



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Bisindolilmaleimida nuevos inhibidores de la
proteína Calmodulina**

T E S I S

QUE PRESENTA:

Diana Karina Fructuoso García

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Martín González Andrade



Ciudad Universitaria, CDMX

2021



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: PEDRAZA CHAVERRI JOSE

VOCAL: GONZALEZ TRUJANO MARIA EVA

SECRETARIO: GONZALEZ ANDRADE MARTIN (ASESOR)

1^{er}. SUPLENTE: AVILES ROSAS VICTOR HUGO

2^{do}. SUPLENTE: GARCIA ARRAZOLA ROEB

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biosensores y Modelaje molecular, Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

SUSTENTANTE:

Dr. Martín González Andrade

Diana Karina Fructuoso García

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABREVIATURAS	5
1.0 INTRODUCCIÓN	8
1.1 LAS BIOMOLÉCULAS Y SUS INTERACCIONES.....	9
1.2 INTERACCIONES DE FÁRMACOS	11
1.3 LA PROTEÍNA CALMODULINA (CaM), COMO BLANCO MOLECULAR	12
1.4 BLANCOS MOLECULARES REGULADOS POR LA CALMODULINA.....	13
1.5 INHIBICIÓN DE LA CaM.....	15
1.6 BISINDOLILMALEIMIDA	17
1.7 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE INTERACCIONES PROTEÍNA CaM-LIGANDOS	18
1.7.1 ENSAYOS ENZIMÁTICOS FUNCIONALES	20
1.7.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	21
1.7.3 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	22
1.7.4 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA.....	24
1.7.5 CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X.....	24
1.7.6 ESPECTROSCOPIA DE UV-VISIBLE	25
1.7.7 DICROÍSMO CIRCULAR	27
1.7.8 ESPECTROSCOPIA DE RAMAN.....	27
1.7.9 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	28
1.7.10 CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA	29
1.7.11 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	31
1.7.12 MÉTODOS FLUORESCENTES: TRANSFERENCIA DE ENERGÍA RESONANTE (FRET)	32
1.7.13 BIOSENSORES FLUORESCENTES DE LA CaM.....	33
1.7.14 PRINCIPIOS DE LA FLUORESCENCIA	34
1.7.15 QUIMIOINFORMÁTICA	37
1.7.16 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	38
1.7.17 DINÁMICAS MOLECULARES	39
2.0 HIPÓTESIS	40
2.1 OBJETIVO GENERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 MATERIALES	41
3.2 DETERMINACIÓN DE LA K_D DE LA PROTEÍNA CaM POR FLUORESCENCIA.....	41
3.3 PREPARACIÓN DE ARCHIVOS DE COORDENADAS INICIALES.....	41
3.4 ACOPLAMIENTO Y RECONOCIMIENTO MOLECULAR (DOCKING).....	42
3.5 DINÁMICA MOLECULAR.....	44
3.6 UNIÓN DE ENERGÍAS LIBRES CALCULADAS POR MECÁNICA MOLECULAR / ÁREA DE SUPERFICIE DE POISSON BOLTZMANN (MM / PBSA).....	47
<i>Determinación de las K_{ds} de los compuestos Bisindolilmaleimidias utilizando el biosensor fluorescente hCaM M124C-mBBr.....</i>	<i>51</i>
5.0 CONCLUSIONES	58
6.0 PERSPECTIVAS	58
7.0 REFERENCIAS	59

RESUMEN

Los estudios de las interacciones a nivel molecular de los complejos proteína-ligando son la base para describir los mecanismos de acción de los fármacos. La calmodulina (CaM) es una proteína intracelular que une antagonistas clásicos como: clorpromazina (CPZ), fluoxetina (FLU), entre otros utilizados en la terapéutica de algunas patologías como Alzheimer, depresión, bulimia nerviosa y algunos tipos de cáncer.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de las interacciones a nivel molecular de una serie de compuestos de Bisindolilmaleimida para establecer una relación estructura-función como inhibidores de la proteína CaM. Los compuestos Bisindolilmaleimida son prototipos de fármaco derivado de la estaurosporina la cual es un alcaloide con actividad para el tratamiento del cáncer. Los compuestos II, IV, VII, X y XI de Bisindolilmaleimida (BIM) son propuestos y descritos por primera vez como nuevos inhibidores de la calmodulina. Para lo anterior se utilizaron herramientas de modelaje molecular (Acoplamiento molecular y Dinámicas Moleculares) con el fin de realizar los estudios teóricos computacionales (*in silico*) y un dispositivo biotecnológico (un biosensor fluorescente de la proteína humana CaM que tiene unido covalentemente el fluoróforo monobromobimano (mBBr), *-hCaM M124C-mBBr*), para determinar la unión experimental de estos compuestos.

Los resultados obtenidos indican que esta serie de compuestos se unen a la CaM con una afinidad entre 193-248 nM, una orden de magnitud menor que la mayoría de los inhibidores clásicos antes mencionados. Por otro lado los estudios teóricos coinciden con los resultados experimentales y aportan detalles moleculares complementarios de la interacción entre la proteína y la serie de compuestos de Bisindolilmaleimida (BIM). Se concluye que estos compuestos pueden ser excelentes prototipos de nuevos inhibidores de la calmodulina.

ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
°C	Grados Celsius
K	Grados Kelvin
T ^a	Temperatura
Å	Ångström
CaM	Calmodulina
CaMKK	Calmodulina quinasa quinasa
CaMK	Calmodulina quinasa
BIM	Bisindolilmaleimidias
BIM II	Bisindolilmaleimida II
BIM IV	Bisindolilmaleimida IV
BIM VII	Bisindolilmaleimida VII
BIM X	Bisindolilmaleimida X
BIM XI	Bisindolilmaleimida XI
TFP	Trifluoperazine
CPZ	Clorpromazina
Ca ²⁺	Ión calcio
Na ²⁺	Ión sodio
O ₂	Oxígeno
DM	Dinámica molecular
LGA	Algoritmo genético lamarckiano
M124C	Modificación del aminoácido metionina 124 por una cisteína
hCaM	Proteína calmodulina humana
M	Unidad de Molaridad
mBBr	Fluoróforo - monobromobinano
mg	Miligramos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
μ M	Micromolar
fM	Femtomolar
nM	Nanomolar
s	Segundos
ms	Milisegundos
fs	Femtosegundos
ps	Picosegundos
ns	Nanosegundos
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
pmoles	Picomoles
atm	Atmosferas
ns	Nanosegundos
P_0	Concentración de proteína
pH	Potencial de Hidrogeno
CaMBPs	Proteínas de Unión a Calmodulina
PDE1	Fosfodiesterasa 1
MLCK	Cinasa de cadena ligera de miosina
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
NG	Neurogranina
PKC	Proteína quinasa C
PS	Proteína sintasa
PK	Proteína quinasa
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
OTC	Cationes portadores de solutos
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
K_d	Constante de unión
K_i	Constante de inhibición
K_{AC}	Buffer de acetato de potasio

FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida
SDS	Detergente aniónico dodecilsulfato sódico
UV	Ultravioleta
DC	Dicroísmo circular
EI	Ionización electrónica
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora
NES	Equipo nuevo de supercomputo de la UNAM
GPU	Unidades de procesamiento gráfico
MRP1	Proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos
RMSD	Desviación de la media cuadrática
RMSF	Desviación de la media cuadrática de fluctuación
PDB	Protein Basa Date
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
MM/PBSA	Mecánica molecular/Área de superficie de Poisson Boltzmann
logP	Logaritmo de P
ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔH	Entalpía
ΔS	Entropía
ΔT	Diferencia de Tiempo

1.0 INTRODUCCIÓN

En este trabajo se utilizan herramientas de modelaje molecular las cuales se refieren a los métodos teóricos que se aplican a través de algoritmos computacionales para simular el comportamiento de las moléculas de un sistema. En este caso utilizamos el complejo CaM-BIM para obtener diferentes parámetros teóricos de unión: la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) así como calcular constantes de inhibición teóricas (K_i) mismos que nos ayuden a comprender los mecanismos de acción de posibles moléculas prototipo de fármacos y sus respectivos blancos moleculares.

Para ello se utilizó una de las técnicas computacionales de mayor importancia en el campo del modelado molecular conocida como Acoplamiento Molecular o Docking Molecular. Dicha técnica nos permite predecir la conformación más adecuada de una molécula al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable. Hoy día uno de los sistemas biológicos de gran interés y en los cuales se hace necesario la aplicación del Docking Molecular consiste en el estudio de la interacción proteína/ligando con el fin de descubrir fármacos con un gran potencial biológico.

A la par del desarrollo computacional se utilizó una herramienta de detección directa exitosa desarrollada por nuestro grupo de trabajo es el biosensor de calmodulina *hCaM-M124C-mBBr* que ha sido empleado para detectar la unión de diversos ligandos como Ca^{2+} , fármacos y metabolitos bioactivos. Este biosensor es una proteína humana recombinante, en la que se reemplazó a la metionina 124 por una cisteína, mediante mutagénesis sitio-dirigida y posteriormente se le unió covalentemente el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*), confiriéndole la propiedad fluorescente a la proteína.

Los compuestos Bisindolilmaleimida son prototipos de fármaco derivado de la estaurosporina, la cual es un alcaloide con actividad para el tratamiento del cáncer ya que activa proteínas como las caspasas lo que inicia el proceso de apoptosis celular. Estos compuestos han sido utilizados como inhibidores de la PKC así como en estudios de la función del receptor muscarínico.

1.1 Las biomoléculas y sus interacciones

Las biomoléculas son las estructuras más versátiles y complejas de la naturaleza; y sus funciones en la biología abarcan procesos celulares; desde proporcionar sostén a las estructuras celulares hasta la más exquisita combinación de enzimas y biomoléculas.¹

Las moléculas (fármacos, hormonas, proteínas) que se unen a un receptor se denominan ligandos. La unión puede ser específica y reversible. Un ligando puede activar o inactivar al receptor; a su vez, la activación puede incrementar o reducir la actividad de una determinada función celular. Cada ligando puede interactuar con muchos subtipos de receptores. Una cantidad reducida de fármacos son absolutamente específicos para un receptor o un subtipo de receptor determinado, pero la mayoría presenta una relativa selectividad.²

De las biomoléculas blanco para la acción de ligandos específicos, las proteínas juegan un papel muy importante debido a las diversas funciones que desempeñan (estructural, transporte, enzimática, regulación, etc.). El estudio de estas biomoléculas es fundamental para entender el mecanismo que se lleva a cabo en muchos procesos biológicos.

En el caso de las proteínas, éstas interactúan con otras proteínas o moléculas a través de la energía de afinidad, que varía desde órdenes de mM a fM. El grado de afinidad es determinante para la formación de complejos de tipo proteína-ligando, fungiendo como el ligando los iones Ca^{2+} , proteínas, enzimas, fármacos, péptidos, entre otros.

En la Figura 1^[3] se observa una proteína en conformación de alfa hélice y un ligando con estructura periódica. En la parte inferior de la imagen se muestra la proteína unida al ligando rodeada de un cubo color rojo el cual es su sitio activo. Conocer qué moléculas se unen y de qué manera resulta muy importante para entender las diversas funciones biológicas del organismo.

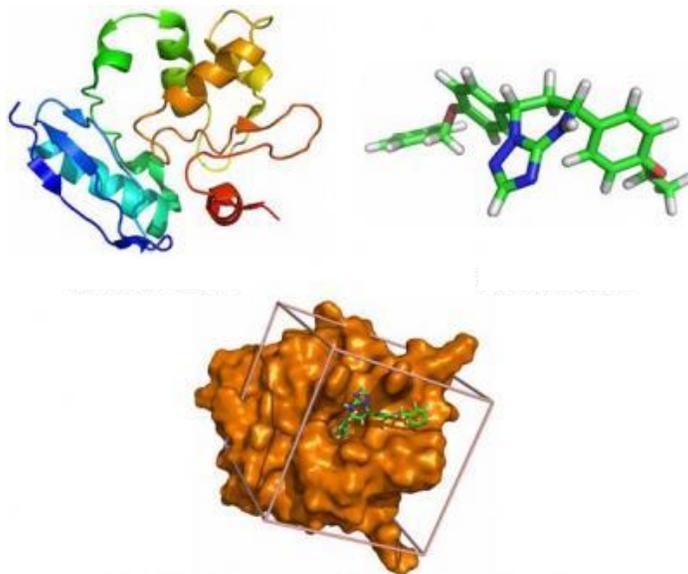


Figura 1. Proteína en superficie y con el ligando unido. La caja rodea el sitio activo.

La interacción de proteínas con diferentes ligandos puede ser explorada por diversas técnicas experimentales tales como: espectroscopías, calorimetría, difracción de rayos X, determinación estructural por resonancia magnética nuclear (RNM) y biosensores. Sin embargo, en el caso de las proteínas no basta con estudiar las diversas de las técnicas experimentales, sino que se requiere interpretar mejor su afinidad, selectividad y estabilidad y para ello es necesario utilizar modelos que detallen mejor su estructura; las herramientas de modelado molecular. La simulación molecular juega un papel esencial, principalmente en lo que respecta al modelado tridimensional de proteínas, cuyo objetivo es el estudio de las interacciones que le confieren su estructura específica, la predicción de sitios potenciales de reconocimiento de los ligandos (docking), así como simulaciones de su dinámica molecular (DM) y de su reactividad estructural frente a cambios del medio.

Las herramientas de modelaje molecular utilizadas en este trabajo se refieren a los métodos teóricos que se aplican a través de algoritmos computacionales para simular el comportamiento de las moléculas de un sistema.

1.2 Interacciones de fármacos

Un principio básico de la farmacología establece que las moléculas del fármaco deben ejercer alguna influencia química sobre uno o más componentes celulares para producir una respuesta farmacológica. Dicho de otra manera, las moléculas del fármaco deben estar suficientemente próximas a las moléculas que constituyen las células para alterar el funcionamiento de estas últimas.

Esos importantes lugares de unión se denominan blancos farmacológicos. Los mecanismos por los que la asociación de una molécula de fármaco y su blanco dan lugar a una respuesta fisiológica constituyen el principal impulso de la investigación farmacológica. La mayoría de los blancos farmacológicos son proteínas.

Para que un fármaco tenga alguna utilidad terapéutica o científica, debe actuar selectivamente sobre determinadas células o tejidos, es decir, debe demostrar una especificidad elevada por un lugar de unión. Por otro lado, las proteínas que actúan como blanco molecular para un fármaco no suelen mostrar una gran especificidad por el ligando; únicamente reconocen un ligando de un tipo determinado e ignoran las moléculas parecidas.

Una forma de conocer cómo es esta interacción entre el fármaco y su blanco molecular es estudiando las interacciones entre ellos a nivel molecular, lo que se conoce como mecanismo de acción farmacológico. El conocer a detalle la interacción entre los fármacos y sus receptores tiene una serie de ventajas entre las que se incluyen, posologías precisas, efectos adversos identificados, sinergismos establecidos, contraindicaciones conocidas, entre otras.

Por lo que en este trabajo se pretende estudiar las interacciones moleculares de 5 compuestos derivados de Bisindolilmaleimida (II, IV, VII, X y XI), utilizando herramientas de modelaje molecular y un biosensor de CaM.

1.3 La proteína calmodulina (CaM), como blanco molecular

La CaM es una proteína intracelular, ubicua, altamente conservada en células eucariotas; posee dos dominios de unión al ion Ca^{+2} conectados por un segmento flexible, esta presenta cambios conformacionales apreciables al unir ligandos (Figura 2).

La unión del ion Ca^{+2} expone un par de parches hidrofóbicos en la proteína, los cuales hacen posible la unión y modulación con alrededor de 300 proteínas de interés farmacológico. Algunos ejemplos de proteínas incluyen la fosfodiesterasa 1 (PDE1), cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), neurogranina (NG). Estos complejos juegan papeles importantes en diversos procesos celulares tales como: transcripción genética, apoptosis, síntesis de proteínas, división celular, contracción del musculo liso, etc. De igual forma la CaM une varios antagonistas clásicos tales como trifluoroperazina (TFP), clorpromazina (CPZ), malbrancheamidas (MBC), xantonas, vinblastinal, etc⁴; los cuales son utilizados en la terapéutica de algunas patologías.

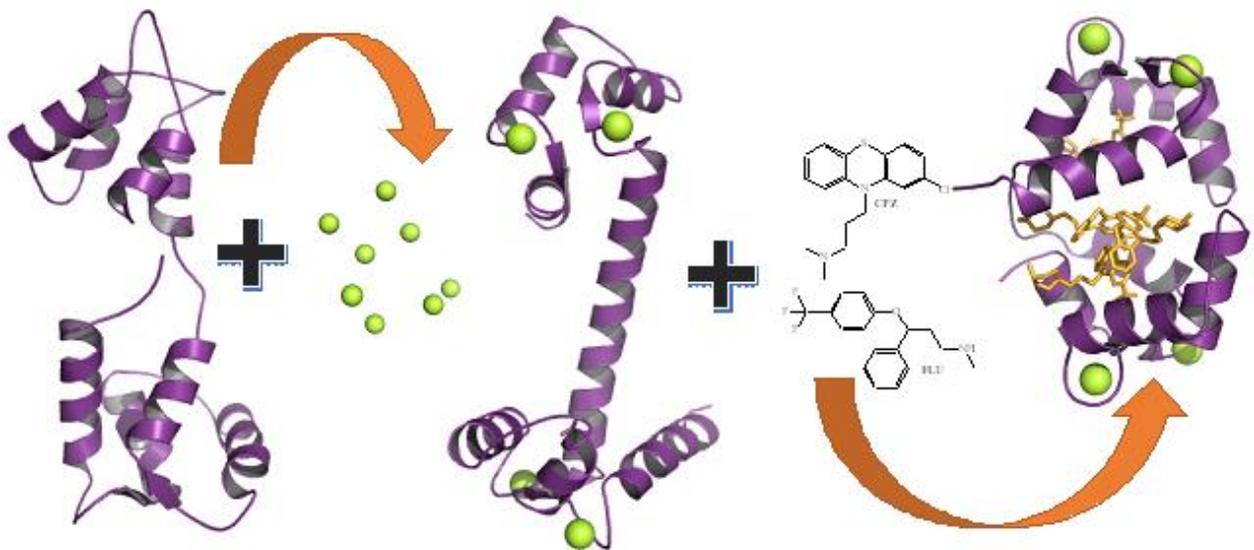


Figura 2. Cambio conformacional del sistema CaM-ligando al unirse con el ion Ca^{2+} .

