



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Estudio *in silico* e *in vitro* del compuesto ácido 5-  
{[(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-  
hidroxibenzoico como posible inhibidor de la  
fosfolipasa secretora humana.**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Licenciado En Bioquímica Diagnóstica**

**P R E S E N T A**

Leticia Guadalupe Frago Morales

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. Jazmín Flores Monroy

**CO-ASESOR**

Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio in silico e in vitro del compuesto Ácido 5-[[[(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoi]amino]-2-hidroxibenzoico como posible inhibidor de la fosfolipasa secretora humana.

Que presenta la pasante: Leticia Guadalupe Fragoso Morales  
Con número de cuenta: 310143343 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	
VOCAL	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
SECRETARIO	Dra. Jazmin Flores Monroy	
1er. SUPLENTE	M. en C. Leticia Zúñiga Gómez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Víctor Hugo Vázquez Valadez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga\*

**ÉSTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE BIOFÍSICA Y BIOCATÁLISIS DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA Y EN EL LABORATORIO DE MODELADO MOLECULAR, AMBOS LABORATORIOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. EL PROYECTO FUE DIRIGIDO POR LA DRA. JAZMÍN FLORES MONROY Y LA DRA. MARTHA CECILIA ROSALES HERNÁNDEZ.**

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

Le agradezco a Dios por haberme permitido culminar esta etapa tan importante de mi vida acompañada de mis seres amados que nunca me han dejado sola a pesar de la distancia que nos separaba.

Mi tesis está dedicada a dos grandes seres que me ha dado Dios, a ti mamá y papá, que sin su esfuerzo, dedicación, amor, comprensión, disponibilidad y respeto, nunca hubiera llegado este momento.

Mami y papi les agradezco su apoyo, sus palabras de aliento, sus llamadas de atención cuando más lo necesitaba, sé que no ha sido fácil pero lo logramos.

Toño y Chucho, hermanos, gracias por estar junto a mí en esta hermosa experiencia, por ayudarme y comprenderme en mis tiempos de estrés, frustración y felicidad, por sacarme una sonrisa.

Liz, gracias por mimarme cuando no dormía, por ser una amiga en lugar de una cuñada.

Abuelito José, sé que ya no estás pero no sabes que gusto me hubiera dado el que estuvieras aquí para compartir este gran momento, solo te pido me tengas un espacio a lado tuyo cuando tenga que visitarte.

Abuelita Marina, la amo con todo mí ser, gracias por siempre procurarme y cuidar de mí en toda mi vida.

Jaime López, mi gran amigo, gracias por siempre estar al pendiente de mí y apoyarme en todo momento, vamos por más años juntos.

Amigos: Jimena Serrano, Yazmin Alonso, Yutzil Guzmán, Luis Agonizantes, Oscar Sepúlveda, Arturo Macías, Miguel Ángel Gómez, les agradezco su tiempo y ayuda en esta gran etapa, sé que no ha sido fácil pero lo logramos. Siempre los llevaré en mi corazón.

Dra. Martha Rosales H. gracia por confiar en mí y en mi trabajo que sin su apoyo no hubiera sido posible nada de esto, gracias por aceptarme siempre, la quiero mucho.

Dra. Jazmín Flores M. infinitas gracias por sacar lo mejor de mí, créame que ha sido una persona muy importante en mi formación como BQD.

Dra. Jesica Mendieta gracias por estar conmigo en esta etapa, la quiero mucho.

Dr. José Correa gracias por inducirme a todo los estudios de Docking y por su apoyo para hacer este trabajo.

Laura Cristina Cabrera, amiga Lau no sabes cuánto agradezco el haberte conocido, gracias por apoyarme siempre, sabes que tienes una amiga.

Maricarmen Hernández, gracias por tus enseñanzas y todo tu apoyo incondicional.

Sin duda gracias a todos los que integran el Laboratorio de Biofísica y Biocatálisis y modelado molecular del IPN, que más que compañeros han sido una gran familia: Ana Correa, Oscar Lara, Luisito, Alma Ortiz, Daniel Villalobos, Alberto Martínez.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>FOSFOLIPASAS A2.....</b>	<b>6</b>
<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS FAMILIAS DE LAS FOSFOLIPASAS.....</b>	<b>7</b>
FOSFOLIPASA CITOSÓLICA.....	9
FOSFOLIPASA SECRETORA.....	11
FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE.....	13
<b>IMPORTANCIA DE LAS FOSFOLIPASAS EN DIVERSAS ENFERMEDADES .....</b>	<b>14</b>
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....</b>	<b>14</b>
<b>CÁNCER.....</b>	<b>16</b>
<b>OBESIDAD .....</b>	<b>17</b>
<b>INHIBIDORES SINTÉTICOS Y NATURALES PARA LAS FOSFOLIPASAS .....</b>	<b>20</b>
<b>INHIBIDORES SINTÉTICOS.....</b>	<b>22</b>
INHIBIDORES 2-OXOAMIDAS.....	22
BROMOENOL LACTONA .....	23
FLUOROCETONAS Y FLUOROFOSFATOS.....	24
INHIBIDORES AMIDAS .....	24
INHIBIDORES BASE PIRROLIDINA .....	25
<b>PRODUCTOS NATURALES.....</b>	<b>25</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>

<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>29</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>30</b>
<b>ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS .....</b>	<b>30</b>
<b>ACOPLAMIENTO MOLECULAR .....</b>	<b>31</b>
PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS .....	31
<b>PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>32</b>
SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	32
<b>ANÁLISIS POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LOS LIGANDOS SELECCIONADOS Y CADA DE UNA DE LAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>34</b>
<b>EVALUACIÓN DEL MÉTODO.....</b>	<b>36</b>
FOSFOLIPASA A <sub>2</sub> CITOSÓLICA .....	37
FOSFOLIPASA A <sub>2</sub> SECRETORA .....	37
FOSFOLIPASA A <sub>2</sub> INDEPENDIENTE .....	37
<b>VISUALIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>ESTUDIO <i>in vitro</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS .....</b>	<b>42</b>
<b>ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LOS LIGANDOS SELECCIONADOS Y CADA DE UNA DE LAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>43</b>
VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	43
FOSFOLIPASA CITOSÓLICA.....	43
FOSFOLIPASA SECRETORA.....	45
FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE DE CALCIO.....	46
<b>ACOPLAMIENTO MOLECULAR .....</b>	<b>48</b>
FOSFOLIPASA SECRETORA.....	48
FOSFOLIPASA CITOSÓLICA.....	50
FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE DE Ca <sup>2+</sup> .....	54

