UIF es la última intensidad de fluorescencia.
13. Copiar los datos obtenidos de la normalización
14. Regresar al programa Origin y abrir new workbook.
15. En una columna colocar las concentraciones del ligando utilizadas en el experimento con su correspondiente normalización.
16. Seleccionar ambas columnas y graficar con la gráfica de puntos → análisis → fitting → no lineal curve fit → seleccionar donde se encuentra la ecuación de unión:

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

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

- Parámetros → value: 1 p/kd y 1 p/P → interacción (dar clic hasta obtener una  $R^2$  aceptable, a partir de 0.9, ya que no es una curva lineal) → enter
17. Obtener la  $K_d$  para cada ligando con 0, 1, 2, 3 y 4 equivalentes de  $Ca^{2+}$ .
  18. Repetir para cada uno de los ligandos