1.4 Blancos moleculares regulados por la calmodulina

Los blancos moleculares que es capaz de regular la proteína CaM son diversos; en la Figura 3 se presentan algunos de ellos. Éstos se encuentran involucrados en el crecimiento celular, fosforilación, defosforilación, replicación, transcripción, metabolismo celular de calcio y segundos mensajeros, entre los más importantes.⁵ Las proteínas de unión a CaM (CaMBPs) se han agrupado principalmente en dos motivos relacionados, denominados 1-8-14 y 1-5-10 según la posición de los residuos hidrofóbicos conservados. Las proteínas que contienen el motivo 1-8-14 incluyen a calcineurina, sintasa de óxido nítrico, adenilil ciclasa y la cinasa de la cadena ligera de miosina. Otras CaMBPs, CaM cinasas (CaMKI, II) y la sinapsina, poseen el motivo 1-5-10. Las CaMBPs que no utilizan estos motivos incluyen a la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico 3'-5', adenilil ciclasa de mamífero y distrofina.

La CaM, también puede unir proteínas en una forma independiente de Ca^{2+} a través de una secuencia consenso denominada motivo IQ, descritas para las cadenas ligeras de miosina de tipo II convencionales y no convencionales, neuromodulina y neurogranina.

La regulación de las CaMBPs depende de la concentración de calcio que exista en el medio intracelular y de acuerdo con esto algunas proteínas se han podido clasificar principalmente en dos categorías^{6,7}:

- a) Proteínas de unión a CaM dependientes de calcio, proteínas que mantienen conservados los motivos 1-8-14 y 1-5-10.
- b) Proteínas de unión a CaM independientes de calcio, principalmente aquellas con dominio IQ.

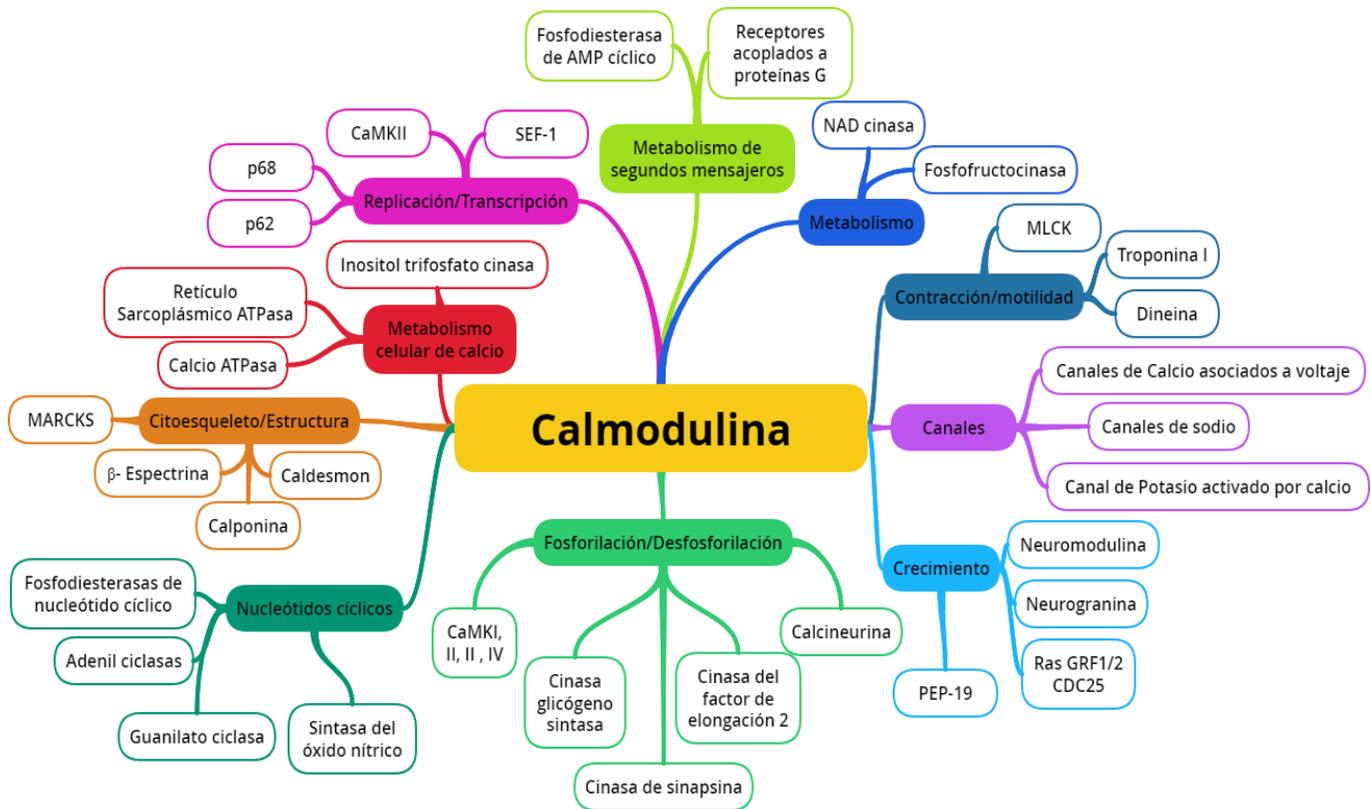


Figura 3. Clasificación de blancos moleculares de la proteína CaM de acuerdo al proceso celular regulado⁸.

La proteína CaM es un blanco molecular de diversos fármacos debido a que desempeña un papel importante en la regulación de muchos procesos fisiológicos tales como: regulación genética, síntesis de proteínas, contracción del músculo liso, transporte axonal, crecimiento celular, procesos de secreción, función de canales iónicos, motilidad celular y quimiotaxis, entre los más importantes. En el aspecto fisiopatológico está relacionada indirectamente con enfermedades de tipo neurodegenerativas como el Alzheimer, trastornos mentales del comportamiento como la esquizofrenia, cáncer, susceptibilidad viral y baja respuesta inmunológica.

Las (CaMBPs) pueden ser categorizadas en seis clases con base en su modo de regulación como se observa en la Tabla 1.⁹

Tabla 1. Clasificación de proteínas de unión a calmodulina.	
CLASE	TIPO DE REGULACIÓN
Clase A	Pertencen a esta clase, proteínas que se unen de manera irreversible a CaM en una forma independiente de calcio. Un ejemplo es la fosforilasa kinasa donde CaM es una subunidad del complejo que es activado por calcio.
Clase B	Estas proteínas se unen de manera reversible a CaM en ausencia de calcio. Por ejemplo, neuromodulina y neurogranina, que actúan como secuestradoras de CaM y la unen a la membrana cuando los niveles de calcio son “basales”. Pero cuando se dispara una señal de calcio la liberan para que pueda actuar.
Clase C	Estas proteínas forman complejos con CaM de baja afinidad inactivos cuando las concentraciones de calcio son basales. Cuando hay una señal de calcio aumenta la afinidad del complejo y se activan. Por ejemplo, la kinasa de la cadena liviana de la miosina (MLCK) y la fosfatasa calcineurina.
Clase D	Se unen en presencia de calcio, pero CaM no las activa, las inhibe. Por ejemplo, algunos miembros de los receptores kinasa acoplados a proteína G y el receptor para IP3 tipo I.
Clase E	Las más convencionales, que son activadas por el complejo CaM/Ca. Estas enzimas normalmente promueven su regulación por otras CaMBPs a través de fosforilación. Por ejemplo, las proteínas kinasas I, II y IV dependientes de CaM que son reguladas por la CaM kinasa kinasa (CaMKK)
Clase F	Las kinasa dependientes de CaM que regulan otras CaMBPs. Por ejemplo la CaMKK . Aquí se incluye un caso específico la CaM kinasa II, es una proteína multimérica que requiere que las subunidades catalíticas y substrato se unan a CaM para que se dé la autofosforilación.

1.5 Inhibición de la CaM

La actividad reguladora de la CaM se inhibe en presencia de clorpromazina (CPZ), fluoxetina (FLU), imipramina (IMI), vinblastina (VBT), vincristina (VCT) y serotonina (5-HT) entre otros. Por lo tanto, la identificación de fármacos que alteran la actividad de CaM puede proporcionar un nuevo enfoque para el tratamiento de procesos fisiológicos o patológicos.

En los últimos años, se han identificado varios compuestos que inhiben a CaM, entre los que se encuentran fármacos antipsicóticos, relajantes de músculo liso, agentes bloqueadores α -adrenérgicos, neuropéptidos, antipalúdicos, antiespasmódicos, antitumorales, antidepresivos, anestésicos locales, antihistamínicos y anticolinérgicos.²³

Los estudios de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de una variedad de inhibidores de CaM han demostrado que hay interacciones iónicas e hidrofóbicas entre los ligantes y la CaM. Las relaciones estructurales entre estas regiones iónicas e hidrófobas y otros factores como la estructura del fármaco (principalmente anillos resonantes, estructuras grandes e hidrofóbicas y halógenos presentes), fuerzas iónicas, interacciones electrostáticas, hasta ahora identificados, son factores importantes y necesarios para la unión efectiva de CaM-fármaco y no sólo es necesaria una característica aislada para la correcta interacción, incluso pueden dominar algunas características más que otras, pero eso depende de la naturaleza del fármaco.¹⁰

Muchos de los compuestos conocidos que inhiben a CaM tienen similitudes estructurales, lo que sugiere que la estructura geométrica de una molécula bioactiva es importante para determinar su interacción con la CaM. En muchos casos, ligeras modificaciones en la estructura química pueden alterar en gran medida la capacidad de un compuesto para unirse a la CaM e inhibir su actividad. Tal especificidad estructural es sugestiva de interacciones específicas de fármaco-receptor y no de unión hidrófoba simple. En la Figura 4 se muestra la estructura de la Clorpromazina, Fluoxetina, Imipramina Trifluoroperazina cuales de unen a CaM y como se mencionó anteriormente sus estructuras presentan similitudes, en este caso se utilizó la CPZ como control positivo de unión a CaM.

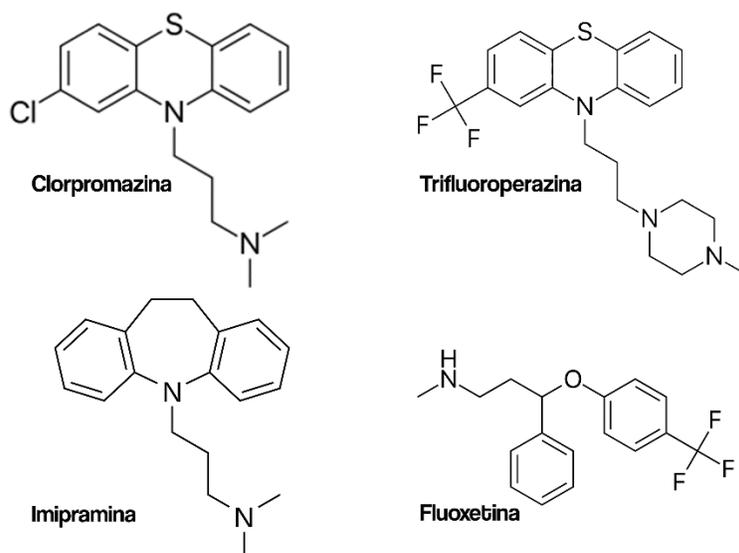


Figura 4. Estructuras de inhibidores de la CaM.

1.6 Bisindolilmaleimida

Las Bisindolilmaleimidias (BIM) son compuestos orgánicos derivados de indolocarbazoles, la estaurosporina está formada por un grupo maleimida y dos grupos indol unidos a él.¹¹ Se han sintetizado una serie de compuestos a partir de BIM con diferentes sustituyentes en uno de los indoles. Esta serie de BIM incluye del compuesto I al XI de los cuales se ha informado de su actividad biológica. Se sabe que BIM I es un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC)¹² y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)¹³, así como un antagonista competitivo en el receptor 5-HT3.¹⁴ BIM II es un inhibidor general de todas las PKC.¹⁵ Los BIM I, II, III, IV y V interactúan e inhiben el ABCG2 (un transportador con importancia potencial en la resistencia a los medicamentos contra el cáncer).¹⁶ BIM IV, además de inhibir la PKC, también inhibe la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA).¹⁵ BIM I, BIM II, BIM III, BIM VI, BIM VII y BIM-VIII inhiben el transportador de cationes orgánicos portadores de solutos (OCT) 1, involucrado en la captación de fármacos metabolizados en el hígado.¹⁷ BIM IX es un potente inhibidor de GSK-3.¹³ BIM X también se considera un inhibidor de las proteínas quinasas (PK).¹⁸ BIM XI inhibe la PKC y previene la activación y proliferación de las células T.^{19,20}

La estaurosporina es un inhibidor de protein-cinasas, ha sido caracterizado como un inductor de apoptosis en diversos tipos de células.²¹ El mecanismo por el cual la estaurosporina induce la apoptosis permanece polémico. La estaurosporina involucra la vía mitocondrial con la traslocación de Bax del citosol a la mitocondria teniendo como consecuencia la disfunción de la mitocondria y la liberación del citocromo c.²²

En este caso utilizamos los compuestos II, IV, VII, X y XI los cuales tienen estructuras similares entre sí como se muestra en la Figura 5.

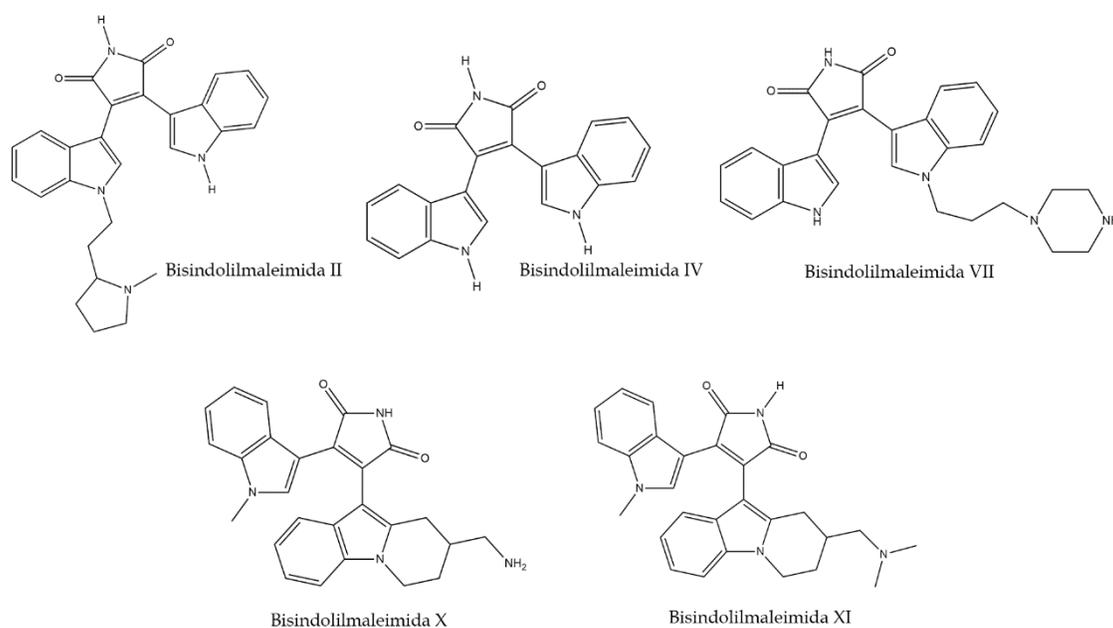


Figura 5. Estructuras de la serie de Bisindolilmaleimidias utilizadas en este trabajo.

1.7 Técnicas utilizadas para la determinación de interacciones proteína CaM-ligandos

En la Figura 6 se presentan algunos de los métodos utilizados para los estudios de interacción proteína-ligandos, los más utilizados incluyen: ensayos enzimáticos funcionales²⁴, electroforesis en geles de poliacrilamida en estado nativo²⁵, cromatografía de afinidad²⁶, mutagénesis sitio dirigida²⁷, cristalografía de rayos-X²⁸, espectroscopia de UV-Visible, dicroísmo circular²⁶, espectroscopia de Raman, resonancia magnética nuclear (NMR)²⁹, calorimetría de titulación

isotérmica (ITC)³⁰, espectroscopia de masas³¹ y métodos fluorescentes como transferencia de energía resonante (FRET)³² y biosensores fluorescentes de calmodulina³³⁻³⁵.