<b>EVALUACION <i>in vitro</i></b> .....	<b>56</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido 5-[[ <i>(2E)</i> -3-bromo-3-carboxyprop-2-enoil]amino]-2-hidroxibenzoico ....	5
Figura 2. Reacción de hidrólisis en la posición <i>sn</i> -2 de la unión del glicerol .....	6
Figura 3. Formación de eicosanoides a partir de ácido araquidónico .....	8
Figura 4. Localización de cada una de las fosfolipasas en la célula.....	8
Figura 5. Papel de la fosfolipasa citosólica.....	9
Figura 6. Estructura del cristal de la PLA <sub>2</sub> grupo IVA.....	11
Figura 7. Estructura del cristal de la sPLA <sub>2</sub> hGIIA.....	13
Figura 8. Estructura de la fosfolipasa independiente de calcio iPLA <sub>2</sub> .....	14
Figura 9. Rutas en donde se encuentran involucradas las fosfolipasas (PLA <sub>2</sub> s) .....	18
Figura 10. Papel de la señalización de AdPLA-PGE <sub>2</sub> -EP <sub>3</sub> .....	20
Figura 11. Estructuras de compuestos PLAC1 a PLAC10.....	21
Figura 12. Estructura de 2-OXOAMIDA (PLAC7) .....	22
Figura 13. Estructura de AX048 (PLAC1) .....	22
Figura 14. Estructura de AX059 (PLAC2) .....	23
Figura 15. Estructura de Bromoenol lactona (PLAC3) .....	23
Figura 16. Estructura de Pentafluoroetilcetona FKGK11" (PLAC4).....	24
Figura 17. Estructura de GK115 (PLAC6) . .....	24
Figura 18. Estructura de Pirroxifeno (PLAC8) .....	25
Figura 19. Estructura de Manoalide .....	25
Figura 20. Estructura de C1. ....	26
Figura 21. Fosfolipasa humana A <sub>2</sub> secretora PDB 1DB4.....	33
Figura 22. Alineamiento de la secuencia de iPLA <sub>2</sub> (β) .....	35
Figura 23. Alineamiento de las secuencias de PLA <sub>2</sub> de humano y de abeja.....	39
Figura 24. Secuencia de las proteínas utilizadas para el estudio <i>in silico</i> .....	42
Figura 25. Caracterización de la unión del compuesto 2-OXOAMIDA (PLAC9) a cPLA <sub>2</sub> .....	44
Figura 26. Estructura 8IN. Construida en ACD/ChemSketch.....	45
Figura 27. Conformación de 8IN en la proteína sPLA <sub>2</sub> .....	46
Figura 28. Caracterización de la unión del compuesto PHFK (PLAC9) a iPLA <sub>2</sub> .....	47
Figura 29. Interacción del compuesto selectivo PLAC5 con sPLA <sub>2</sub> .....	50
Figura 30. Interacción con el compuesto reversible PLAC8 con cPLA <sub>2</sub> .....	53
Figura 31. Interacción con el compuesto selectivo PLAC7 2-oxoamida con cPLA <sub>2</sub> .....	53
Figura 32. Interacción con el compuesto selectivo PLAC15 con las 3 PLA <sub>2</sub> .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Inhibidores selectivos para cada una de las fosfolipasas.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 2 Compuestos propuestos.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3 Preparación de reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 4 Secuencia de la adición de los reactivos y sus cantidades en microplaca para PLAC15.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 5 Secuencia de la adición de los reactivos y sus cantidades en microplaca para PLAC16.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 6 Secuencias de la PLA<sub>2</sub> humana seleccionadas.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 7 Interacciones de los ligandos de sPLA<sub>2</sub>.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 8 Interacciones de los ligandos de cPLA<sub>2</sub>.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 9 Interacciones de los ligandos de iPLA<sub>2</sub>.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 10 Fluorescencia del PLAC15.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 11 fluorescencia Indometacina PLAC16.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 12 Comparación de los compuestos selectivos de cada PLA<sub>2</sub>.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 13 Comparación de los compuestos propuestos para cada PLA<sub>2</sub>.....</i>	<i>60</i>

## ABREVIATURAS

Enfermedad de Alzheimer	(EA)
Especies reactivas de oxígeno	(ERO)
NADPH oxidasa	(NOX)
Ciclooxigenasa	(COX-2)
Fosfolipasas A <sub>2</sub>	(PLA <sub>2</sub> )
Fosfolipasa A <sub>2</sub> secretora	(sPLA <sub>2</sub> )
Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica	(cPLA <sub>2</sub> )
Fosfolipasa A <sub>2</sub> activador de plaquetas	(PAF-AH)
Fosfolipasa A <sub>2</sub> calcio-independiente	(iPLA <sub>2</sub> )
Fosfolipasa A <sub>2</sub> lisosomal	(lysPLA <sub>2</sub> )
Fosfolipasa A <sub>2</sub> adiposo específica	(adPLA <sub>2</sub> )
Ácido araquidónico	(AA)
Acetato de tetradecanoilforbo-13-ilo	(TPA)
Ácido oléico	(OA)
Activador de plaquetas	(PAF)
Prostaglandinas	(PG)
Lipopolisacáridos	(LPS)
Placas seniles	(SP)
Ovillos neurofibrilares	(nfts)
Beta-amieloides	(A $\beta$ )
Proteína precursora amiloide	(APP)
Ácido N-metil-D-aspartico	(NMDA)
Especies reactivas de oxígeno/nitrógeno	(ROS/RNS)

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta protectora de varias células y tejidos dañados, teniendo como propósito la destrucción y remoción de agentes y tejidos dañados, con el fin de beneficiar la reparación del tejido. Sin embargo, cuando esta respuesta se descontrola se dañan las células y los tejidos, resultando una destrucción del tejido normal y una inflamación crónica [1].

Son muchas las enfermedades en las que se involucran procesos inflamatorios, entre ellas se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), cáncer y obesidad, las cuales se caracterizan por un desequilibrio redox e inflamación crónica, siendo ésta la mayor causa de daño y muerte celular.

Una característica importante de estas enfermedades es la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales están extensamente reconocidas como mediadores de la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin embargo, la producción excesiva de ERO en la mitocondria, por la NADPH oxidasa (NOX) entre otras, genera estrés oxidativo [1], en donde existe la alteración del metabolismo de los fosfolípidos, la acumulación de peróxidos de lípidos, la producción de ciclooxigenasa (COX-2) y el incremento de la actividad de las fosfolipasas A<sub>2</sub>.

Este grupo de fosfolipasas A<sub>2</sub>, lo conforman la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora (sPLA<sub>2</sub>), fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), fosfolipasa A<sub>2</sub> activador de plaquetas (PAF-AH), fosfolipasa A<sub>2</sub> calcio-independiente (iPLA<sub>2</sub>), lisosomal (LysPLA<sub>2</sub>) y adiposo específica (AdPLA<sub>2</sub>) [2], las cuales hidrolizan el glicerofosfolípido en la posición sn-2 para producir un ácido graso libre, principalmente el ácido araquidónico (AA) y un lisofosfolípido, con actividades pro-inflamatorias importantes, por lo tanto, el incremento de dichas fosfolipasas se encuentra involucrado en la generación de estrés oxidativo a través de la producción de eicosanoides. La activación de las PLA<sub>2</sub> ocurre por daño en la membrana celular, movimientos intracitoplasmáticos de calcio y/o mediada por receptores específicos de la membrana celular.

Hoy en día existen diferentes inhibidores para cada una de las fosfolipasas  $A_2$ , sin embargo, no han sido utilizados como tratamiento para el control de las enfermedades relacionadas con la producción de estrés oxidativo, por lo que el objetivo de este trabajo es realizar un estudio *in silico* a partir de algunos inhibidores sintéticos y naturales ya conocidos, con el fin de determinar las características químicas de los inhibidores selectivos de la fosfolipasa  $A_2$ . Además, se evaluará el compuesto ácido 5-[[2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino]-2-hidroxibenzoico (Figura 1), el cual en estudios previos, se encontró que tiene actividad antiinflamatoria en un modelo de inflamación en oreja de ratón inducido con acetato de tetradecanoilforbo-13-ilo (TPA), sin embargo, se descubrió que el efecto no fue a través de la inhibición de MPO como se había propuesto. En este trabajo se pretende conocer, si el compuesto es capaz de inhibir la acción de las fosfolipasas  $A_2$  y con ello disminuir la inflamación, ya que al inhibir la fosfolipasa  $A_2$  secretora se inhibirá la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos y con el ello la producción de especies pro-inflamatorias. El AA es un precursor importante de eicosanoides, debido a esto las  $PLA_2$  juegan un papel importante dentro de enfermedades y procesos inflamatorios.

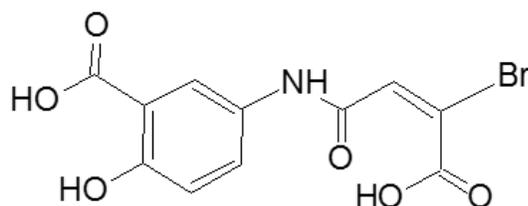


Figura 1. Estructura química del ácido 5-[[2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino]-2-hidroxibenzoico.