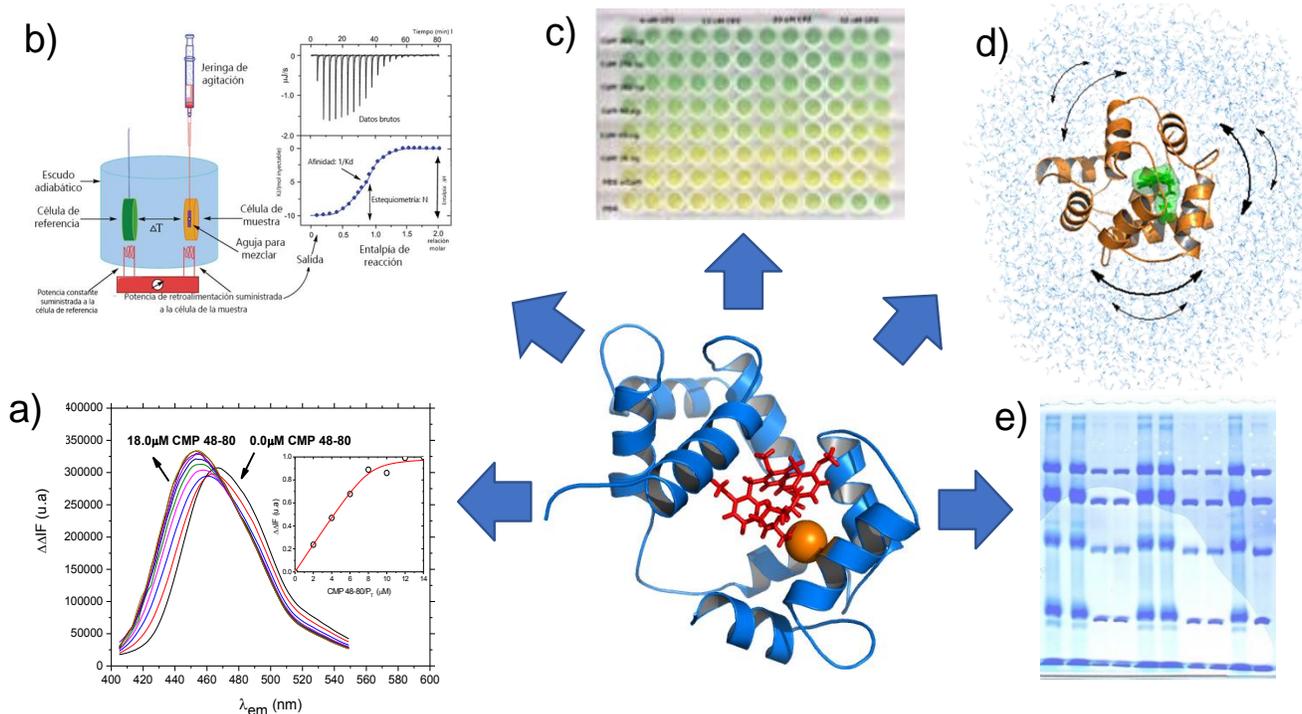


Figura 6. Técnicas utilizadas para el estudio de las interacciones biomoléculas-ligandos.

En esta figura se representan las principales técnicas que son utilizados para el estudio de interacciones entre una biomolécula y su respectivo ligando, así como el diseño de nuevas moléculas prototipo de fármacos. a) Ensayos de fluorescencia, b) Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI), c) Ensayos de actividad, d) Métodos in silico (Dinámica Molecular), e) Movilidad Electroforética (Nativa). A continuación de describes las técnicas utilizadas en el estudio de biomoléculas y ligandos. Sin embargo para el desarrollo de este estudio se utilizó un biosensor, fluorescencia y algunas herramientas quimionformáticas como el acoplamiento molecular y dinámicas moleculares.

1.7.1 Ensayos enzimáticos funcionales

La cinética enzimática es la ciencia que estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por enzimas, en la cual, las moléculas sobre las que actúan los enzimas se denominan sustratos y las moléculas resultantes de la conversión productos. El estudio de la cinética de un enzima permite explicar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo o incluso cómo se controla su actividad en la célula.

Las dos propiedades más importantes al trabajar con enzimas son: el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y la velocidad máxima de reacción que puede alcanzar. Para el estudio de estas propiedades en el laboratorio se realizan los ensayos enzimáticos. El procedimiento a seguir en estos casos es medir la aparición de un producto o la desaparición de un sustrato o la variación de un cofactor o de algún componente de la reacción frente al tiempo. Existen diversos métodos para realizar estas medidas. La espectrofotometría permite detectar cambios en la absorbancia de luz por parte del sustrato o del producto (según la concentración de estos) y la radiometría implica incorporación o liberación de radiactividad para medir la cantidad de producto obtenido por tiempo³⁶.

Por ejemplo, en el caso de la espectrofotometría:

- Si el producto absorbe luz a una longitud de onda determinada podemos evaluar la aparición del producto analizando el incremento de absorbancia a dicha longitud de onda.
- Si el sustrato absorbe luz a una longitud de onda determinada podemos evaluar la desaparición del sustrato analizando la disminución de absorbancia a dicha longitud de onda.
- De igual modo podemos analizar la variación de un cofactor o de algún componente de la reacción

En definitiva, la actividad de una enzima se mide mediante la determinación de la cantidad de sustrato formado por unidad de tiempo, en condiciones exactamente definidas (pH, T^a...) y estrictamente controladas como se presentan en la Figura 7.

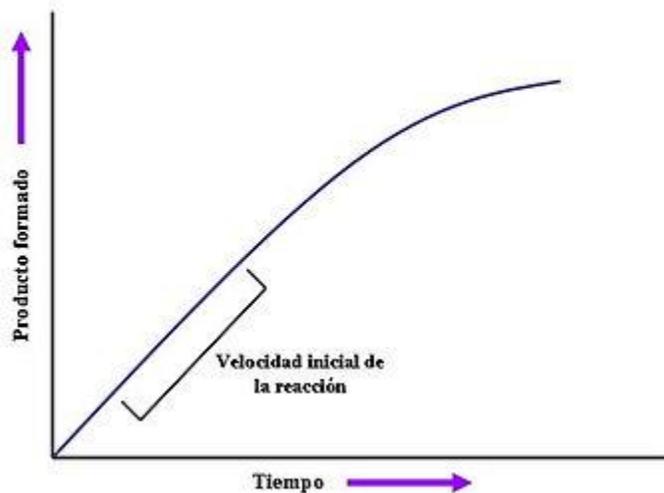


Figura 7. Ensayos enzimáticos funcionales. Técnicas utilizadas para el estudio de las interacciones biomoléculas-ligandos³⁶.

1.7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Controlando la concentración de ambas obtenemos geles de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro). Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica es conocida como SDS-PAGE. Para ello se prepara un gel en placa vertical (Figura 8).

Variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas³⁸.

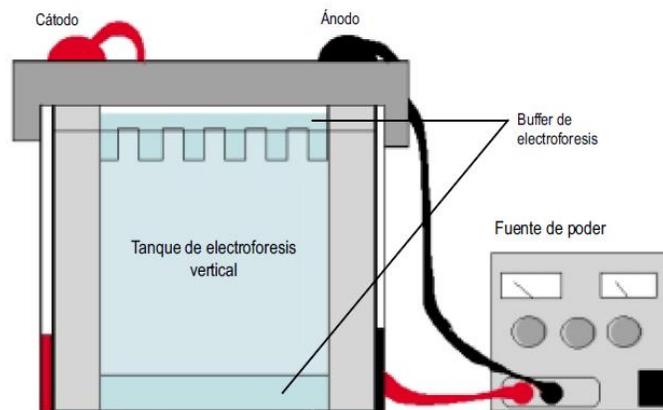


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida³⁷.

1.7.3 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa las proteínas (analitos) en función de su especificidad de fijación de ligandos. Los ligandos de afinidad son moléculas poliméricas que sirven de soporte porque están unidas covalentemente sobre la columna cromatográfica o matriz inerte que debe de tener una estructura de poro abierta y estabilidad en condiciones de cambio de pH, detergentes y agentes disociantes, para así, retener y adsorber específicamente a las proteínas, la fase estacionaria es sólida. Estos ligandos se clasifican según su naturaleza química o su selectividad para la retención de analitos, esta última se clasifica en ligandos específicos (anticuerpos) y generales (como las lecitinas). Cuando las proteínas no específicas se han lavado a través de la columna, se eluye la proteína ligada con solución que contiene ligando libre (Figura 9). Después se introduce una nueva fase móvil que se desactiva, generalmente por el acoplamiento o alteración de los sitios activos inhibidor-ligando, para que esto pueda ser posible, se necesita un cambio en el pH, la fuerza iónica o la polaridad, debido a que estas condiciones modifican

las características de los sitios activos, la finalidad de este proceso es hacer fluir a la proteína para continuar con la regeneración de la columna cromatográfica⁴⁰.

La cromatografía de afinidad tiene la ventaja de ser altamente selectiva para la retención de proteínas afines a la columna, para ello, emplea sistemas de baja presión, columnas cortas y un campo restringido para la separación.

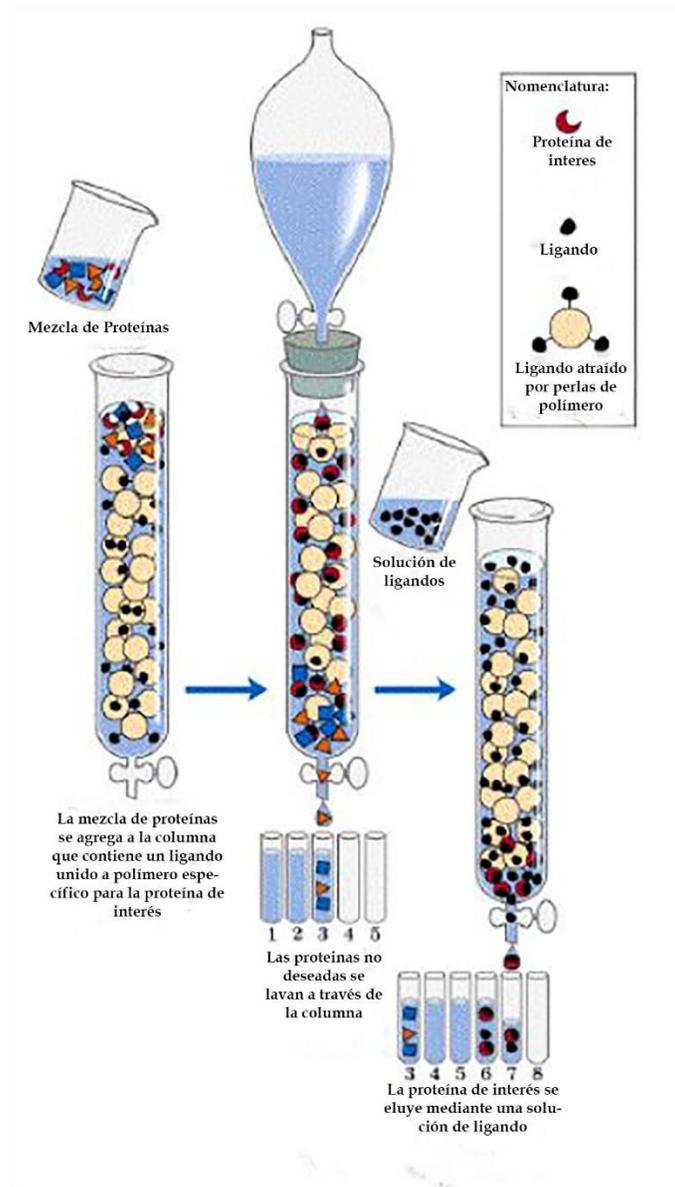


Figura 9. Esquema de cromatografía de afinidad.

1.7.4 Mutagénesis sitio dirigida

Técnica de introducción racional de cambios en la estructura primaria de una proteína a través de mutaciones puntuales en sitios específicos de su gen. Es necesario tener el gen clonado y conocer su estructura para decidir qué triplete codificador queremos alterar para que, según el código genético, resulte en un cambio de aminoácido. Las mutaciones se introducen mediante oligonucleótidos sintéticos que contienen el cambio deseado. El rediseño de proteínas tiene tantos usos en estudios fundamentales de las relaciones estructura-función como en la obtención de enzimas con propiedades biotecnológicas adecuadas.

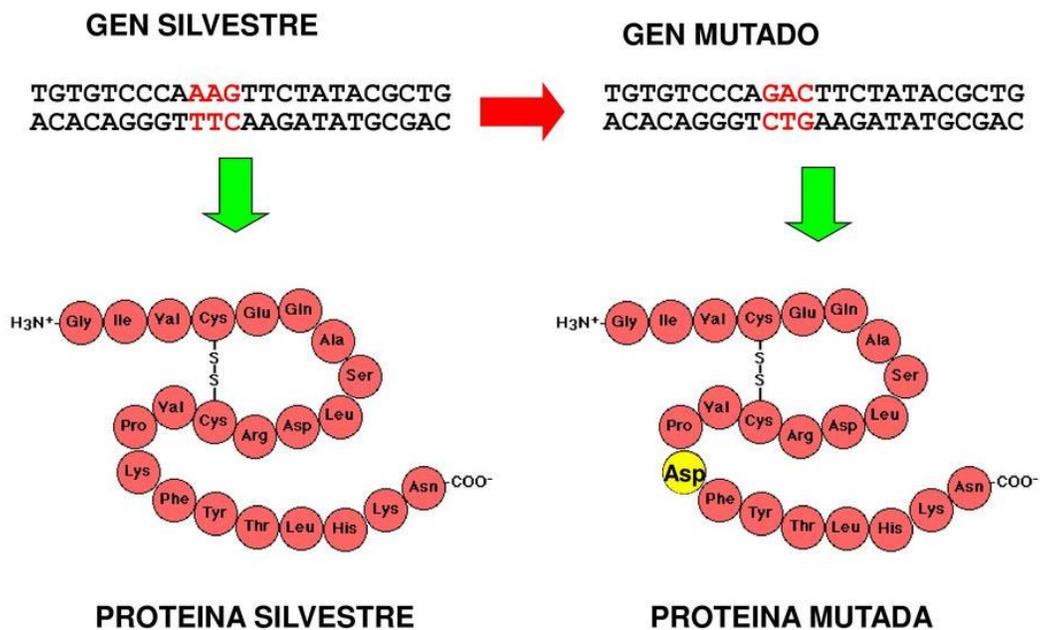


Figura 10. Mutagénesis sitio dirigida de una proteína. Se observa que el cambio de secuencia en el gen produjo un cambio del aminoácido.

1.7.5 Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es una técnica consistente en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio. El haz se escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, aplicando la ley de Bragg (Figura 11).

Por medio de esta técnica es posible dilucidar estructuras cristalinas. Gracias a esta técnica se ha podido averiguar la estructura y el mecanismo molecular y de actuación de moléculas biológicas de origen diverso, como proteínas, ácidos nucleicos, etc. También puede utilizarse en el diseño racional de fármacos. Sus mayores limitaciones se deben a la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos, por lo que no es aplicable a disoluciones, a sistemas biológicos in vivo, a sistemas amorfos o a gases. Es posible trabajar con monocristales o con polvo microcristalino, consiguiéndose diferentes datos en ambos casos. Para la resolución de los parámetros de la celda unidad puede ser suficiente la difracción de rayos X en polvo, mientras que para una dilucidación precisa de las posiciones atómicas es conveniente la difracción de rayos X en monocristal⁴¹.

La cristalografía de rayos X desempeñó un papel esencial en la descripción de la doble hélice de la molécula de ADN. Esta técnica se utiliza ampliamente en la determinación de las estructuras de las proteínas.

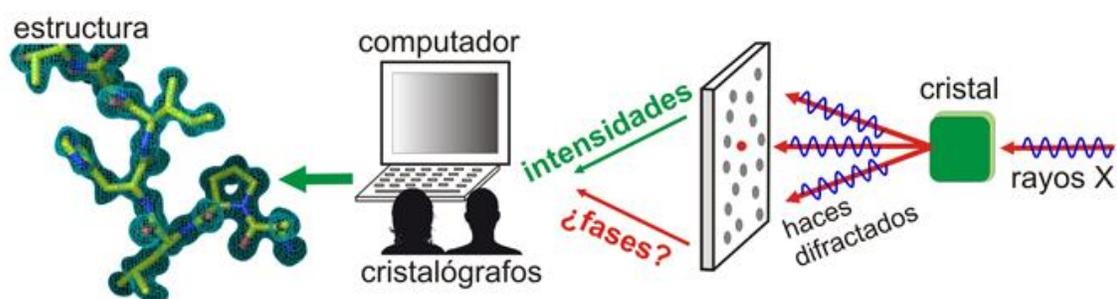


Figura 11. Esquema de cristalografía de rayos X.

1.7.6 Espectroscopia de UV-visible

La espectroscopia UV-Vis fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras moleculares. La técnica de espectroscopia UV-Vis es muy utilizada en el análisis cuantitativo, aunque en análisis cualitativo, en la determinación de estructuras, es superada por otras técnicas, como espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear⁴³.

La región espectral correspondiente al ultravioleta y visible va desde el UV lejano con longitud de onda entre 10 y 200 nm (también denominada UV de vacío porque

el O₂ absorbe en esta región justo por debajo de 200 nm), UV cercano entre 200 y 400 nm, y visible entre 400 y 800 nm (Figura 12). La radiación ultravioleta y visible se caracteriza por ser absorbida por electrones de valencia de moléculas y átomos, los cuales son excitados a niveles de energía superiores. La absorción de la radiación electromagnética por los electrones de valencia se encuentra, generalmente, dentro de la región ultravioleta del espectro; esto significa que, comúnmente, la materia es opaca a la radiación en alguna parte de esta región⁴².

La absorción molecular en la región ultravioleta y visible del espectro depende de la estructura electrónica de una molécula. La absorción de energía se cuantifica y da por resultado la elevación de los electrones desde orbitales en el estado básico a orbitales de mayor energía en un estado excitado. Para muchas estructuras electrónicas, la absorción no ocurre en una porción fácilmente accesible de la región ultravioleta.

En la práctica, la espectrometría ultravioleta está limitada en gran parte a los sistemas conjugados. Sin embargo, se tiene gran ventaja en cuanto a la selectividad de la absorción ultravioleta: los grupos característicos pueden reconocerse en moléculas de complejidad ampliamente variable. Una gran parte de la molécula relativamente compleja puede resultar transparente en el ultravioleta de modo que existe la posibilidad de obtener un espectro similar al de una molécula bastante más simple.

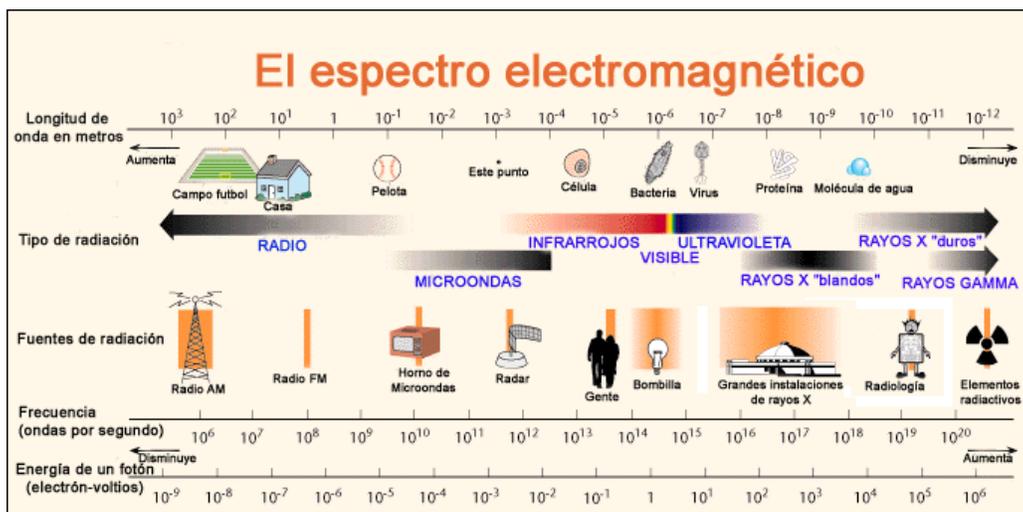


Figura 12. Espectro electromagnético.

1.7.7 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular se refiere a la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados dependiendo de la forma de polarización del haz incidente. Se dice que un material presenta dicroísmo circular cuando la absorción de la luz circularmente polarizada en una dirección (derecha) es diferente de la absorción de la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (izquierda) (Figura 13). Cuando la luz se polariza circularmente, surge un componente secundario de absorbancia. Este componente secundario de absorbancia se mide como el cambio entre la luz polarizada circularmente (RCP) a la derecha e izquierda, y la diferencia resultante se expresa como absorbancia⁴⁴.

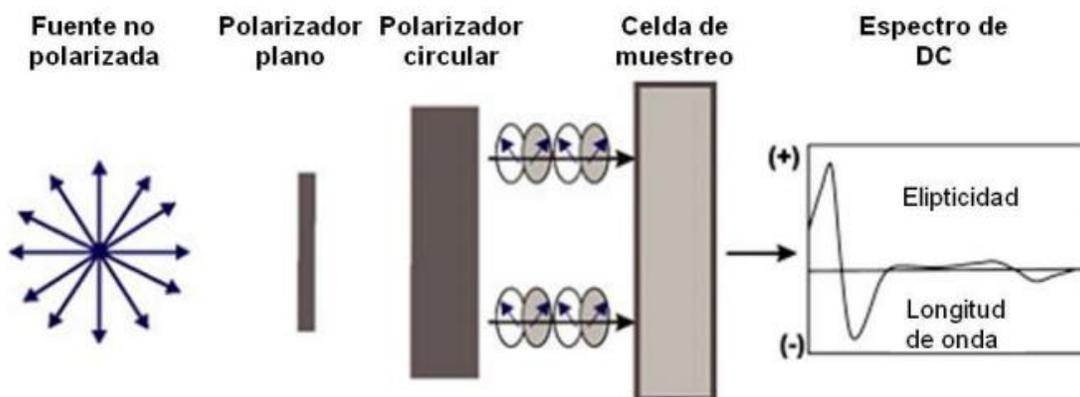


Figura 13. Esquema de DC en el que se mide la diferencia en absorción⁴⁴.

1.7.8 Espectroscopia de Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica utilizada para obtener en pocos segundos información química y estructural de diversas sustancias. El análisis por espectroscopía Raman se basa en la medición de la luz dispersada por un material sobre el cual se hace incidir un haz monocromático. La luz dispersada presenta cambios en la longitud de onda respecto al haz incidente dependiendo de la estructura química de la muestra. Esto también permite determinar semi cuantitativamente la cantidad de sustancia en una muestra de casi cualquier material o compuesto para su identificación, detectar vibraciones en moléculas y

caracterizar fases puras y mezclas de minerales con un empaquetamiento atómico similar⁴⁵.

1.7.9 Resonancia magnética nuclear

La RMN permite resolver la estructura de compuestos orgánicos y organometálicos, posibilita la determinación de la estereoquímica del esqueleto carbonado y proporciona una información valiosa de otros núcleos magnéticamente activos. La RMN es una espectroscopía de absorción, cuyo fundamento radica en la propiedad que poseen algunos núcleos de absorber energía cuando son sometidos a la acción de radiofrecuencias. Este tipo de radiación provoca un tránsito entre niveles de energía resultante de la interacción de un campo magnético externo con las distintas orientaciones del espín nuclear (Figura 14)⁴⁶.

En la actualidad, no se conoce una técnica más potente que la espectroscopía de RMN en la dilucidación de estructuras moleculares en fase líquida, por lo que esta técnica constituye el pilar básico para aquellos investigadores que precisen de dicha información a lo largo de sus trabajos.

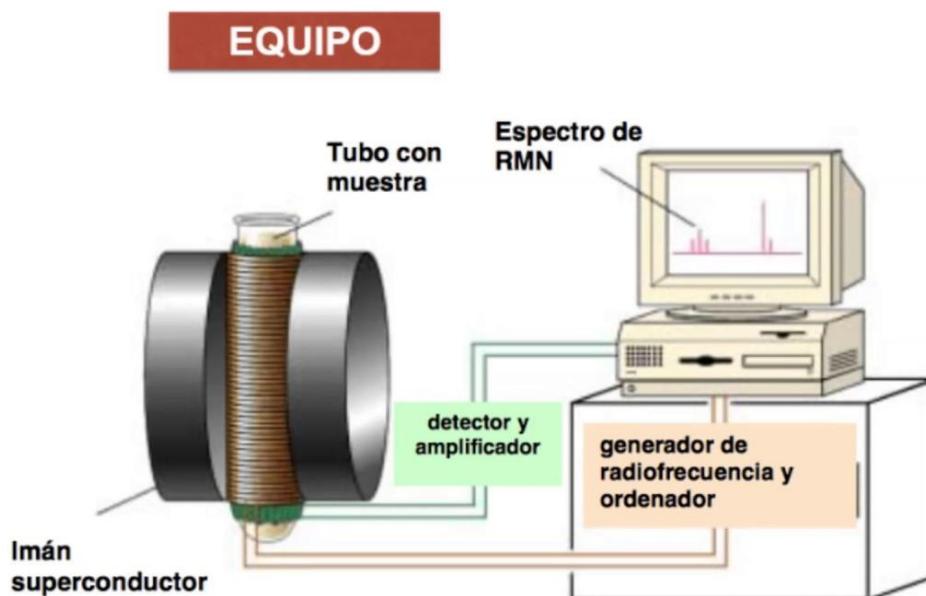


Figura 14. Esquema de equipo para Resonancia Magnética Nuclear.

1.7.10 Calorimetría de titulación isotérmica

Un calorímetro es un instrumento que sirve para medir la cantidad de calor que libera o absorbe una muestra en la que ocurre algún evento que refleja las interacciones moleculares presentes entre los componentes de la muestra. Éste puede ser la unión de una molécula pequeña (ligando) a una macromolécula (proteína), una reacción química o el cambio estructural que sufre una proteína cuando se calienta. Todos los calorímetros constan de los mismos elementos básicos en su diseño y operan con los mismos principios. Las diferencias entre ellos están en la cantidad de muestra que requieren y en su precisión.

En la Figura 16 se presentan los elementos básicos de un calorímetro. En este caso, se trata de un calorímetro de titulación isotérmica (CTI). Éste tiene dos celdas idénticas, una de referencia (R) que se llena de agua pura y otra que contiene la muestra (M). Ambas están colocadas dentro de una “chaqueta térmica” que las aísla del exterior, evitando así pérdida o ganancia de energía desde el entorno. El calorímetro establece una diferencia de temperatura (ΔT) muy pequeña, aproximadamente de 0.0001 grados o menos, de tal manera que la medición se realiza a temperatura constante, y de ahí el empleo de la palabra isotérmico en el nombre del calorímetro. En la celda M se coloca la punta de una jeringa que permite inyectar pequeñas cantidades de su contenido. Típicamente, en la celda M se sitúa una solución de una proteína (P) y en la jeringa una solución de ligando (L) cuya interacción con la proteína se desea estudiar. Al realizar una primera inyección o titulación, L y P entran en contacto dentro de la celda M e interaccionan entre sí, liberando o absorbiendo calor. Así, la celda M se calienta o se enfría y el ΔT original cambia. El CTI entonces proporciona energía a la celda que esté a menor temperatura para recuperar el ΔT original. Esto lo hace a través de unos dispositivos llamados termopares. De hecho, lo que el CTI realmente mide no es el cambio de temperatura ΔT sino la potencia (corriente y voltaje) proporcionada a través de estos dispositivos.

La cantidad de energía que hay que proporcionar para recobrar el ΔT original es igual a la cantidad de energía que se liberó o absorbió debido a la interacción o

unión entre P y L en esa primera inyección. Esta energía es el área del primer pico de la Figura 16. En subsecuentes titulaciones, la cantidad de energía debida a la unión de L a P disminuye, ya que la cantidad de P libre en la celda (sin tener a L unido) es cada vez menor. Es decir, las áreas de los picos van decreciendo. En un experimento exitoso, en las últimas titulaciones esta energía es muy cercana a cero, ya que todas las moléculas de proteína tienen unido a L. Con un CTI, entonces, la medición se realiza a temperatura constante, variando la concentración de la sustancia que esté colocada en la jeringa.⁴⁷

En la figura 15 se observa cómo está compuesto un calorímetro (los elementos básicos), el cual consta de dos celdas idénticas, la de referencia R que se llena de agua pura y la de la muestra M que se llena de una solución de proteína P. En la celda M se coloca una jeringa que contiene una solución de una sustancia L cuya interacción con la proteína se desea estudiar. El calorímetro establece una diferencia de temperatura ΔT entre ambas celdas que se encuentra aisladas del exterior por una chaqueta térmica. Lo que el CTI realmente mide no es el cambio de temperatura ΔT sino la potencia (corriente y voltaje) proporcionada a través de estos dispositivos.

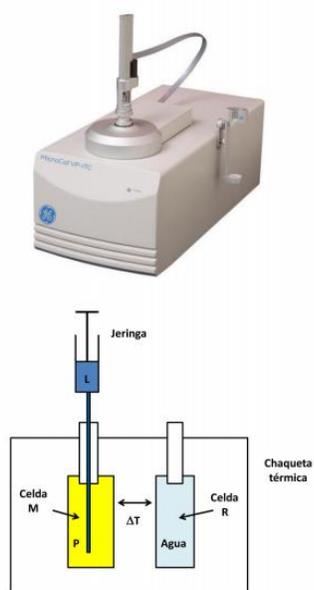


Figura 15. Calorímetro de Titulación Isotérmica (CTI)⁴⁷.

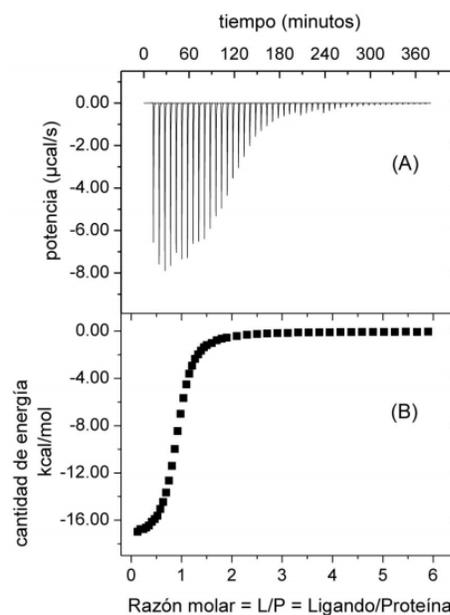


Figura 16. Interacciones entre Ligando/Proteína⁴⁷.

En la figura 16 se presenta un par de gráficas de titulaciones en donde se observa la energía de interacciones de L y P a diferentes razones molares. En las últimas titulaciones esta energía debe ser muy cercana a cero ya que todas las moléculas de proteína tienen unido un ligando.

1.7.11 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para dilucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (electron ionization EI), algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su “huella química” para caracterizar el analito⁴⁸.

El proceso de análisis por espectrometría de masas comienza en llevar el compuesto a analizar a fase gaseosa. Las muestras pueden ser introducidas al espectrómetro de masas usando una sonda directa o por entrada en lote (batch) para sólidos puros o líquidos volátiles. Analitos purificados por diferentes técnicas de separación (cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, etc.) pueden entrar al espectrómetro de masas tan pronto como vayan saliendo.

El proceso de ionización más común en análisis en fase gaseosa es el de ionización electrónica (EI), en el cual se transfiere energía a la molécula neutra en estado de vapor, dándole suficiente energía para expulsar uno de sus electrones y de ese modo tener una carga residual positiva. Este proceso produce un ion con carga positiva y un electrón suelto. La molécula ionizada puede tener energía excesiva que puede ser disipada a través de la fragmentación de ciertos enlaces químicos.

El rompimiento de varios enlaces químicos permite la producción de fragmentos de ion cuya masa es igual a la suma de las masas atómicas de un grupo de átomos que retienen la carga positiva durante el proceso de fragmentación⁴⁸.

Para compuestos no volátiles, iones de la molécula intacta son producidos al pasar la solución por un campo eléctrico (electrospray ionization) o por bombardeo de partículas (fast atom bombardment) o por interacción con especies fotoexcitadas (matrix-assisted laser desorption).

Después de producir los iones, el siguiente paso es su análisis en el analizador de iones de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Los iones tienen una carga eléctrica que les permite ser controlados por campos eléctricos; son separados por su valor m/z en el analizador de masas como se observa en la Figura 17.

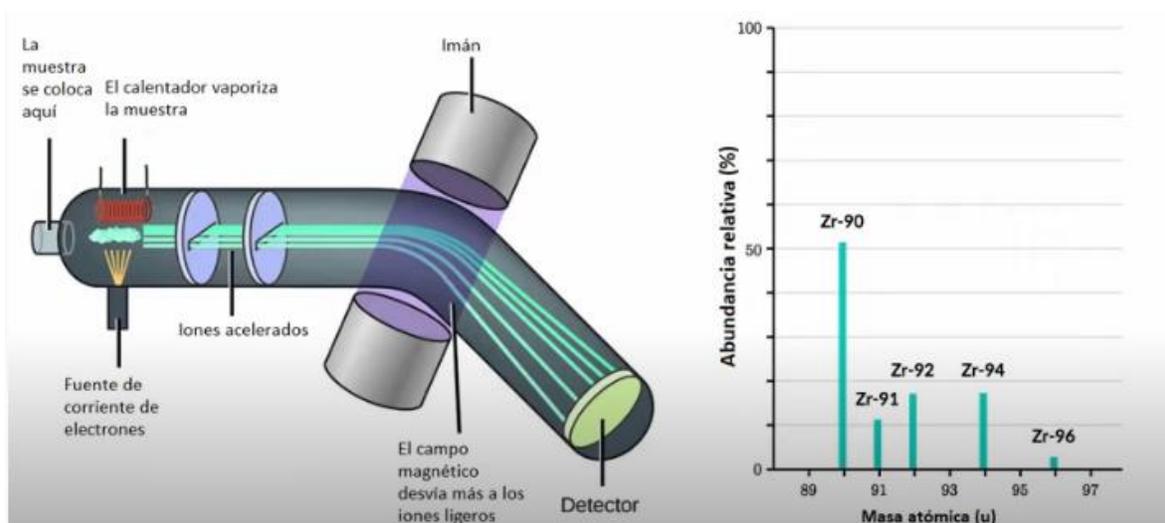


Figura 17. Esquema de Espectrometría de masas.

1.7.12 Métodos fluorescentes: Transferencia de energía resonante (FRET)

La energía de excitación puede ser transferida por medio de un mecanismo no radiativo de acoplamiento dipolo-dipolo a un fluoróforo vecino (Figura 18). Se produce la promoción de un electrón del aceptor a un estado singlete de mayor energía mientras el electrón excitado del donador retorna al estado fundamental. Los métodos de transferencia de energía de resonancia de Förster FRET se utilizan

para determinar distancias intra e intermoleculares de proteínas y en general complejos macromoleculares en el intervalo de 10- 100Å. Aunque las distancias son menos precisas que las determinadas por cristalografía de rayos X o RMN, la técnica de FRET es útil para caracterizar cambios conformacionales en macromoléculas en disolución y en condiciones muy cercanas a las fisiológicas.⁴⁹

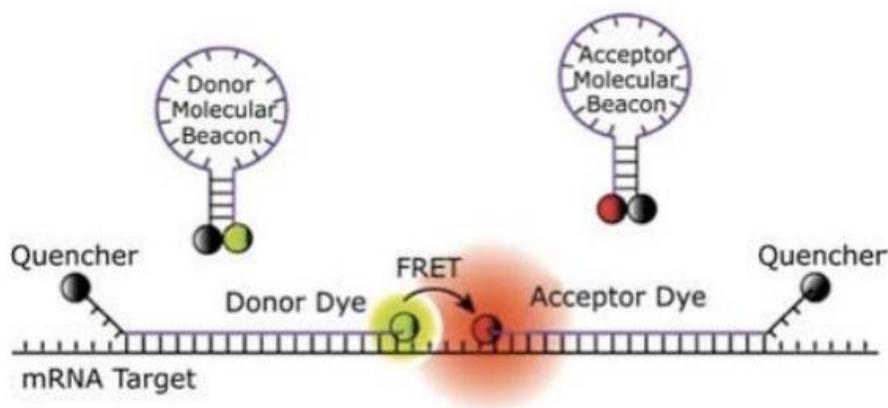


Figura 18. Transferencia de energía de resonancia de Förster.

1.7.13 Biosensores fluorescentes de la CaM

Los biosensores son sistemas que presentan un mecanismo híbrido para transformar la información de las interacciones químicas en señales analizables por medio de mecanismos bioquímicos. Estos dispositivos están constituidos por un sistema receptor que generalmente es un componente biológico, que interacciona específicamente con un analito y transduce la señal a un sistema detector, siendo este último de tipo espectroscópico, eléctrico, mecánico, etc. Nosotros hemos construido una serie de biosensores de la proteína CaM con diferentes fluoróforos para analizar distintos tipos de ligandos de esta proteína, así como para estudiar las interacciones con otras proteínas que modula la CaM⁵⁰⁻⁵⁴. El interés en el desarrollo de biosensores ha sido particularmente impulsado por las necesidades de contar con nuevas herramientas para caracterizar las interacciones que presentan algunas proteínas de interés, así como desarrollar a futuro técnicas analíticas rutinarias y accesibles para el análisis de un gran número de muestras, con selectividad, sensibilidad y reproducibilidad.