La evaluación del compuesto ácido 5-[[2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino]-2-hidroxibenzoico se realizó mediante estudios *in silico* e *in vitro*. La evaluación *in silico* se realizó mediante estudios de acoplamiento molecular (Docking) y la evaluación *in vitro* empleando un kit comercial EnzCheck Phospholipase  $A_2$  Assay

Kit, mediante un método fluorométrico, en donde se determinó la actividad de la PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja, la cual conserva 45% de similitud con la PLA<sub>2</sub> humana.

## ANTECEDENTES

### FOSFOLIPASAS A<sub>2</sub>

Desde el siglo XIX se ha identificado la actividad lítica de las fosfolipasas en veneno de serpiente; en primer lugar fue caracterizada en veneno de cobra y más tarde de veneno de la serpiente de cascabel. A medida que avanzaron las metodologías de secuenciación, en la década los 70's se hizo evidente que estas enzimas tienen un gran número de residuos de cisteína, en más del 10% de los aminoácidos.

En 1988 se presentó el primer reporte de secuenciación y clonación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora humana no pancreática, la cual fue aislada de líquido sinovial de la una rodilla artrítica [3]. En mamíferos se han encontrado más de 19 isoformas de PLA<sub>2</sub> y se ha visto que participan en eventos fisiológicos relacionados al daño celular, inflamación y apoptosis [4].

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (EC.3.1.1.4) (PLA<sub>2</sub>) pertenecen a una gran familia de enzimas capaces de hidrolizar el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos, dando como productos ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Figura 2). En sistemas celulares con un aporte suficiente de ATP y CoASH, los ácidos grasos libres liberados, son fácilmente convertidos en acil-CoA y posteriormente se convierten en fosfolípidos de membrana, mediante lisofosfolípidos aciltransferasas [5].

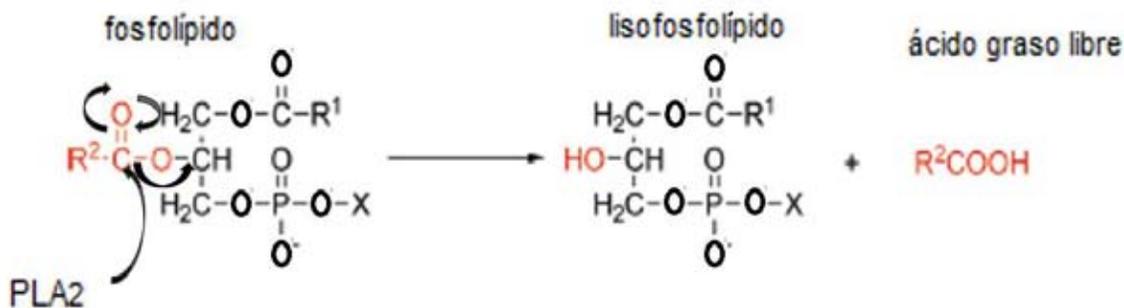


Figura 2. Reacción de hidrólisis en la posición sn-2 de la unión del glicerol. X es cualquier cabeza polar, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, cadenas de ácidos grasos. (Modificada de [3])

Los ácidos grasos liberados, tales como el ácido araquidónico (AA) y el ácido oleico (OA) son almacenes de energía y, además, actúan como precursores de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), los cuales son potentes mediadores en las señales de la transducción en la inflamación [6].

El ácido araquidónico es convertido en mediadores de inflamación, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (Figura 3) en condiciones normales, sin embargo, no solo actúa en la vía de la conversión de los metabolitos inflamatorios, también puede regular directamente la función celular por varios mecanismos, como la alteración de la fluidez de la membrana y el estado polarizado, activando la protein-cinasa C, además regula los genes de la transcripción [7].

Por otro lado, los lisofosfolípidos (1-alkil-2-lisofosfolípidos) participan en la señalización celular y en el remodelado fosfolipídico de la membrana, éstos son precursores inmediatos del factor activador de plaquetas (PAF), otro potente mediador de la inflamación [6,7].

Por lo tanto, la regulación de la actividad de las PLA<sub>2</sub> es necesaria para mantener los niveles basales del AA, lisofosfolípidos y PAF para la función normal de la célula, ya que si hay un aumento de la actividad y en la producción de mediadores proinflamatorios, eicosanoides y PAF, éstos pueden potenciar el daño celular [7].

Un desequilibrio en la producción de todos estos compuestos pueden conducir al desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias como artritis reumatoide y asma, por lo tanto, los inhibidores de la PLA<sub>2</sub> pueden reducir los efectos de la inflamación. [9]

## **CARACTERÍSTICAS DE LAS FAMILIAS DE LAS FOSFOLIPASAS**

Algunas de las familias de las fosfolipasas más importantes reportadas son: fosfolipasa A2 citosólica (cPLA<sub>2</sub>), fosfolipasa A2 secretora (sPLA<sub>2</sub>) y la fosfolipasa A2 independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>), en donde cada una de ellas se encuentran en distintas regiones de la célula. (Figura 4)



Figura 3. Formación de eicosanoides a partir de ácido araquidónico. Modificada de [8]

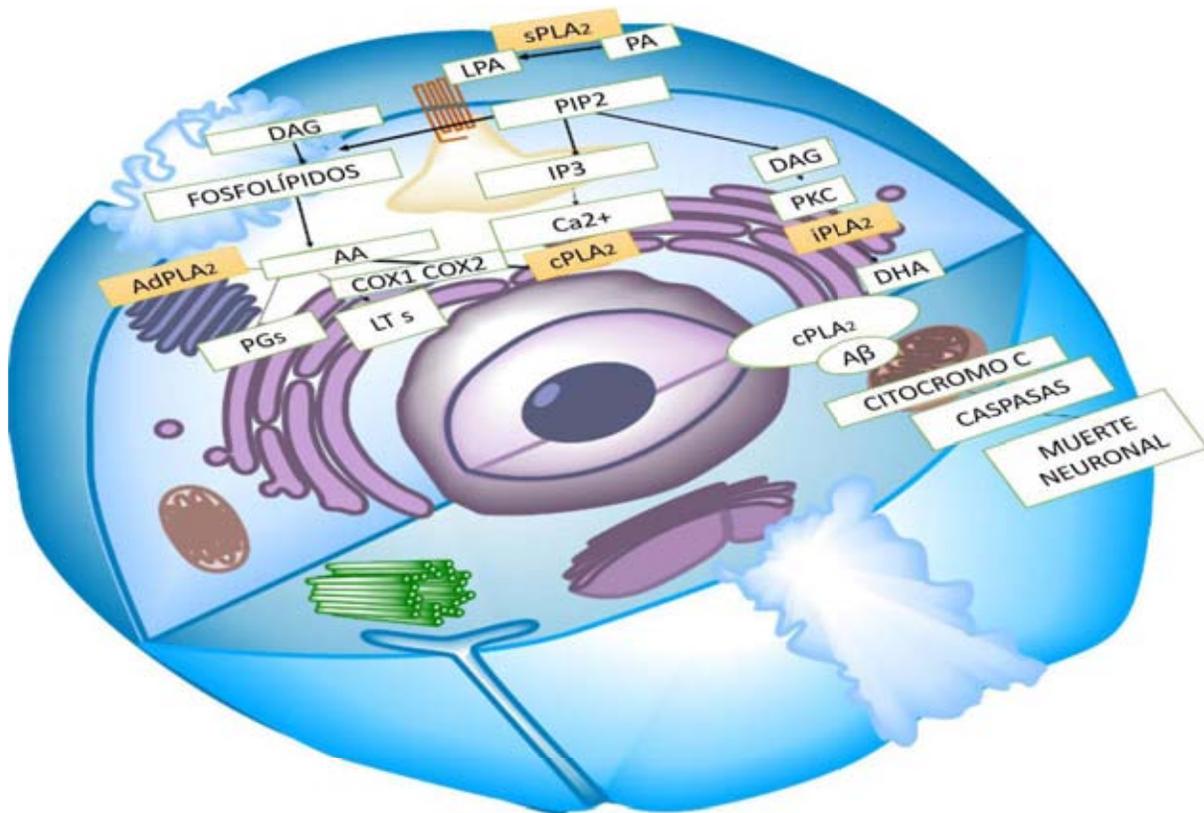


Figura 4. Localización de cada una de las fosfolipasas en la célula. Modificado [25]