La estrategia de construcción de estos biosensores consta de tres etapas básicamente (Figura 19). 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.) 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 específicos a los grupos tioles de las cisteínas.

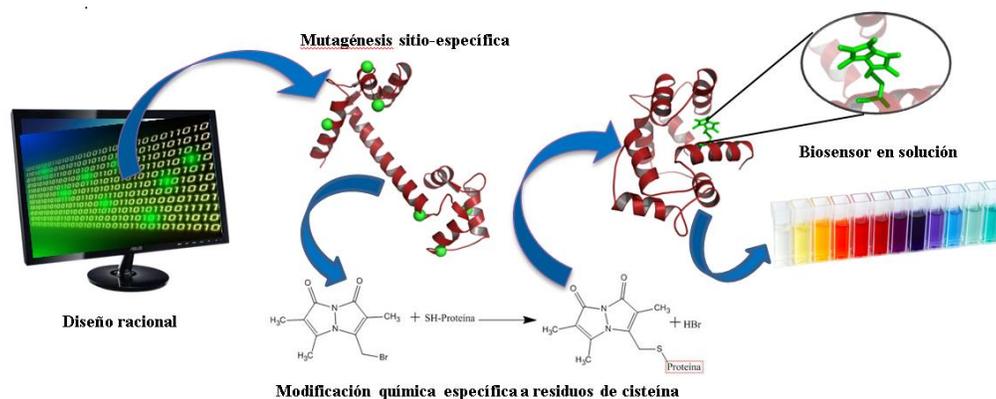


Figura 19. Estrategia general en la construcción de biosensores, usando diseño racional, mutagénesis sitio-dirigida y marcaje sitio-específico.

1.7.14 Principios de la fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mejor que las de la espectroscopía de absorción. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden excitar para que se presente la fluorescencia⁵⁵.

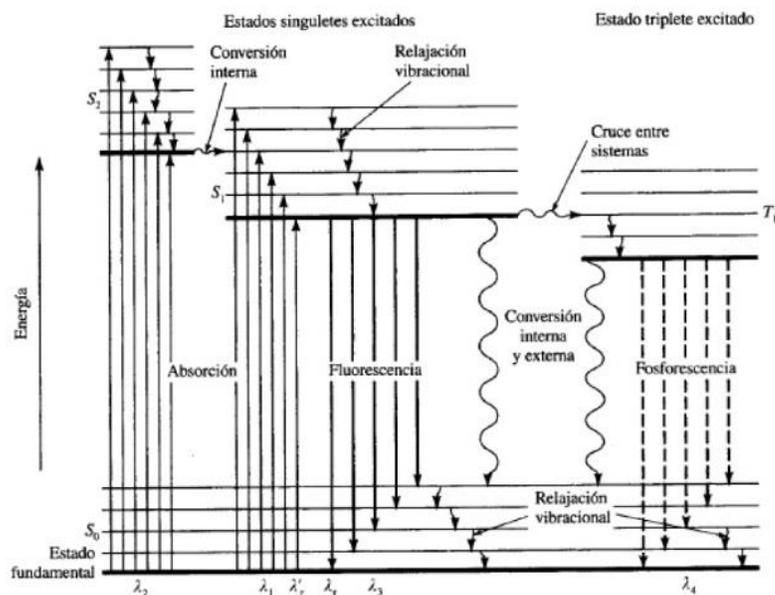


Figura 20. Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente.

Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de las más importantes de estos mecanismos son la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente.

La relajación vibracional, señalada por las flechas onduladas cortas entre los niveles de energía vibracionales, tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Durante estas colisiones el exceso de energía vibracional se transfiere a las moléculas del disolvente en una serie de etapas como se indica en la Figura 20. La ganancia de energía vibracional del disolvente se refleja en un ligero incremento de la temperatura del medio. La relajación vibracional es un proceso tan eficiente que el tiempo de vida promedio de un estado vibracional excitado es de 10-15 s aproximadamente. También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado electrónico excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico. Este tipo de relajación llamado algunas veces conversión interna, se ilustra por las flechas onduladas largas⁵⁵.

En la Figura 20 se ilustra el otro proceso de relajación: la **fluorescencia**. Se puede observar que las bandas de radiación son producidas cuando las moléculas emiten fluorescencia debido a que las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico fundamental. Las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa⁵⁵.

De manera general la instrumentación que se utiliza para medir fosforescencia y fluorescencia es similar a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros de ultravioleta/visible y se les conoce como fluorómetros. Casi todos los instrumentos de fluorescencia utilizan ópticas de doble haz (el de muestreo y uno de referencia) tal como se muestra en la Figura 21. El haz de la fuente pasa primero a través de un filtro o un monocromador de excitación, que transmite la radiación es aquí cuando una parte de la luz incidente es absorbida por la muestra y algunas de las moléculas de la muestra producirán fluorescencia. La luz fluorescente es emitida en todas las direcciones. Parte de esta luz fluorescente pasa a través de un segundo filtro o monocromador de emisión y llega a un detector, el cual muy a menudo se encuentra a 90° con respecto al haz de luz incidente para minimizar el riesgo de que la luz incidente reflejada o transmitida llegue al detector⁵⁵.

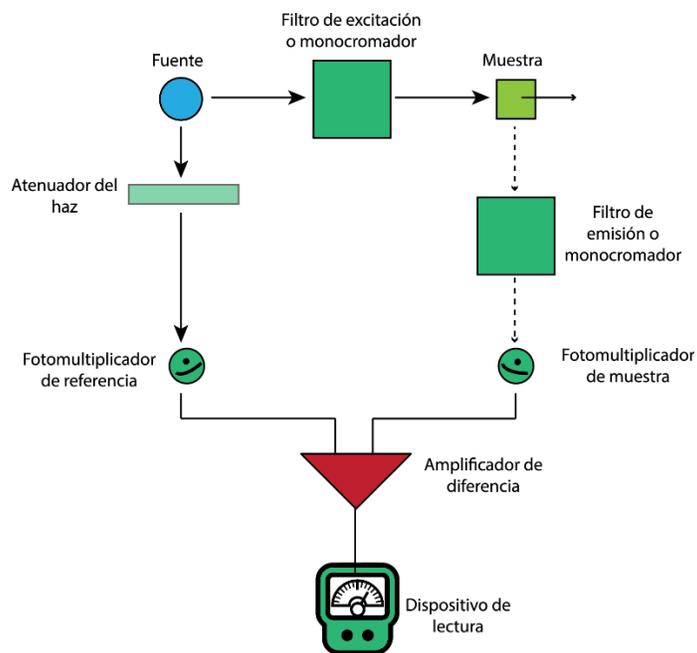


Figura 21. Representación esquemática de un fluorómetro.

Mientras tanto el haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia a aproximadamente la de la radiación fluorescente (de la muestra). Las señales procedentes del fotomultiplicador de la muestra y del de referencia se dirigen a un amplificador diferencial cuya salida se visualiza en un medidor o en un registro.

1.7.15 Quimioinformática

La quimioinformática es una herramienta que surge de la combinación de recursos informáticos y datos químicos, y se emplea en el manejo, visualización y análisis sistemático de información química. Esta herramienta permite analizar eficientemente miles de datos. A través de métodos quimioinformáticos es posible manejar y organizar información, visualizar el espacio químico, hacer minería de datos y establecer asociaciones matemáticas entre la estructura y actividad⁵⁷.

La quimioinformática tiene diversas aplicaciones no solamente en farmacia, sino también en otras áreas como química analítica y orgánica. Respecto al manejo de bases de datos, la quimioinformática se emplea para analizar cuantitativamente la diversidad química, la visualización del espacio químico y el contenido y diversidad de núcleos base (molecular scaffolds), entre otras aplicaciones⁵⁶.

Es común que en grupos dedicados al diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) realicen análisis quimioinformáticos de bases de datos moleculares para obtener su perfil en al menos 3 aspectos: propiedades fisicoquímicas, diversidad estructural y distribución en el espacio químico⁵⁶.

Establecer relaciones estructura-propiedad (structure-property relationships [SPR]) es una práctica común en muchas áreas de la química. En farmacia es frecuente enfocarse a la actividad biológica como la propiedad de interés. Por tanto, es importante tomar en cuenta los parámetros como el coeficiente de partición (log P) que es una medida de la afinidad relativa de una sustancia por los lípidos vs agua y con el cual se predice la posibilidad de que el compuesto pase por difusión pasiva a través de la membrana. Dicho de otra manera, con este parámetro se estima si un fármaco podrá ser absorbido por las células y en qué proporción.

1.7.16 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular automatizado (o en inglés *molecular docking*) consiste en buscar la conformación y posición óptima de un ligando (por ejemplo, de una molécula orgánica pequeña) dentro de una diana molecular (por ejemplo, una enzima, un canal iónico o un receptor acoplado a proteína G)⁵⁷.

El acoplamiento molecular es posible entre 2 macromoléculas, como 2 proteínas. Considerando la flexibilidad de las moléculas, el número de posibles conformaciones puede ser muy elevado. De igual manera, si la cavidad del sitio receptor es grande y/o flexible, es más complicado encontrar la posición y orientación que tendrá la molécula pequeña dentro del receptor. Es así que el uso de computadoras ayuda a acelerar el proceso de búsqueda y sugiere modelos de unión⁵⁷.

El acoplamiento molecular automatizado tiene 2 componentes: a) *docking* o proceso de búsqueda de la conformación y orientación de las moléculas, y b) *scoring*, que consiste en asignar un valor o puntaje que mida la interacción entre las 2 estructuras.

De las 2 etapas, la segunda es la más difícil de calcular con precisión de forma rápida. Es por esto que en la actualidad el acoplamiento molecular es especialmente útil para proponer modelos de unión, pero aún no son muy confiables para calcular con precisión la energía de interacción. Esto se debe a la gran cantidad de aproximaciones que se hacen para calcular la energía de interacción de forma rápida. Por ejemplo, no se considera en detalle la flexibilidad y solvatación de la diana molecular. Para solucionar este problema los modelos obtenidos por acoplamiento molecular se someten a otros cálculos más refinados que se calculan con niveles de teoría elevados⁵⁷.

1.7.17 Dinámicas moleculares

Un modelo teórico que nos permite explorar las estructuras moleculares y sus evoluciones en el tiempo, en función de las distintas condiciones físicas y químicas del medio, es el conocido como Dinámica Molecular (DM). La DM simula los movimientos moleculares para visualizarlos en tiempo real. Los períodos de tiempo estudiados son del orden de varias decenas de picosegundos (ps, 10^{-12} s), si bien se generan estructuras cada femtosegundo (fs, 10^{-15} s). Cada átomo se trata como una partícula que obedece las ecuaciones de Newton [$\mathbf{F} = m(d^2\mathbf{r}/dt^2)$] y que está ligado a los otros átomos que forman la molécula por una función de energía potencial que tiene en cuenta las distintas interacciones entre ellos. Las integraciones sucesivas de esta ecuación en función del tiempo proporcionan una trayectoria del átomo. Es importante remarcar que este modelo nos proporciona estructuras promediadas en el tiempo de simulación. La introducción de la variable tiempo, así como la posibilidad de evaluar propiedades termodinámicas (temperatura, capacidad calorífica.) promediadas en el tiempo, hacen de estos modelos de DM una visión aceptable de una realidad dinámica y proporcionan una increíble cantidad de detalles, aun cuando el tiempo asumido en el estudio sea pequeñísimo.

Las aplicaciones actuales de la DM son, entre otras, el análisis conformacional de macromoléculas (proteínas, polímeros...), gracias al cual podemos estudiar las variaciones de conformación de una estructura. Otra aplicación importante de la DM

es el cálculo de coeficientes de difusión de solutos en plásticos artificiales, membranas lipídicas y biopolímeros, así como la formación de clusters de agua alrededor de proteínas y las interacciones entre componentes de distintos componentes de un sistema complejo, como es el caso de la lignina con las microfibrillas de celulosa.

2.0 HIPÓTESIS

Estudiar las interacciones entre los complejos CaM-Bisindolilmaleimidias a nivel molecular utilizando un biosensor fluorescente (*hCaM M124C-mBBr*) y herramientas de modelaje molecular permitirá obtener información de la afinidad de nuevas moléculas para ser consideradas como nuevos fármacos anti-CaM.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar a nivel molecular las interacciones de cinco bisindolilmaleimidias con la Calmodulina utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* y herramientas de modelaje molecular para el descubrimiento de nuevos inhibidores de la calmodulina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar posibles inhibidores de la CaM a partir del catálogo de pequeñas moléculas bioactivas de las principales farmacéuticas del mundo (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/bioactive-small-molecules/bioactive-small-molecule-products.html>)
2. Calcular las K_{ds} de cinco bisindolilmaleimidias a saturación de calcio utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*.
3. Modelar las estructuras tridimensionales de cinco bisindolilmaleimidias utilizando HyperChem y minimizándolas con el campo de fuerza Amber.
4. Realizar estudios de acoplamiento y dinámica moleculares de complejos CaM-bisindolilmaleimidias utilizando el programa Amber.
5. Calcular las contribuciones energéticas de los complejos a partir de las trayectorias de dinámica molecular mediante la paquetería de Amber (CPPTTrack).

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Químicos

El biosensor (*hCaM M124C-mBBR*) se obtuvo utilizando la metodología descrita anteriormente por González-Andrade, M. y col.⁵⁰ El fármaco CPZ y moléculas BIM se adquirieron de Sigma Aldrich Co (St. Louis, MO, EUA) y Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas Texas, EUA.). Los reactivos buffer, TRIS, Ca²⁺, NaCl y CaCl₂ eran de grado reactivo analítico y se adquirieron de Sigma Aldrich.

3.2 Determinación de la K_d de la proteína CaM por fluorescencia

La determinación de la K_d se calculó a partir de titulaciones en fluorescencia del biosensor de CaM con el compuesto a evaluar; se utilizó una concentración de 1 μM del biosensor de CaM (en un volumen final de 2 mL) y una solución de compuesto de 2 mM, en buffer de acetato de potasio KAC 5 mM, pH 5.1 a 37 °C. La λ_{ex} del biosensor de CaM es de 381 nm y la λ_{em} es en un intervalo de 405-550 nm con 10 integraciones y colectando cada 2 nanómetro.

Los valores de K_d, se determinaron a partir de las diferencias existentes entre las λ_{max} en función de la concentración del compuesto a evaluar, utilizando la siguiente ecuación:

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

en donde P₀ y L₀ es la concentración de proteína y ligando presentes, K_d es la constante de disociación.

3.3 Preparación de archivos de coordenadas iniciales

Las coordenadas correspondientes a la estructura de CaM se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org>). Se eligieron los complejos CaM-

ligandos, la estructura de rayos X de CaM con calcio y CPZ denominada 1A29.pdb (1A29, forma cercana de CaM) refinada a 2,7 Å^{58,59}. Los ligandos se obtuvieron a partir de la estructura co-cristalizada de PDB, y cuando los cristales no estaban disponibles, sus estructuras se construyeron utilizando el software HyperChem 8. Todas las estructuras de los ligandos se minimizaron usando Gaussian 09, revisión A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT, EUA) a un nivel teórico DFT B3LYP / 3-21G. Las cargas parciales y los parámetros del campo de fuerza de los inhibidores se generaron automáticamente utilizando el programa de antecámara en AMBER 14⁶⁰.

3.4 Acoplamiento y reconocimiento molecular (Docking)

Una vez calculada la constante de disociación K_d , se realizó el acoplamiento molecular o “Docking” el cual se puede usar para predecir la interacción entre una molécula pequeña y una proteína a nivel atómico, lo que permite caracterizar el comportamiento de las moléculas pequeñas en el sitio de unión a la proteína en estudio.

El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: la predicción de la conformación del ligando, así como su posición y orientación dentro de estos sitios (generalmente denominados “pose”) y la evaluación de la afinidad de unión.

El grado en que se formará el complejo proteína-ligando se determina por la magnitud del incremento de la energía de Gibbs negativo el cual se calcula con la siguiente ecuación.

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

El incremento G es una representación de la estabilidad de cualquier complejo proteína-ligando.

En términos generales, la entalpía es un cambio en la energía que resulta de las formaciones de interacciones como las fuerzas de van der Waals, el enlace iónico

y cualquier otra interacción polar o no polar entre la proteína y el ligando, el ligando y la reorganización del solvente y el solvente en la interfaz de unión.

La entropía define la distribución uniforme de la energía térmica en el sistema. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, el calor siempre fluye espontáneamente desde el área de temperatura más alta al área de temperatura más baja. Esto reduce el grado de orden del sistema inicial y, por lo tanto, la entropía se puede ver como una medida de arbitrariedad de un sistema.

El procedimiento general del docking consiste en la generación de mapas electrostáticos para cada tipo de átomos que participan en el docking, en una caja de $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$, con un espacio de enrejamiento de 0.375 \AA , localizada en el centro de la macromolécula; la cual se construye con AutoGrid 4 (parte del paquete de programas de AutoDock 4). El proceso del docking se realiza con el algoritmo genético Lamarckian (LGA), utilizando los parámetros recomendados inicialmente a excepción del número de corridas el cual lo aumentaremos a 100, un tamaño de población de 150, un número máximo de evaluaciones de 2,500,000 y un número máximo de generaciones de 27,000. Los programas utilizados para el docking y su análisis son los siguientes: AutoDock 4.00 revisión 1.69 (1991-2007), AutoDockTools versión 1.5.0 revisión 7 (1999-2007 Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) sobre el sistema operativo UNIX en el nuevo equipo de supercomputo de la UNAM (Miztli supercomputer).

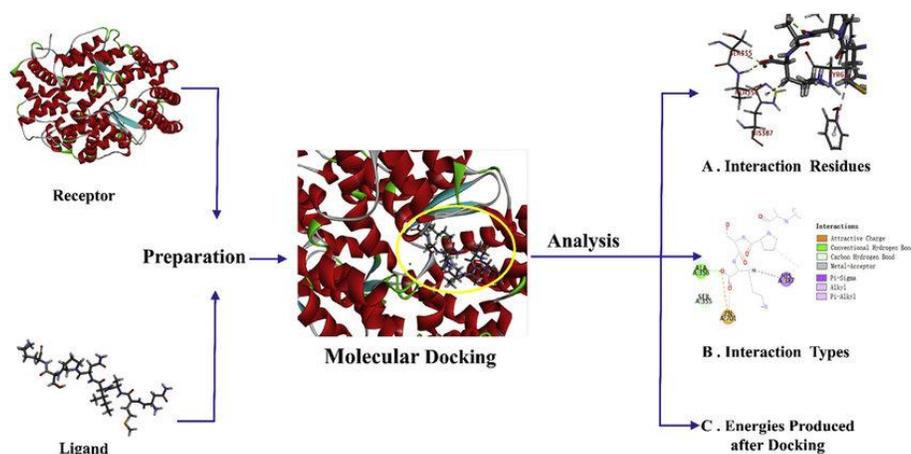


Figura 22. Esquema de Acoplamiento Molecular. Después del análisis se determinan los tipos de interacción con los residuos, así como la energía producida por las moléculas.

El acoplamiento se realizó utilizando la estructura de rayos X PDB del CaM con el ligando CPZ (1A29.pdb). La estructura cristalina fue reconstruida y refinada, realizamos un refinamiento final de todos los átomos de CaM con la aplicación de idealización de la versión Rosetta3.1.³⁷ Todos los compuestos se construyeron utilizando el programa HyperChem 8.0 y se optimizaron geoméricamente utilizando el programa Gaussian 09, revisión A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT) en el nivel de teoría DFT B3LYP / 3-21G. La proteína y los ligandos se prepararon adicionalmente utilizando las herramientas implementadas por AutoDockTools 1.5.4 (<http://mglttools.scripps.edu/>). A la proteína se agregaron átomos de hidrógeno polares, cargas parciales de átomos unidos de Kollman y a los ligandos que calculaban las cargas formales de Gasteiger-Marsilli, grupos rotativos que se asignaban automáticamente al igual que las torsiones activas. El acoplamiento a ciegas se llevó a cabo utilizando el software AutoDock4 versión 4.2 (<http://autodock.scripps.edu/>)³⁸⁻⁴⁰, utilizando los parámetros por defecto del algoritmo genético de Lamarckian con búsqueda local, número de individuos en la población (150), máximo número de evaluaciones de energía (2,5 millones), número máximo de generaciones (27 000), tasa de mutación genética (0,02), tasa de cruzamiento (0,8) y 500 corridas de acoplamiento. Se generaron mapas de campo electrostático para cada tipo de átomo en los ligandos usando el programa auxiliar AutoGrid4, parte del software AutoDock4. El tamaño inicial de la caja del campo era 60 Å × 60 Å × 60 Å en las dimensiones x, y, z. Con el fin de refinar los análisis de acoplamiento, se realizaron en una caja electrostática (campo) más pequeña, con dimensiones de 30 Å × 30 Å × 30 Å, colocada en el ligando. El análisis del acoplamiento se realizó con AutoDockTools utilizando análisis de clústeres y el programa PyMOL⁶⁵.

3.5 Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular exploran la estabilidad y flexibilidad de las conformaciones del sistema proteína-ligando. Permiten reducir el número de falsos positivos lo cual permite analizar que aminoácidos contribuyen más a la estabilidad del complejo proteína-ligando.

Para las simulaciones de dinámica molecular, se utilizará el programa AMBER. Este software de simulación 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 han parametrizado 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 es preparado utilizando el módulo LEaP a partir del programa AMBER, donde se adicionan todos los hidrógenos de los aminoácidos, se neutraliza el sistema con Na⁺, posteriormente el complejo se solvata 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.

Las simulaciones fueron hechas a una presión de 1 atm y 298.15 K. A continuación, la dinámica molecular (DM) consistió en una 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 20 ns de DM. Después de terminar la DM se analizaron los resultados con el protocolo de MM/PBSA en modos normales para obtener los parámetros energéticos. Estos programas han sido diseñados para simulaciones en sistemas de cómputo de alto desempeño, como el nuevo equipo de supercomputo (NES) de la UNAM Miztli.

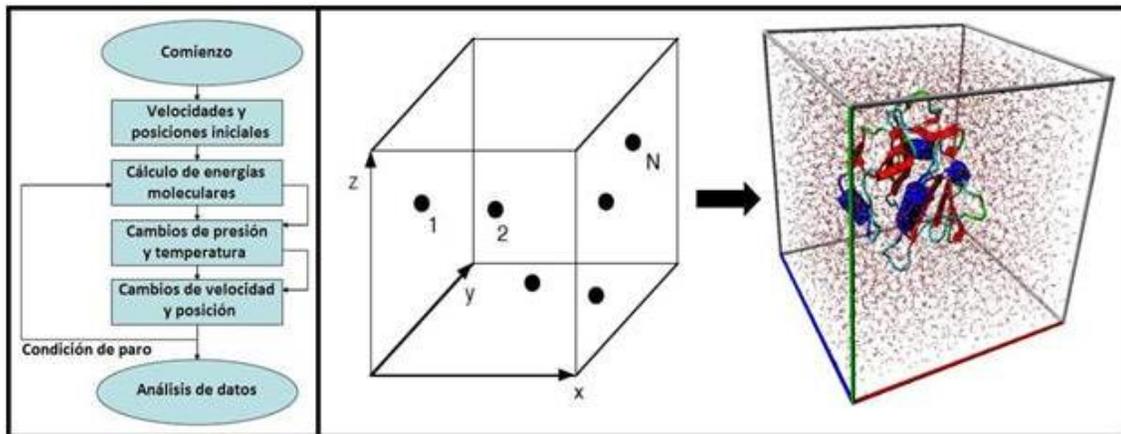


Figura 23. Simulación de Dinámica Molecular. Del lado izquierdo se observa el esquema general de una dinámica molecular, donde la condición de paro generalmente está en función del tiempo de simulación. La proteína a estudiar se coloca dentro de un espacio delimitado llamado “celda de simulación” (lado derecho). El número de átomos (N) está determinado por aquellos que constituyen a la proteína y el número de moléculas de agua presentes. La presencia del agua permite una mejor representatividad al tratarse de un sistema biológico como se observa al lado derecho de la flecha.

Las coordenadas de los ligandos resultantes del estudio de acoplamiento se procesaron con antecámara (un conjunto de programas auxiliares para estudios de mecánica molecular) con el fin de generar topologías adecuadas para el módulo LEaP de AMBER 14⁶⁶⁻⁶⁸. Cada estructura y complejo se sometió al siguiente protocolo: se agregaron hidrógeno y otros átomos faltantes utilizando el módulo LEaP con el conjunto de parámetros parm99, se agregaron contraiones de Na⁺ para neutralizar el sistema, los complejos luego se solvataron en una caja octaédrica del modelo TIP3P donde las moléculas de agua se localizan en los límites de la caja a 12 Å de la superficie de la proteína. Las simulaciones de DM (Dinámica Molecular) se realizaron a 1 atm y 298 K, mantenidas con el baróstato de Berendsen y termostato, utilizando condiciones de contorno periódicas y sumas de Ewald de malla de partículas (espaciado de cuadrícula de 1 Å) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de 10 Å para calcular directamente interacciones. El algoritmo SHAKE se utilizó para satisfacer las restricciones de enlace, permitiendo el empleo de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton como se recomienda en el paquete Amber⁶⁷⁻⁶⁹.

Se utilizaron parámetros de campo de fuerza Amber f99SB^{68,70,71} para todos los residuos y se utilizaron parámetros de campo de fuerza de Gaff^{60,72} para los ligandos. Todos los cálculos se realizaron utilizando el motor DM acelerado de unidades de procesamiento de gráficos (GPU) en AMBER (pmemd.cuda), paquete de programa que se ejecuta completamente en GPU habilitadas para CUDA⁷³. El protocolo consistió en realizar una optimización de la estructura inicial, seguida de un paso de calentamiento de 50 ps a 298 K, 50 ps para el equilibrio a volumen constante y 500 ps para el equilibrio a presión constante. Se realizaron varias simulaciones independientes DM de 100 ns. Los fotogramas se guardaron a intervalos de 100 ps para análisis posteriores.

3.6 Unión de energías libres calculadas por mecánica molecular / área de superficie de Poisson Boltzmann (MM / PBSA).

Este método implica una combinación de energía de la mecánica molecular con modelos de solvatación implícitos para calcular las energías libres de enlace. En MM / PBSA^{74,75}, la energía libre de unión ($\Delta G_{unión}$) entre un ligando (L) y un blanco molecular (diana) (T) para formar un complejo se calcula como:

$$\Delta G_{unión} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{Sol} - T\Delta S$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{Interna} + \Delta E_{Electrostática} + \Delta E_{Vdw}$$

$$\Delta G_{Sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA}$$

donde ΔE_{MM} , ΔG_{Sol} y $-T\Delta S$ son los cambios de la energía de la mecánica molecular en fase gaseosa, la energía libre de solvatación y la entropía conformacional tras la unión, respectivamente. ΔE_{MM} comprende $\Delta E_{Interna}$ (energías de enlace, ángulo y diedro), $\Delta E_{Electrostática}$ (energías electrostáticas) y ΔE_{Vdw} (energías de van der Waals). ΔG_{Sol} es la suma de la energía de solvatación electrostática (contribución polar) - ΔG_{PB} - y el componente de solvatación no electrostática (contribución no polar) - ΔG_{SA} -.

La contribución polar se calcula utilizando el modelo de área de superficie de Poisson-Boltzmann, mientras que la energía no polar se estima a partir del área de superficie accesible al solvente (SASA). El cambio de entropía conformacional ($-T\Delta S$) se calculó mediante análisis en modo normal a partir de un conjunto de capturas conformacionales tomadas de las simulaciones DM^{74,76,77}.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que los métodos computacionales aportan una serie de ventajas tales como: equipos computacionales básicos, tiempos de análisis cortos, estos solo nos permiten hacer predicciones y no son 100 % confiables ya que los parámetros teóricos obtenidos sólo son aproximaciones, por lo que esta información computacional debe ser confrontada y enriquecida por técnicas experimentales tales como: CTI o biosensores. Un objetivo de la química computacional es predecir la vinculación entre moléculas, particularmente para la industria farmacéutica resulta de suma importancia al tener una aplicación directa en el descubrimiento y desarrollo de fármacos.⁷⁸

Existe una gran cantidad de información de estructuras químicas relacionadas con propiedades farmacológicas en muchas bases de datos disponibles actualmente. Sin embargo, en este trabajo decidimos utilizar solo la base de datos de los compuestos del catálogo de Merck (antes Sigma-Aldrich) llamado moléculas pequeñas bioactivas, las cuales comprenden las moléculas descubiertas por las principales compañías farmacéuticas. Los criterios de elección que utilizamos fueron las propiedades farmacológicas descritas, la estructura química (moléculas con una parte aromática y una parte polar), el peso molecular entre 300 y 400 g/mol, disponibilidad comercial. La serie BIM cumplía con los criterios antes mencionados, y representa un nuevo conjunto de compuestos anti-CaM.

La Tabla 2 presenta las propiedades quimionfórmicas de la serie BIM. Esta información basada en datos teóricos computacionales predice los parámetros logP,

logS, peso molecular, potencial del fármaco, aceptor de puentes H, donador de puentes H, centros quirales, enlaces rotales y puntaje farmacológico los cuales son importantes para evaluar la posibilidad de que alguno de los compuestos pudiera ser considerado candidato a fármaco. Dentro de estos parámetros podemos destacar el puntaje farmacológico que evalúa todas las características deseadas de un compuesto para ser considerado fármaco, el rango es de 0 a 1, siendo mejor entre más se aproxime a 1. Para nuestra serie los compuestos se encuentran en el intervalo de 0.64 y 0.92. Otro parámetro que incide directamente en la afinidad (potencia) de un compuesto por posibles blancos moleculares son los puentes de hidrógeno, la serie presenta mayor probabilidad de aceptar enlaces de hidrógeno que de donar, pero el número de estos es entre 1 y 7. El coeficiente de reparto calculado (LogP), nos indica el grado de hidrofobicidad de una molécula; lo cual es importante ya que la mayoría de los fármacos tienen que atravesar membranas celulares para llegar a los blancos moleculares dentro de las células. La serie BIM tiene LogP entre 1.55 y 3.02, rangos aceptables. La solubilidad (LogS) en agua y en lípidos dependerá del grado de absorción de una molécula a través de las membranas; en este caso se observó que la serie BIM tiene baja solubilidad sin embargo de acuerdo al servidor OSIRIS más del 80% de los medicamentos en el mercado tienen un valor logS (estimado) mayor que -4. El peso molecular de la serie BIM es similar entre 325 y 450 y de acuerdo al servidor OSIRIS más del 80% de los medicamentos comercializados tienen un peso molecular por debajo de 450. El potencial del fármaco indica que si una molécula contiene predominantemente fragmentos que se encuentran presentes en medicamentos comerciales en este caso la serie BIM tiene valores positivos lo que indica un buen potencial. El parámetro de aceptor y donador de H esta relacionado con la afinidad de los compuestos, entre mayor sea en número de protones a intercambiar el compuesto tendrá una mayor afinidad; la serie BIM tiene valores entre 1 y 6 por lo tanto son moléculas afines. El parámetro de centros quirales sirve para identificar las posibles mezclas racémicas, en este caso la serie BIM tiene 1 centro quiral en 3 compuestos (BIM-II, BIM-X y BIM-XI) y 0 en 2 compuestos (BIM-IV y BIM-VII) lo cual indica que son compuestos confiables. Los enlaces rotales están relacionados con la

flexibilidad del propio fármaco los valores obtenidos para la serie BIM indican una buena dinámica. El puntaje farmacológico es un parámetro que arroja el servidor OSIRIS para juzgar el potencial general del compuesto para calificar para un fármaco, en este caso la serie BIM tiene valores por encima de 0.45 que es nuestro control negativo. De forma general este análisis quimioinformático nos predice que la serie BIM tiene una buena posibilidad de que alguno de los compuestos sea candidato a fármaco potencial.

Tabla 2. Propiedades quimioinformáticas de la serie BIM

Compuesto	BIM-II	BIM-IV	BIM-VII	BIM-X	BIM-XI	CPZ
LogP	2.43	1.58	1.55	2.4	3.02	4.61
Solubilidad (LogS)	-3.38	-3.55	-2.55	-3.23	-2.78	-4.8
Peso molecular	438.53	327.34	453.54	425.5	452.56	318.87
Potencial fármaco	7.73	4.21	6.81	6.65	8.05	8.38
Aceptor de puente de H	6	5	7	6	6	2
Donador de puente de H	2	3	3	2	1	0
Centros quirales	1	0	0	1	1	0
Enlaces rotables	5	2	6	3	4	4
Puntaje farmacológico	0.81	0.92	0.64	0.83	0.77	0.45

Los datos fueron calculados usando el servidor OSIRIS

(http://www.cheminfo.org/Chemistry/Cheminformatics/Property_explorer/index.html)

Seguindo con los análisis quimioinformáticos se evaluó la posible bioactividad de la serie BIM en el servidor Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). Este servidor predice los posibles blancos moleculares en función de la estructura-actividad reportada en sus bases de datos. Para la serie BIM el servidor predice los siguientes blancos moleculares: inhibidor de cinasas (score = 0.82), inhibidor de enzimas (score = 0.4), ligando de receptores acoplados a proteína G (score = 0.39), modulador de canales iónicos (score = 0.22) e inhibidor de proteasas (score = 0.2). Estos resultados son coincidentes con la información bibliográfica de los compuestos BIM, ya que se han reportado principalmente como inhibidores de cinasas. Por lo tanto, este trabajo es novedoso al reportar por primera vez la unión de los compuestos BIM a la proteína CaM.

Determinación de las K_{ds} de los compuestos Bisindolilmaleimidias utilizando el biosensor fluorescente *hCaM M124C-mBBR*

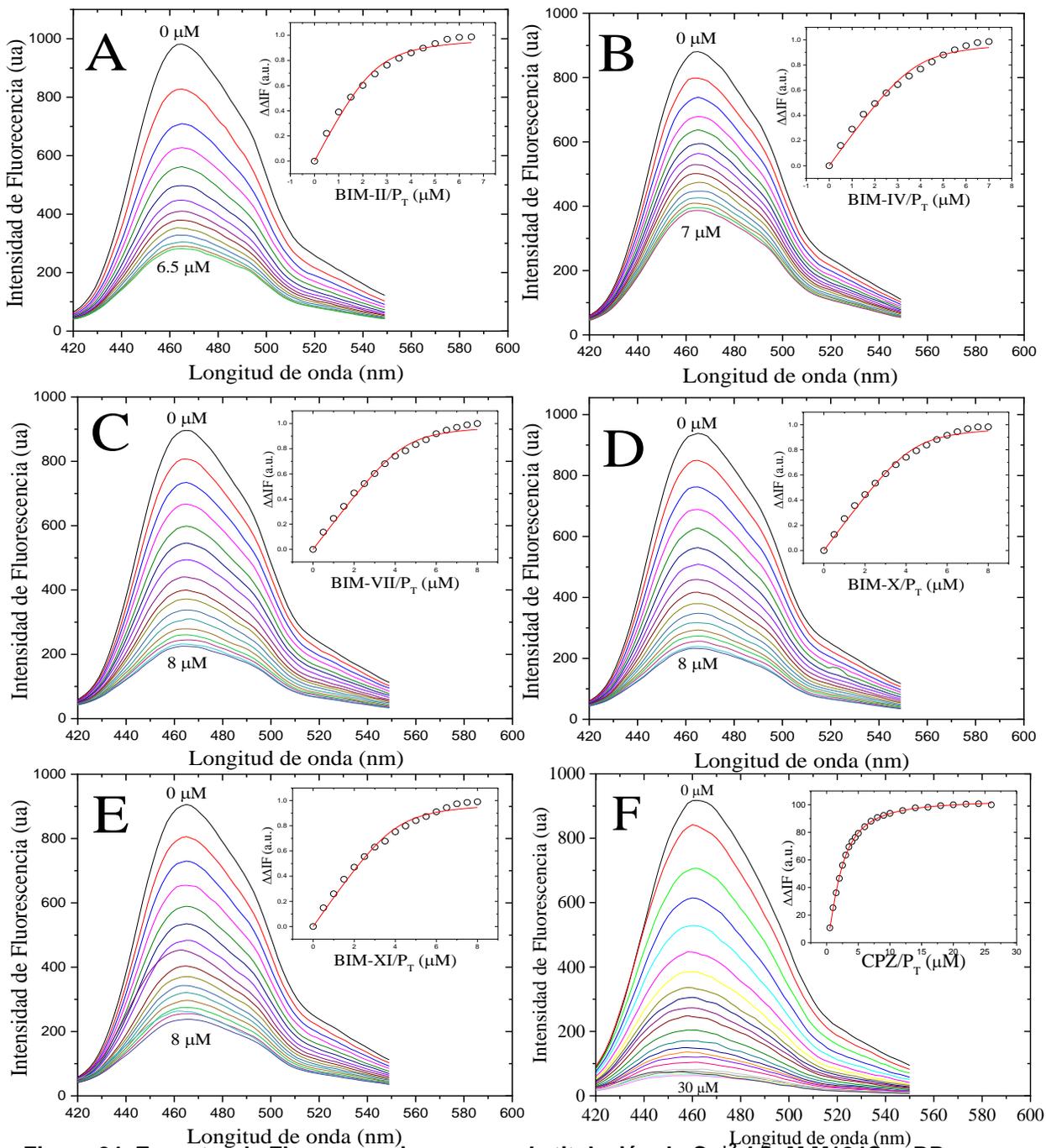


Figura 24. Espectro de Fluorescencia y curvas de titulación de Ca^{2+} -*hCaM M124C-mBBR*

La Figura 24 presenta los espectros y las titulaciones en fluorescencia de los ligandos BIM con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*. Todos los compuestos presentan un apagamiento de la intensidad de fluorescencia al interactuar con la CaM. Las K_{ds} estimadas se encuentran en el orden nM, con el siguiente orden de afinidad **BIM-VII > BIM-XI > BIM-IV > BIM-X > BIM-II > CPZ** (Tabla 3), lo que hace a esta serie de compuestos muy atractivos para ser considerados como nuevos fármacos anti-CaM. Por otro lado, la estequiometría de unión de los compuestos se encuentra desde la relación 1:2 hasta 1:4; lo cual es atribuido principalmente al tamaño de cada compuesto en particular.