## FOSFOLIPASA CITOSÓLICA

La fosfolipasa citosólica es una enzima intracelular que se encuentra en el citosol y tiene un peso aproximado de 85 kDa. Esta familia se conforma de 6 miembros (cPLA<sub>2</sub> - $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\xi$ ) que solo son 30% homólogos y por ende tienen propiedades enzimáticas diferentes. [15, 17]

Los principales productos de la reacción catalizada por la cPLA<sub>2</sub> son el ácido araquidónico (AA) y los liso-compuestos (figura 5) Particularmente el AA es convertido en mediadores de la inflamación como prostaglandinas (PG) y leucotrienos, los cuales pueden actuar directamente en la regulación de la función celular por la alteración de la fluidez de la membrana, activando proteínas cinasas y regulando la transcripción genética [10].

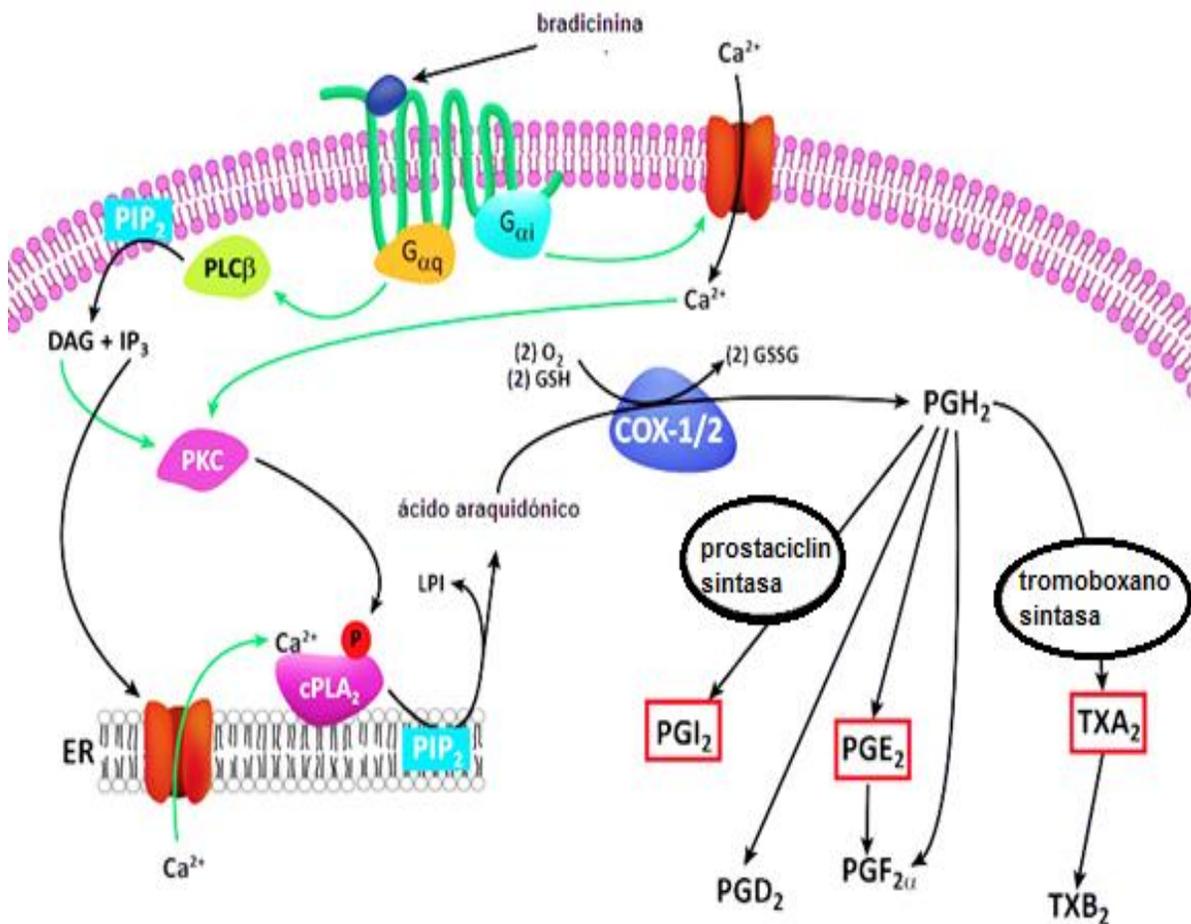


Figura 5. Función de la fosfolipasa citosólica. Modificada [12]

Los leucotrienos causan la obstrucción aérea en asmáticos a través de la bronco constricción, incrementan la secreción de la mucosa y células inflamatorias; las prostaglandinas incrementan el dolor y el edema que está asociado con la artritis **[16]**. Es por ello que la actividad de la cPLA<sub>2</sub> se encuentra regulada con el fin de mantener los niveles de AA y lisofosfolípidos para una homeostasis celular **[10]**.

La PLA<sub>2</sub> GIVA posee actividad de transacetilasa y lisofosfolipasa, donde esta última actividad no depende de la concentración de calcio, de tal forma que la enzima se tiene que cambiar a una interfase de fosfolípidos para ser activada.

La unión de cPLA<sub>2</sub> a la membrana es mediante un mecanismo que involucra 3 pasos: (1) unión a un segundo mensajero lipídico, (2) fosforilación y (3) translocación activada por Ca<sup>2+</sup>, desde el citosol a la membrana; la concentración de calcio necesaria es de 10 a 100 nM **[11]**.

La estructura proteíca de cPLA<sub>2</sub> está compuesta por un dominio C2, el cual está involucrado en la translocación de la cPLA<sub>2</sub> del citosol a la membrana dependiente de calcio, además posee un dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa que contiene el sitio activo. Mediante mutagénesis dirigida se descubrió que el sitio catalítico está compuesto por una díada catalítica conformada por S228/D549 (figura 6), que posteriormente fue confirmado por cristalografía de rayos X. El residuo D549 sustrae un protón del grupo hidroxilo de la S228 durante el ataque nucleofílico al enlace éster sn-2, para formar una acil-enzima durante la catálisis de cPLA<sub>2</sub> **[13 15]**.

Los grupos amida entre los residuos G197/G198 forman una cavidad denominada oxianión, la cual está localizada cerca del residuo de serina 228 y contribuyen a la estabilización del estado de transición del intermediario tetraédrico por la formación de puentes de hidrógeno. La R200 está localizada en la misma región donde se encuentra la cavidad oxianión y contribuye en la estabilización del intermediario tetraédrico interactuando con el grupo fosfato del sustrato.

La estructura cristalizada de la GIVA cPLA<sub>2</sub> revela una región anfipática conocida como “región Lid”, la cual consta de los residuos 413-457 y bloquea el acceso del sustrato (fosfolípido) al sitio activo. Por otro lado, los residuos 408-412 y los residuos 433-457, que pertenecen a la región Lid, son regiones altamente flexibles que

permiten que esta región se abra en presencia del sustrato o de algún inhibidor. [13, 15]

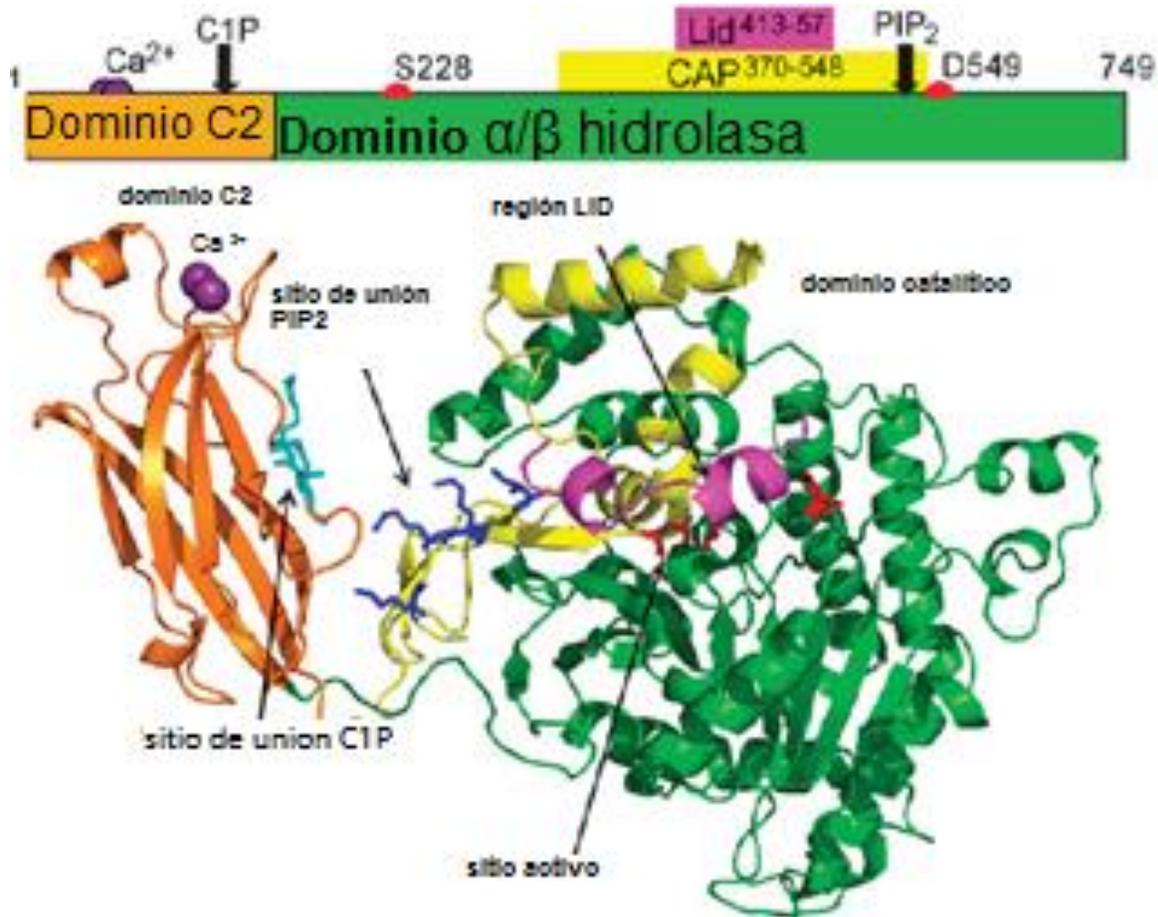


Figura 6. Estructura del cristal de la PLA<sub>2</sub> grupo IVA. El dominio C2 se muestra de color naranja, unido a 2 iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que se muestran en color morado. El dominio catalítico muestra una región CAP de color amarillo y una región LID 415-432 de color rosa. Los residuos del sitio activo son S228, D549 y R200, los cuales se muestran de color rojo. El sitio de unión PIP<sub>2</sub> se observa de azul fuerte y el sitio de unión C1P se puede observar de color azul claro. [14]

## FOSFOLIPASA SECRETORA

La fosfolipasa secretora, fue una de las primeras enzimas PLA<sub>2</sub> descubiertas en su tipo. Éstas fueron encontradas en diversas fuentes como en venenos de varias

víboras, escorpiones, así como en los componentes del jugo pancreático, fluido sinovial en artritis y en diferentes tejidos de mamíferos **[14]**.

Esta enzima está caracterizada por tener un bajo peso molecular, el cual oscila de 14 a 18 kDa y está mayormente asociada con sinaptosomas y a fracciones de vesículas sinápticas, esta enzima es sintetizada intracelularmente y posteriormente es secretada para actuar extracelularmente **[13]**.

Existen múltiples isoformas de sPLA<sub>2</sub>, los cuales incluyen sPLA<sub>2</sub>-IIB, sPLA<sub>2</sub>-IIA, sPLA<sub>2</sub>-IIC, sPLA<sub>2</sub>-IID, sPLA<sub>2</sub>-IIE, sPLA<sub>2</sub>-IIF, sPLA<sub>2</sub>-III, sPLA<sub>2</sub>-V, sPLA<sub>2</sub>-X, sPLA<sub>2</sub>-XIIA y sPLA<sub>2</sub>-XIIB; usualmente las isoformas contiene de 5 a 8 enlaces disulfuro.

En particular, la GIIA sPLA<sub>2</sub> es una enzima de bajo peso molecular (14 kDa) y tiene 7 enlaces disulfuro, y fue clonada en 1989. La estructura cristalizada de la enzima revela una unión a Ca<sup>2+</sup> altamente conservada y además muestra una díada catalítica que consiste en 2 aminoácidos H47/D91. Además, esta estructura cristalizada de la enzima tiene un sitio activo conservado en una región hidrofóbica cerca del N-terminal **[11, 18]**.

Durante la hidrólisis del sustrato participa una molécula de agua, la cual es activada por el residuo H47, con el subsecuente ataque nucleofílico al carbono carbonílico del enlace éster sn-2. Además de la histidina, hay un residuo de aspartato (D48), que junto a G29, G31 y H27 se unen al Ca<sup>2+</sup> (Figura 7). La sPLA<sub>2</sub> requiere concentraciones mM de Ca<sup>2+</sup> para su catálisis. La estructura cristalizada de la enzima tiene un sitio activo conservado en una región hidrofóbica cerca del N-terminal de la hélice **[11, 18]**.

Los miembros de este grupo tienen un residuo de histidina en el sitio activo, el cual requiere niveles mM de Ca<sup>2+</sup> para la catálisis, y no comparte especificidad para determinados ácidos grasos. Recientemente se ha demostrado que la sPLA<sub>2</sub> en presencia de lipopolisacáridos (LPS), es un potente activador de macrófagos **[10,11]**.

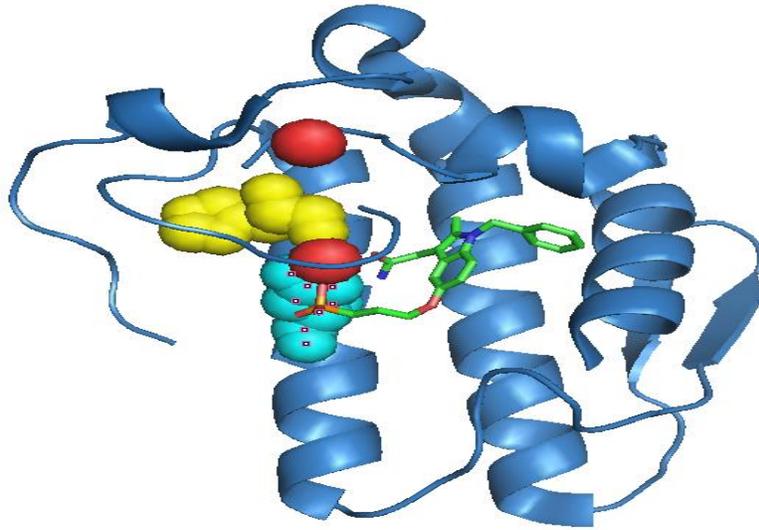


Figura 7. Estructura del cristal de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA. PDB 1DB4 [19], en donde en color rojo se observan 2 moléculas de Ca<sup>2+</sup> y en color amarillo se muestra el residuo del sitio activo H27. El color magenta es el residuo D48 [19]

## FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE

La fosfolipasa del grupo VI, hidroliza el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos y con ello libera ácidos grasos libres, los cuales pueden ser metabolizados a ecosanoides proinflamatorios, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos.