Tabla 3. Propiedades de unión experimentales de complejos Ca^{2+} -CaM-Ligandos

	Estudios Experimentales		Acoplamiento molecular
	K_d^1 (nM)	Estequiometría	K_i^2 (nM)
Ca^{2+} -CaM -BIM-II	257.8 ± 5.5	2.5 ± 0.2	109.79
Ca^{2+} -CaM -BIM-IV	223.8 ± 3.7	3.7 ± 0.2	17.10
Ca^{2+} -CaM -BIM-VII	186.2 ± 4.1	4.4 ± 0.1	2.14
Ca^{2+} -CaM -BIM-X	205.2 ± 3.8	4.3 ± 0.1	20.36
Ca^{2+} -CaM -BIM-XI	239.0 ± 5.0	3.4 ± 0.1	9.66
Ca^{2+} -CaM -CPZ	492.2 ± 4.6	3.4 ± 0.1	715.65

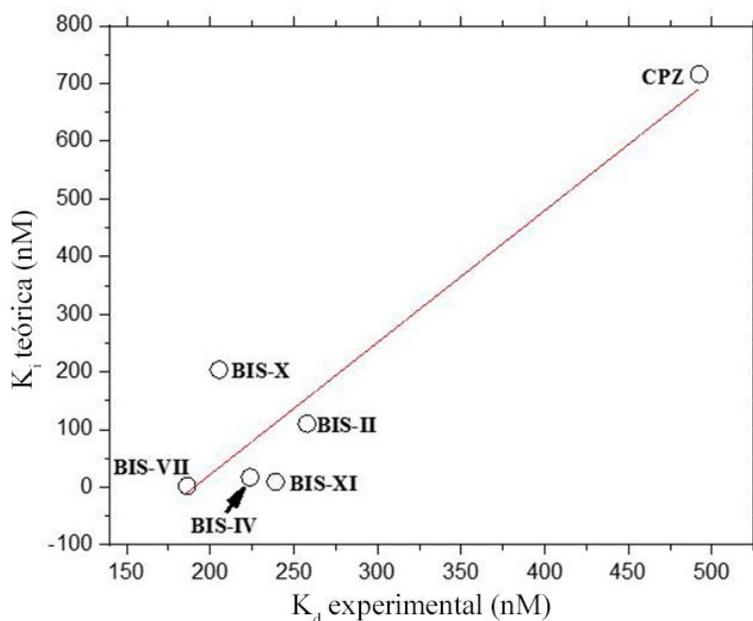


Figura 25. Relación entre la K_d experimental y la K_i teórica de los ligandos BIM.

La figura 25 presenta la relación entre los datos experimentales y los resultados del acoplamiento. La gráfica muestra una relación lineal entre los datos con una R^2 de 0.85. Esta correlación es buena, ya que con base a esta se puede hacer un análisis estructura-función de la serie BIM y abordar las interacciones a detalle de los complejos CaM-BIM. Tanto los datos experimentales como los de acoplamiento molecular nos indican que la afinidad de la serie BIM se encuentra en el rango nM, lo que hace a estos compuestos más afines que algunos de los actuales fármacos anti-CaM (CPZ o TFP).

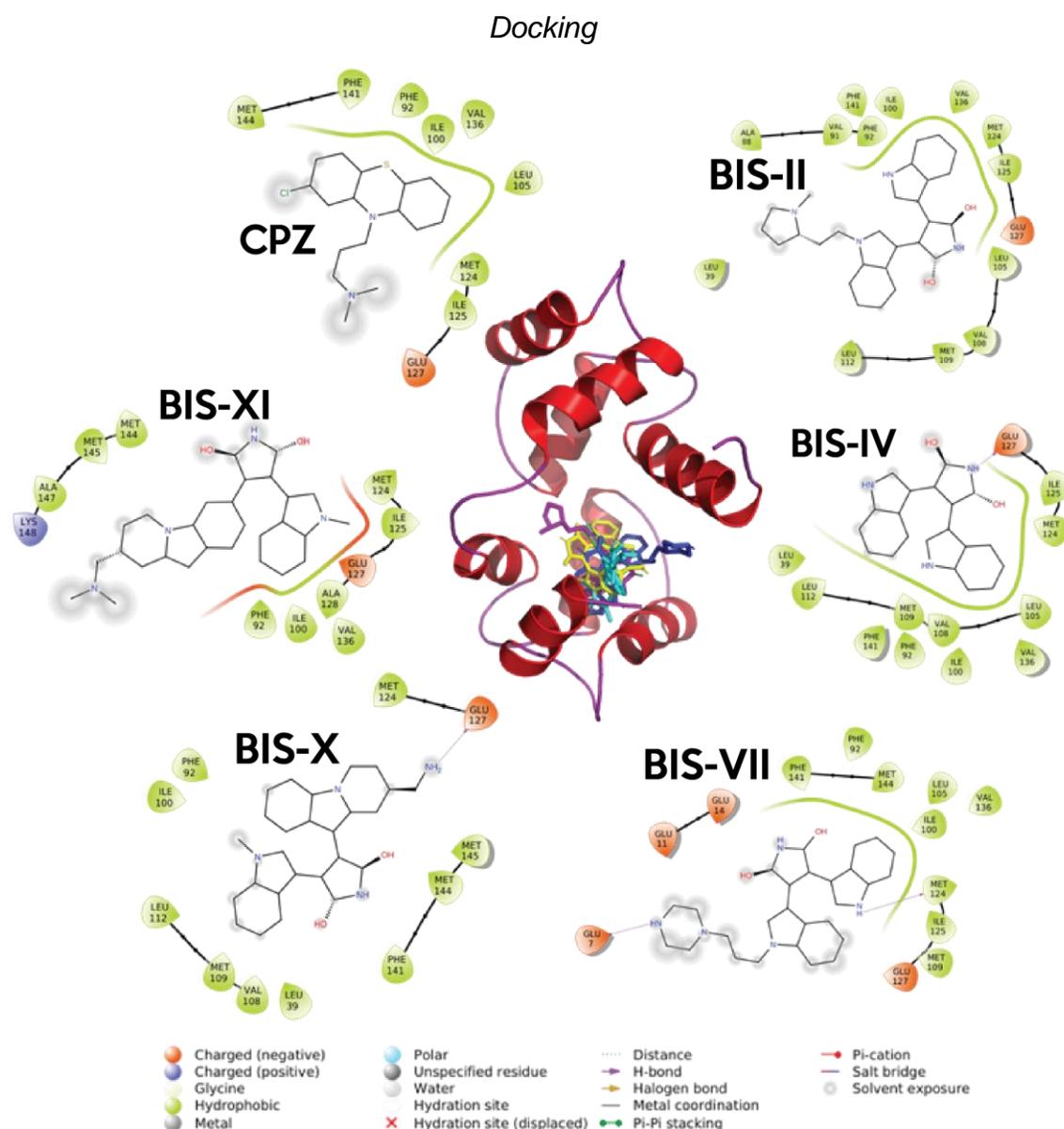


Figura 26. Interacciones CaM-BIM a partir de los datos de acoplamiento molecular.

En la figura 26 se presentan los modelos estructurales del acoplamiento molecular de la CaM con la serie BIM. Todos los ligandos se unen en la misma región conformada por residuos de carácter hidrofóbico en su mayoría (Tabla 4). La K_i teórica, calculada por AutoDock4 se presenta en la Tabla 3, donde se observa que el compuesto **BIM-VII** presenta la menor K_i (2.14 nM). Este compuesto tiene el mayor número de contactos con residuos de carga negativa (4 para este caso). Mientras que para el resto de los ligandos solo se presenta 1. Adicionalmente, este ligando forma 2 puentes de hidrógeno con los residuos Glu7 y Met124. Por otra parte, **BIM-VII** es el ligando que muestra menor K_d en los estudios de unión experimental (186.2 nM) lo que indica que tiene mayor afinidad y potencia que los demás compuestos a nivel in situ.

Tabla 4. Interacciones de los BIM con la CaM a partir de los acoplamientos moleculares

	Residuos de interacción
Ca²⁺-CaM -BIM-II	<i>Leu39, Ala88, Val91, Phe141, Phe92, Ile100, Leu105, Val108, Met109, Leu112, Met124, Ile125, Glu127, Val136</i>
Ca²⁺-CaM -BIM-IV	<i>Glu127, Ile125, Met124, Leu105, Val108, Met109, Leu112, Leu39, Phe141, Phe92, Ile100, Val136</i>
Ca²⁺-CaM -BIM-VII	<i>Glu7, Glu11, Glu14, Phe92, Phe141, Phe144, Leu105, Ile100, Val136, Met124, Ile125, Met109, Glu127</i>
Ca²⁺-CaM -BIM-X	<i>Met124, Glu127, Phe92, Ile100, Leu112, Met109, Val108, Leu39, Phe141, Met144, Met145</i>
Ca²⁺-CaM -BIM-XI	<i>Val136, Phe92, Ile100, Ala128, Glu127, Ile125, Met124, Lys148, Ala147, Met145, Met144</i>
Ca²⁺-CaM -CPZ	<i>Glu127, Ile125, Met124, Leu105, Val136, Ile100, Phe92, Phe141, Met144</i>

Simulación de Dinámica Molecular

Los estudios de dinámica molecular de los complejos CaM-BIM, fueron llevados a cabo con el objetivo de obtener información estructural y energética de esta serie. Las dinámicas fueron llevadas hasta 200 ns, lo cual es un tiempo razonable para evaluar los parámetros energéticos y estructurales.

La Figura 27 presenta los modelos estructurales generados a partir de las trayectorias de las dinámicas moleculares para la CaM y los complejos CaM-BIM-VII y CaM-CPZ, donde se observa que la proteína en estado cerrado sin ligandos después de los 50 ns se tiende a abrir, mientras los complejos permanecen cerrados hasta los 200 ns.

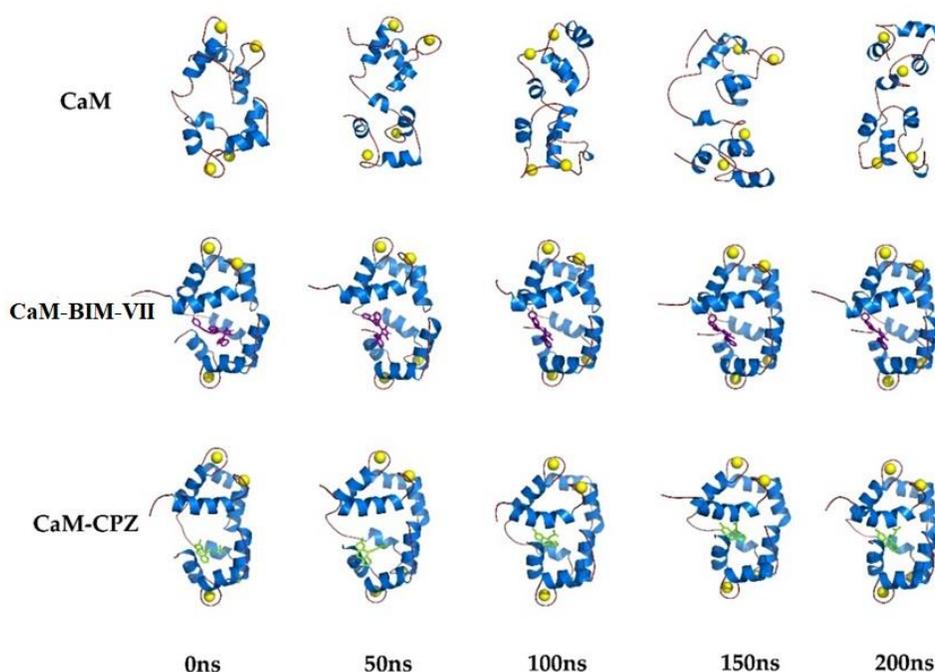


Figura 27. Modelos estructurales de la simulación de dinámica molecular de la CaM y los complejos CaM-BIM-VII y CaM-CPZ (200 ns).

La Figura 28 presenta la RMSD en función del tiempo, donde se puede observar la diferencia que existe entre la CaM sin ligando y la CaM con diferentes ligandos. Esta diferencia de RMSD está relacionada principalmente con la estabilidad estructural donde todos los complejos CaM-BIM tienen una menor RMSD, mientras que la CaM libre de ligandos presenta una RMSD de alrededor de 6 Å.

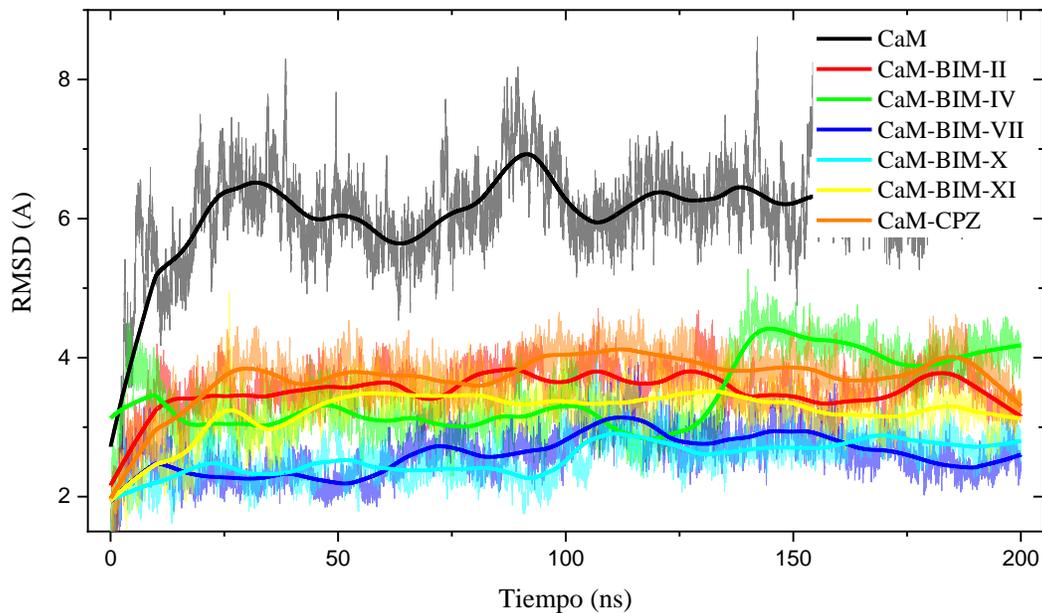


Figura 28. RMSD vs Tiempo de los complejos CaM-BIM

Otro parámetro que se evaluó en las dinámicas moleculares fue la RMSF por aminoácidos de la CaM, donde hay zonas de la proteína con mayor y menor flexibilidad. La Figura 29 presenta de forma general que el lóbulo correspondiente al C-terminal de la CaM es considerablemente más flexible; así como los cuatro sitios de unión a calcio. En la zona del C-terminal se encuentran los aminoácidos que interactúan con los BIM según los estudios de acoplamiento molecular, lo cual tiene sentido por la flexibilidad de esta zona. Comparando la RMSF de la CaM en ausencia o presencia de los ligandos, la serie BIM y la CPZ le confieren una menor flexibilidad a la CaM en todas sus regiones, lo que hace que los complejos sean más estables.

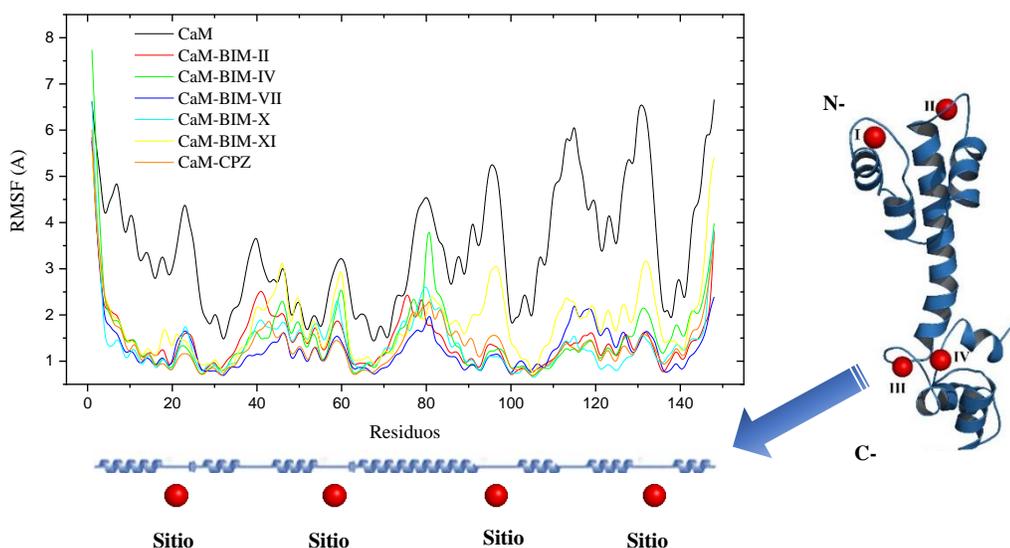


Figura 29. RMSF vs Residuos de los complejos CaM-BIM

Los parámetros energéticos teóricos calculados a partir de las trayectorias de las dinámicas moleculares se muestran en la Tabla 5. Todos los complejos presentan un DG negativo y la contribución mayoritaria está dada por el componente entálpico (DH). El componente entrópico (DS) es menor en todos los complejos y esto se asocia con la estabilidad de los complejos CaM-Ligandos. El compuesto BIM-VII es el que presenta el menor DG (-49.48 Kcal/mol), lo cual está en concordancia con los datos experimentales y de acoplamiento molecular.

Tabla 5. Parámetros teóricos de los complejos Ca²⁺-CaM-BIM

	DM		
	DG (Kcal/mol)	DH (Kcal/mol)	DS (Kcal/mol)
Ca²⁺-CaM -BIM-II	-42.73±9.64	-67.61±3.88	-24.87±8.82
Ca²⁺-CaM -BIM-IV	-30.25±3.91	-47.61±3.29	-17.36±2.10
Ca²⁺-CaM -BIM-VII	-49.48±6.92	-72.65±5.11	-23.17±4.67
Ca²⁺-CaM -BIM-X	-23.57±5.19	-49.64±3.31	-26.06±4.00
Ca²⁺-CaM -BIM-XI	-45.47±9.67	-71.21±5.23	-25.74±8.13
Ca²⁺-CaM -CPZ	-16.77±5.77	-35.01±4.53	-18.24±3.58

5.0 CONCLUSIONES

1. Los compuestos descritos como BIM en este estudio representan una serie de posibles inhibidores de la proteína CaM, los cuales no han sido descritos en la literatura para este fin.
2. El compuesto **BIM-VII** es el ligando que mostró menor K_d en los estudios de unión experimental (186.2 nM) lo que indica que tiene mayor afinidad y potencia que los demás compuestos a nivel in silico.
3. Los ensayos de unión utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBR* indican que los compuestos BIM se unen a la proteína CaM con una afinidad entre 193-248 nM, lo cual refuerza su utilidad como posibles fármacos anti-CaM.
4. Los análisis quimioinformáticos nos dan la pauta para ensayar la unión a la proteína CaM de manera experimental y hacer un estudio in silico utilizando las técnicas de acoplamiento molecular (docking) y dinámicas moleculares.
5. Los resultados teóricos tanto del acoplamiento molecular como de la dinámica molecular coincidieron y complementaron los resultados experimentales.
6. Los parámetros energéticos teóricos de la serie BIM calculados a partir de las trayectorias de las dinámicas moleculares presentaron un ΔG negativo y la contribución mayoritaria fue dada por el componente entálpico (ΔH) lo cual presentó concordancia con los datos experimentales y de acoplamiento molecular.

6.0 PERSPECTIVAS

Evaluar los compuestos de la serie BIM con diferentes líneas celulares relacionadas con cáncer.

7.0 REFERENCIAS

1. Su, M., Ling, Y., Yu, J., Wu, J. & Xiao, J. (2013) Small proteins: untapped area of potential biological importance, *Front Genet.* 4, 286.
2. Abimbola Farinde, Interacciones fármaco–receptor, PhD, PharmD, Columbia Southern University, Orange Beach, AL
3. Docking, B. d. (2008). "¿Cómo funciona el docking?". de <https://dockingproteinas.blogia.com/2008/062501--c-mo-funciona-el-docking-.php>.
4. **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, doi:10.1016/j.ab.2009.01.002.
5. Mata, R.; Figueroa, M.; Gonzalez-Andrade, M.; Rivera-Chavez, J.A.; Madariaga-Mazon, A.; Del Valle, P. Calmodulin inhibitors from natural sources: an update. *J Nat Prod* **2015**, 78, 576-586, doi:10.1021/np500954x.
6. O'Day, D.H. CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. *Cell Signal* **2003**, 15, 347-354, doi:S089865680200116X [pii].
7. Jurado, L.A.; Chockalingam, P.S.; Jarrett, H.W. Apocalmodulin. *Physiological Reviews* **1999**, 79, 661-682.
8. Berchtold, M.W.; Villalobo, A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1843, 398-435, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.021.
9. Fromer, M. and J.M. Shifman, Tradeoff Between Stability and Multispecificity in the Design of Promiscuous Proteins. *Plos Computational Biology*, 2009. 5(12).
10. Chin, D. and A.R. Means, Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, 2000. 10(8): p. 322-8
11. Faul, M.M.; Winneroski, L.L.; Krumrich, C.A. A New, Efficient Method for the Synthesis of Bisindolylmaleimides. *J Org Chem* **1998**, 63, 6053-6058.
12. Toullec, D.; Pianetti, P.; Coste, H.; Bellevergue, P.; Grand-Perret, T.; Ajakane, M.; Baudet, V.; Boissin, P.; Boursier, E.; Loriolle, F., et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **1991**, 266, 15771-15781.

13. Hers, I.; Tavaré, J.M.; Denton, R.M. The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity. *FEBS Lett* **1999**, *460*, 433-436.
14. Coultrap, S.J.; Sun, H.; Tenner, T.E., Jr.; Machu, T.K. Competitive antagonism of the mouse 5-hydroxytryptamine₃ receptor by bisindolylmaleimide I, a "selective" protein kinase C inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *290*, 76-82.
15. Davis, P.D.; Hill, C.H.; Lawton, G.; Nixon, J.S.; Wilkinson, S.E.; Hurst, S.A.; Keech, E.; Turner, S.E. Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmaleimides. *J Med Chem* **1992**, *35*, 177-184.
16. Robey, R.W.; Shukla, S.; Steadman, K.; Obrzut, T.; Finley, E.M.; Ambudkar, S.V.; Bates, S.E. Inhibition of ABCG2-mediated transport by protein kinase inhibitors with a bisindolylmaleimide or indolocarbazole structure. *Mol Cancer Ther* **2007**, *6*, 1877-1885, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0811.
17. Mayati, A.; Bruyere, A.; Moreau, A.; Jouan, E.; Denizot, C.; Parmentier, Y.; Fardel, O. Protein Kinase C-Independent Inhibition of Organic Cation Transporter 1 Activity by the Bisindolylmaleimide Ro 31-8220. *PLoS One* **2015**, *10*, e0144667, doi:10.1371/journal.pone.0144667.
18. Deane, F.M.; Lin, A.J.S.; Hains, P.G.; Pilgrim, S.L.; Robinson, P.J.; McCluskey, A. FD5180, a Novel Protein Kinase Affinity Probe, and the Effect of Bead Loading on Protein Kinase Identification. *ACS Omega* **2017**, *2*, 3828-3838, doi:10.1021/acsomega.7b00020.
19. Birchall, A.M.; Bishop, J.; Bradshaw, D.; Cline, A.; Coffey, J.; Elliott, L.H.; Gibson, V.M.; Greenham, A.; Hallam, T.J.; Harris, W., et al. Ro 32-0432, a selective and orally active inhibitor of protein kinase C prevents T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther* **1994**, *268*, 922-929.
20. Bit, R.A.; Davis, P.D.; Elliott, L.H.; Harris, W.; Hill, C.H.; Keech, E.; Kumar, H.; Lawton, G.; Maw, A.; Nixon, J.S., et al. Inhibitors of protein kinase C. 3. Potent and highly selective bisindolylmaleimides by conformational restriction. *J Med Chem* **1993**, *36*, 21-29.
21. Weiss, B., W.C. Prozialeck, and T.L. Wallace, Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications. *Biochem Pharmacol*, 1982. 31(13): p. 2217-26.
22. T. Tamaoki., H. Nomoto.I. Takahashi. Y. Kato. M. Morimoto. F. Tomita. (1986). Staurosporine a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:397-402.

23. Weiss, B.; Prozialeck, W.C.; Wallace, T.L. Interaction of drugs with calmodulin. Biochemical, pharmacological and clinical implications. *Biochemical pharmacology* **1982**, *31*, 2217-2226.
24. Martinez-Luis, S.; Perez-Vasquez, A.; Mata, R. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1882-1903, doi:S0031-9422(07)00126-4 [pii]
10.1016/j.phytochem.2007.02.025.
25. Leung, P.C.; Taylor, W.A.; Wang, J.H.; Tipton, C.L. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 2742-2747.
26. Molnar, A.; Liliom, K.; Orosz, F.; Vertessy, B.G.; Ovadi, J. Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro systems. *Eur J Pharmacol* **1995**, *291*, 73-82, doi:0014-2999(95)90081-0 [pii].
27. Kong Au, T.; Chow Leung, P. Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant physiology* **1998**, *118*, 965-973.
28. Horvath, I.; Harmat, V.; Perczel, A.; Palfi, V.; Nyitray, L.; Nagy, A.; Hlavanda, E.; Naray-Szabo, G.; Ovadi, J. The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 8266-8274, doi:M410353200 [pii]
10.1074/jbc.M410353200.
29. Pelton, J.T.; McLean, L.R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167-176, doi:10.1006/abio.1999.4320.
30. Brokx, R.D.; Lopez, M.M.; Vogel, H.J.; Makhatadze, G.I. Energetics of target peptide binding by calmodulin reveals different modes of binding. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 14083-14091, doi:10.1074/jbc.M011026200
M011026200 [pii].
31. Ma, L.; Wang, Z.; Liu, S.; Song, F.; Liu, Z. Screening calmodulin-binding ligands using intensity-fading matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **2013**, *27*, 1527-1534, doi:10.1002/rcm.6594.
32. Heyduk, T. Measuring protein conformational changes by FRET/LRET. *Current opinion in biotechnology* **2002**, *13*, 292-296.
33. Gonzalez-Andrade, M.; Rivera-Chavez, J.; Sosa-Peinado, A.; Figueroa, M.; Rodriguez-Sotres, R.; Mata, R. Development of the fluorescent biosensor hCalmodulin (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, doi:10.1021/jm200167g.

34. 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. *Journal of molecular recognition : JMR* **2013**, 26, 165-174, doi:10.1002/jmr.2261.
35. Diaz Ramírez Julen, Propiedades catalíticas de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en soportes magnéticos. Actividad hidrolítica en medios acuosos, 2014.
36. Yábar Varas, Carlos. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN / Elaborado por Carlos Yábar Varas. — Lima : Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003
37. Diez Ballesteros Jose Carlos, Fundamentos de bioquímica y biología molecular aplicada, 2011.
38. Morales Sanchez D; Gallo Ramirez L. E. Plataformas de proteomica, Métodos fisico-químicos en biotecnología, 2006.
39. Facultad de Química, UNAM. Manual de técnicas cromatográficas, introducción a los métodos de separación, 2007.
40. Bravo Jeronimo. Cristalografía de rayos x de macromoléculas, SEBBM Divulgación, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, 2012.
41. García Fabila Ma. Magdalena, “Apuntes para Espectrometría de Radiación Ultravioleta Visible (UV/VIS)”, p. 15-17, 2016.
42. González Mota Ma. Rosario, “Fotodegradación de productos plásticos elaborados con polietileno lineal de baja densidad”, 2008.
43. Mata Martinez Esperanza, Métodos Físico-Químicos en Biotecnología, Instituto de Biotecnología-UNAM, 2013.
44. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Laboratorio de investigaciones en nanociencias y nanotecnología, Manual de Operación del espectrómetro MICRO-RAMAN RENISHAW p. 3-5.
45. Laurella Sergio Luis, Resonancia magnética nuclear, Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares, p.8.
46. Costas Basín Miguel, “Calor y proteínas”, 1 de enero de 2015 | Vol. 16 | Núm. 1 | ISSN 1607 - 6079

47. Plascencia Villa German, Curso de Métodos: Espectrometría de masas, Instituto de Biotecnología 2003, p.2-6.
48. Dávila Fajardo Cristina Lucía, Estudios mediante espectroscopía de fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia Departamento de Microbiología II, 2010, p. 24-25.
49. 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. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 64-70.
50. 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.
51. González-Andrade, M.; Benito-Peña, E.; Mata, R.; Moreno-Bondi, M.C. Biosensor for on-line fluorescent detection of trifluoroperazine based on genetically modified calmodulin. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, *402*, 3211-3218.
52. González-Andrade, M.; Mata, R.; Madariaga-Mazón, A.; Rodríguez-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. *Journal of Molecular Recognition* **2013**, *26*, 165-174.
53. Madariaga-Mazon, A.; Gonzalez-Andradeb, M.; Toriello, C.; Navarro-Barranco, H.; Mata, R. Potent anti-calmodulin activity of cyclotetrapeptides isolated from *Isaria fumosorosea* using a newly designed biosensor. *Nat Prod Commun* **2015**, *10*, 113-116.
54. Universidad de Granada, Fundamentos de espectroscopía de fluorescencia molecular, Departamento de Química Analítica, p.2-6.
55. José L. Medina-Franco, Eli Fernández-de Gortaria, Jesús Naveja, Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora, volumen 25, 2015, pp.180-185.
56. Saldívar-González Fernanda; Prieto-Martínez Fernando D, Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional, Educ. quím vol.28 no.1 México ene. 2017
57. Vertessy, B.G.; Harmat, V.; Bocskei, Z.; Naray-Szabo, G.; Orosz, F.; Ovadi, J. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-

- calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry* **1998**, 37, 15300-15310, doi:10.1021/bi980795a.
58. Chattopadhyaya, R.; Meador, W.E.; Means, A.R.; Quioco, F.A. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *Journal of molecular biology* **1992**, 228, 1177-1192.
 59. Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of molecular graphics & modelling* **2006**, 25, 247-260, doi:10.1016/j.jmglm.2005.12.005.
 60. Wedemeyer, W.J.; Baker, D. Efficient minimization of angle-dependent potentials for polypeptides in internal coordinates. *Proteins* **2003**, 53, 262-272, doi:10.1002/prot.10525.
 61. Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* **1998**, 19, 1639-1662.
 62. Huey, R.; Morris, G.M.; Olson, A.J.; Goodsell, D.S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comput Chem* **2007**, 28, 1145-1152, doi:10.1002/jcc.20634.
 63. Moitessier, N.; Henry, C.; Maigret, B.; Chapleur, Y. Combining pharmacophore search, automated docking, and molecular dynamics simulations as a novel strategy for flexible docking. Proof of concept: docking of arginine-glycine-aspartic acid-like compounds into the alphavbeta3 binding site. *J Med Chem* **2004**, 47, 4178-4187, doi:10.1021/jm0311386.
 64. DeLano, W.L. Use of PYMOL as a communications tool for molecular science. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2004**, 228, U313-U314.
 65. D.A. Case, J.T.B., R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, D.M. York and P.A. Kollman *AMBER 2015*, 2015.
 66. D.A. Case, T.A.D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Goetz, I. Kolossvai, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke,

- Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman. AMBER 12. University of California, San Francisco, 2012.
67. Case, D.A.; Cheatham, T.E., 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K.M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, *26*, 1668-1688, doi:10.1002/jcc.20290.
68. Walker, R.C.; Crowley, M.F.; Case, D.A. The implementation of a fast and accurate QM/MM potential method in Amber. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 1019-1031, doi:10.1002/jcc.20857.
69. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J.L.; Dror, R.O.; Shaw, D.E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* **2010**, *78*, 1950-1958, doi:10.1002/prot.22711.
70. Thomas, A.S.; Mao, S.; Elcock, A.H. Flexibility of the bacterial chaperone trigger factor in microsecond-timescale molecular dynamics simulations. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, 732-744, doi:10.1016/j.bpj.2013.06.028.
71. Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1157-1174, doi:10.1002/jcc.20035.
72. Salomon-Ferrer, R.; Gotz, A.W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R.C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 3878-3888, doi:10.1021/ct400314y.
73. Treesuwan, W.; Hannongbua, S. Bridge water mediates nevirapine binding to wild type and Y181C HIV-1 reverse transcriptase--evidence from molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations. *Journal of molecular graphics & modelling* **2009**, *27*, 921-929, doi:10.1016/j.jmglm.2009.02.007.
74. Zhou, Z.; Madura, J.D. Relative free energy of binding and binding mode calculations of HIV-1 RT inhibitors based on dock-MM-PB/GS. *Proteins* **2004**, *57*, 493-503, doi:10.1002/prot.20223.
75. Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W., et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research* **2000**, *33*, 889-897.
76. Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy

calculations based on molecular dynamics simulations. *Journal of chemical information and modeling* **2011**, *51*, 69-82, doi:10.1021/ci100275a.

77. Maxwell D. Cummings, R.L.D., Alan C. Gibbs, Venkatraman Mohan, and Edward P. Jaeger, Comparison of Automated Docking Programs as Virtual Screening Tools. *J. Med. Chem.*, 2005. 48: p. 962-976.
78. Y.T. Hsu, K.G. Wolter, R. J. Youle. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 3668-3672.
79. Maxwell D. Cummings, R.L.D., Alan C. Gibbs, Venkatraman Mohan, and Edward P. Jaeger, Comparison of Automated Docking Programs as Virtual Screening Tools. *J. Med. Chem.*, 2005. 48: p. 962-976.