La fosfolipasa del grupo VI, fue nombrada como fosfolipasa independiente de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>) después de haber descubierto que su actividad no se incrementa al estar en presencia de Ca<sup>2+</sup>, en contraste con las otras PLA<sub>2</sub>s ya conocidas.

La primera iPLA<sub>2</sub> también conocida como iPLA<sub>2</sub>β, es de 85 kDa. Posteriormente fueron después descubiertas diferentes variantes de iPLA<sub>2</sub>, dando lugar a su clasificación en varios subgrupos. A la fecha, se han identificado 6 subgrupos que incluyen: GVIA (iPLA<sub>2</sub> β; PNPLA9), GVIB (iPLA<sub>2</sub> γ; PNPLA8), GVIC (iPLA<sub>2</sub> δ; PNPLA6), GVID (iPLA<sub>2</sub> ε; PNPLA3), GVIE (iPLA<sub>2</sub> ξ; PNPLA2) y GVIF PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub> η; PNPLA4).

Todas las enzimas de este GVI PLA<sub>2</sub> contienen un residuo de serina en el sitio activo, dominio catalítico similar a la patatina.

El GVI iPLA<sub>2</sub> es conocido por estar compuesto de un dominio N-terminal regulatorio que contiene 7 repeticiones de ankirina y tiene un dominio catalítico en el C-terminal

conteniendo una diada en el sitio activo constituido por S519/D652 (Figura 8) [20, 21].

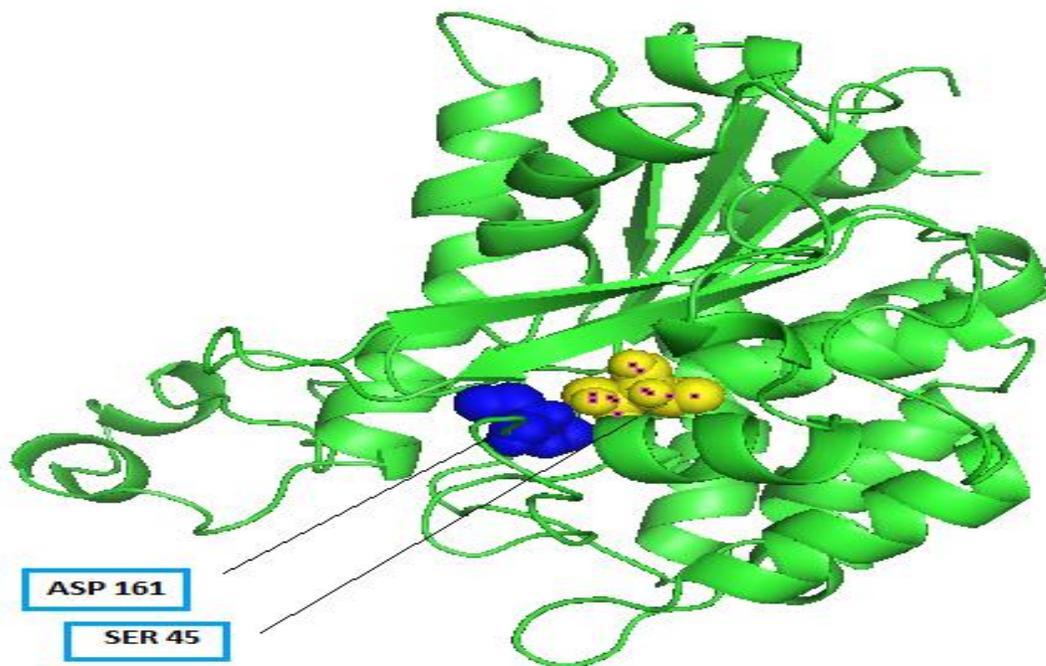


Figura 8. Estructura de la fosfolipasa independiente de calcio iPLA<sub>2</sub>. Se encuentran señalados los aminoácidos del sitio activo, en color azul se encuentra el ASP 161 y en color amarillo la S45. [20]

## IMPORTANCIA DE LAS FOSFOLIPASAS EN DIVERSAS ENFERMEDADES

### ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo y se relaciona con la edad y representa el 50-60% de todos los casos de demencia. La EA se caracteriza por el deterioro cognitivo irreversible, el cual se manifiesta con la pérdida de la memoria, así como la dificultad de lenguaje, déficit visoespacial, la falta del juicio y dificultad en la toma de decisiones [10].

Dentro de la EA existen marcadores neuropatológicos importantes como las placas seniles (SP) y los ovillos neurofibrilares (NFTs). Las SP se componen principalmente de péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) fibrilares, generados a partir de la

ruptura proteolítica anormal de la proteína precursora amiloide (APP), una glicoproteína transmembranal expresada. **[10]**

Dichos péptidos  $\beta$ -amiloides, se componen de 40 o 42 aminoácidos ( $A\beta$ 1-40 y  $A\beta$ 2-42), los cuales son insolubles, de tal forma que el agregado en el tejido cerebral causa muerte neuronal.

El otro marcador neuropatológico son aquellos NFTs, que son agregados resultado de la hiperfosforilación de la proteína Tau, la cual tiene la propiedad de estabilizar y puede ser detectada en los microtúbulos neuronales y en el núcleo. Existe una hipótesis que establece que la proteína Tau induce la neurodegeneración a través de la formación de depósitos filamentosos compuestos de Tau hiperfosfolilada.

Dentro de la fisiopatología de la EA existe un cambio metabólico complejo en las neuronas, en la glía y en las células neurovasculares, junto a un incremento en la deposición de las placas amiloides y de los ovillos fibrilares en las neuronas, además del estrés oxidativo, inflamación de las células de la glía, anormalidades cerebrovasculares y la más importante, la pérdida de la sinapsis **[10,22]**.

En esta demencia está involucrada una vía de señalización oxidativa/nitrosativa tras un daño progresivo del circuito neuronal y está asociada con las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas. Se ha demostrado que la estimulación excesiva de los receptores de glutamato ionotrópicos, por ejemplo los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), causa la alteración de la homeostasis del calcio neuronal, lo que lleva a la activación de proteasas, nucleasas y fosfolipasas, además de desencadenar las vías de señalización para la producción de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS), que a su vez se convierten en la base de la disfunción mitocondrial y la apoptosis neuronal.

Las fosfolipasas ( $PLA_2$ ) son enzimas que hidrolizan ácidos grasos de fosfolípidos de la membrana. Entre muchos tipos de  $PLA_2$  conocidos que se producen en el sistema nervioso central (SNC), la  $cPLA_2$  tiene un papel importante dentro de esta patología, ya que se encuentra en las neuronas, astrocitos y células de la microglia **[22]**, en donde la activación de la  $cPLA_2$  en astrocitos es a través del receptor  $P2Y_2$  acoplado a la proteína G.

En dicha enfermedad se ven involucradas otros 2 tipos de fosfolipasas, por ejemplo la iPLA<sub>2</sub>, que tras su inhibición existe una restricción en la proliferación de las neuritas y la pérdida de la viabilidad neuronal, y la sPLA<sub>2</sub> que se encuentra en el sistema nervioso central que se involucra en procesos de liberación y regulación de neurotransmisores, neuritogenesis y apoptosis neuronal. Esta fosfolipasa se ha considerado como un biomarcador de neuroinflamación, ya que en pacientes con Alzheimer, la actividad de esta fosfolipasa se ve incrementada en fluido cerebroespinal, de tal manera que la alteración de las PLA<sub>2</sub> en la homeostasis neuronal, puede tener impacto en la memoria. [23]

## **CÁNCER**

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Datos de la OMS establecen que el cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030, es decir aumentará el número de defunciones de 7.9 millones a 11.5 millones de personas, esto debido al crecimiento demográfico, así como al envejecimiento de la población.

Esta enfermedad es la segunda causa principal de mortalidad en aquellos países que se encuentran más desarrollados, siendo la primer causa, las enfermedades cardiovasculares [24].

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo, como lo son: el consumo de tabaco, alcohol, el tener una dieta inadecuada y la falta de actividad física, así como la exposición a carcinógenos tanto en un entorno laboral como en el medio ambiente, además de la exposición a radiaciones y algunas infecciones, por ejemplo hepatitis B o alguna infección por un virus, como puede ser el virus del papiloma humano [24].

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células, donde el tumor formado suele invadir el tejido circundante y con ello provoca metástasis.

Dentro de este proceso de crecimiento y de metástasis, se encuentran involucrados algunos mediadores lipídicos bioactivos derivados de un proceso de hidrólisis, el cual se rige por la acción de las fosfolipasas, como las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

Las fosfolipasas pueden ser activadas por múltiples señales extracelulares incluyendo hormonas, factores de crecimiento y lípidos, a través de la activación directa de receptores tirosina-cinasa (RTK's) o receptores acoplados a la proteína G (GPCR'S). [25]

La familia de las PLA<sub>2</sub> puede promover la progresión tumoral mediante una regulación extracelular del microambiente tumoral para activar la migración y la invasión celular, sin embargo, también puede tener un efecto que inhibe el crecimiento celular.

Los productos lipídicos de las fosfolipasas involucrados en la progresión tumoral son ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido araquidónico (AA). La generación de LPA en el microambiente tumoral puede estar mediado por PLA<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>-Fosfatidilserina) y ácido fosfatídico selectivo, asociado a membrana (mPA-PLA<sub>1</sub>), PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIA) y autotaxina (también conocida como ENPP2 y lisoPLD). La presencia de LPA en suero es un indicador de iniciación tumoral y progresión en cáncer de mama, cáncer de ovario y mieloma múltiple [25]

Las fosfolipasas y sus mediadores lipídicos inducen diferentes vías de señalización (Figura 9). Además, estos mediadores lipídicos son factores importantes que participan en una variedad de procesos celulares, relacionados con la tumorigénesis y con la metástasis, tales como la secreción de metaloproteinasa de la matriz (MMP), reorganización del citoesqueleto de actina, la migración, proliferación, crecimiento celular, inflamación y la angiogénesis [25].

## **OBESIDAD**

Datos de la OMS establecen que desde 1980, la obesidad se ha más que duplicado en todo el mundo.

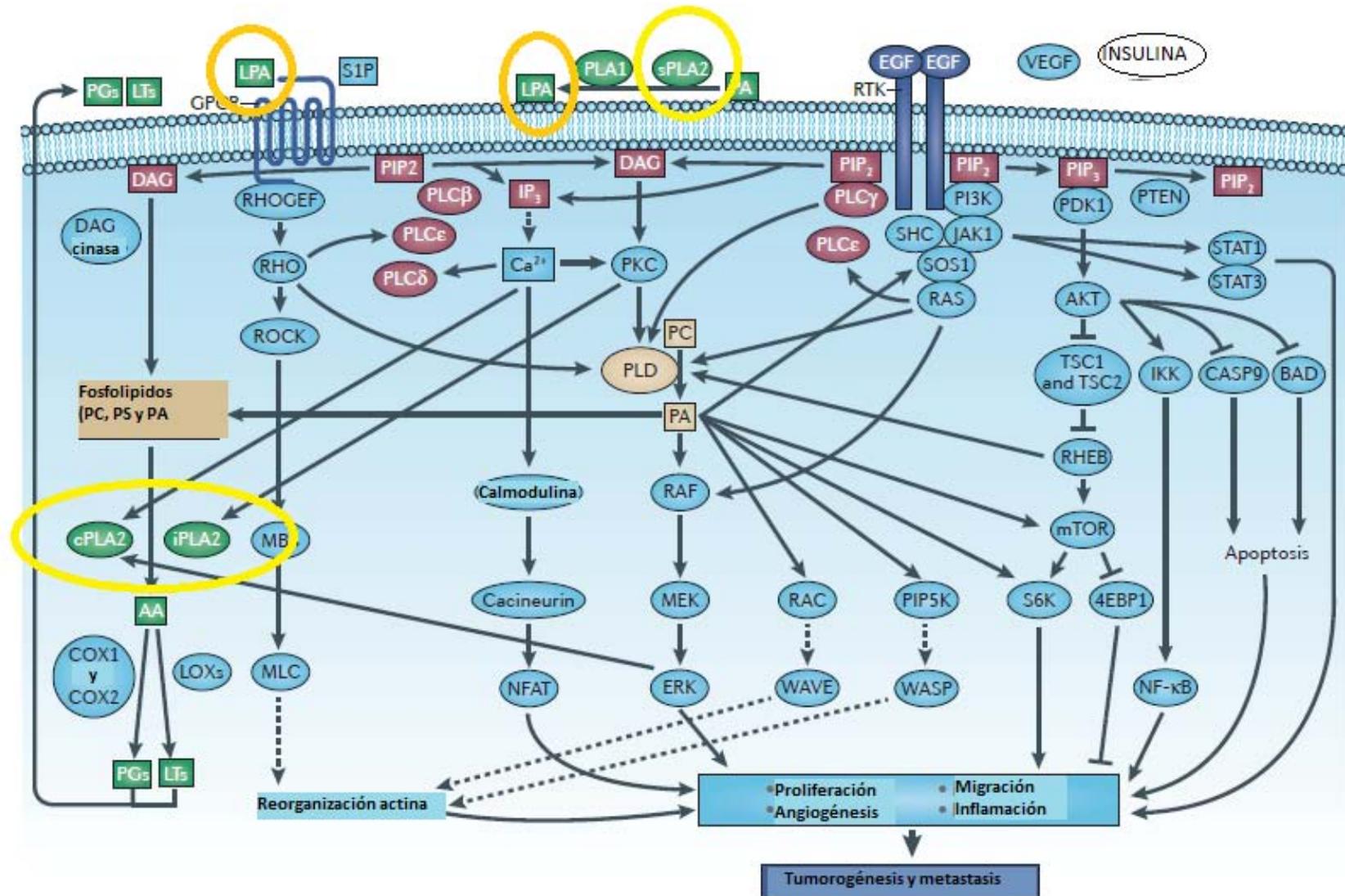


Figura 9. Rutas en donde se encuentran involucradas las fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>s) Modificada [25]

La obesidad y el sobrepeso se han definido como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, en donde el índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos.

Datos recientes reportados por la OMS establecen que en el año de 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. Define la OMS que la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas [26].

Dentro de la obesidad, se encuentran involucrados múltiples procesos moleculares como el incremento de la masa del tejido adiposo blanco (“WAT” por sus siglas en inglés). La obesidad puede acompañarse del incremento de tamaño del adipocito como consecuencia del incremento del triacilglicerol (TAG) contenido dentro de la célula grasa, así como el aumento del número de adipocitos resultantes de la diferenciación de las células precursoras [27]. Los adipocitos tienen la habilidad para secretar varias moléculas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6) y el tejido adiposo suele ser infiltrado con macrófagos que son la fuente de citocinas proinflamatorias. También existe un segundo tipo de tejido adiposo conocido como tejido adiposo café (BAT), el cual se presenta en adultos y se ha establecido que tiene un papel importante en la progresión de la obesidad [27].

La obesidad se encuentra relacionada con la inflamación del tejido adiposo.

Recientes estudios han ligado a la PLA<sub>2</sub> en el desarrollo de desórdenes metabólicos, obesidad e inflamación, debido a su actividad y a biomoléculas bioactivas como prostaglandinas y leucotrienos. Específicamente se ha identificado una PLA<sub>2</sub> expresada en el tejido adiposo que es dependiente de Ca<sup>2+</sup> que puede actuar para regular la obesidad y se ha identificado como PLA<sub>2</sub> –adiposo específica (AdPLA).

Por otro lado, se han detectado niveles altos de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), sin embargo, el receptor 3 de prostaglandina E (EP3) se expresa en adipocitos. Otros

receptores de PGE<sub>2</sub>, como los receptores EP1, EP2 y EP4, además de receptores de prostaciclina, se expresan en muy bajos niveles en adipocitos.

Es así que, Marcia y colaboradores hicieron una hipótesis en donde, en el tejido adiposo, la PGE<sub>2</sub> producida durante la liberación de AA catalizado por la AdPLA, puede actuar a través del acoplamiento EP3/Giα para suprimir la lipólisis dependiente a AMPc [27] (Figura 10).

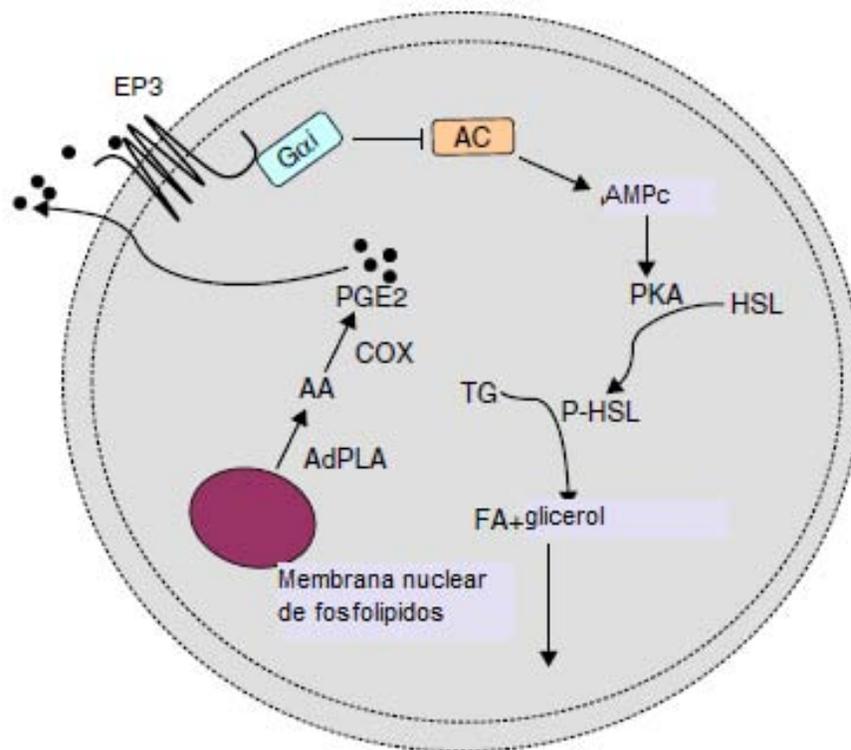


Figura 10. Papel de la señalización de AdPLA-PGE<sub>2</sub>-EP3 en la regulación de la lipólisis. Modificada [27]

## INHIBIDORES SINTÉTICOS Y NATURALES PARA LAS FOSFOLIPASAS

Para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el desarrollo y progreso de inflamación, se han desarrollado fármacos, muchos de ellos enfocados en la inhibición de la ciclooxygenasa (COX2) y otros en la inhibición de las PLA<sub>2</sub>, los cuales han resultado un poco más complicados debido a la enorme familia de proteínas. Sin embargo, muy pocos de los compuestos hasta ahora conocidos como inhibidores de PLA<sub>2</sub> tienen un uso clínico.

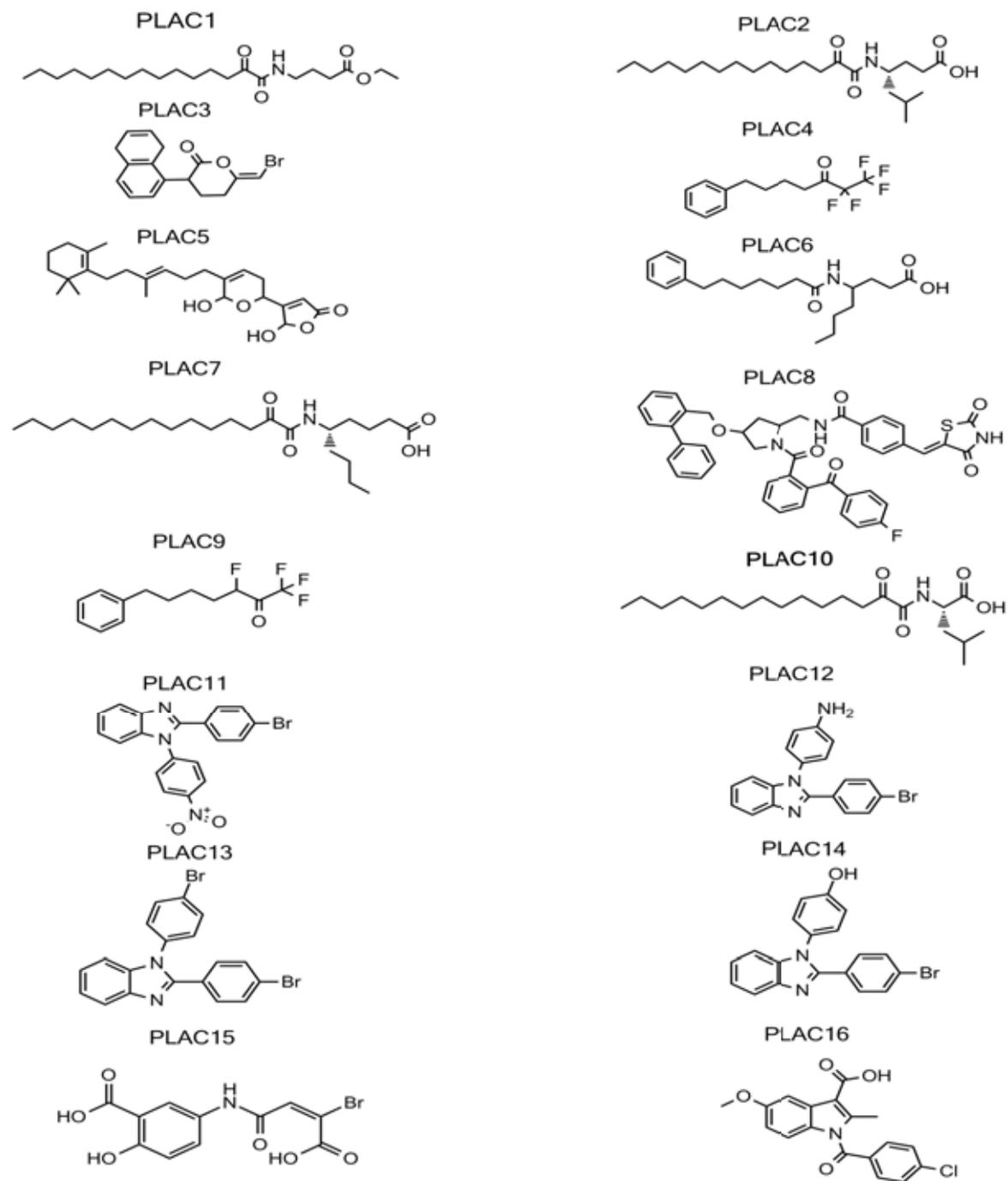


Figura 11. Estructuras de compuestos ya conocidos de PLAC1 a PLAC10 como inhibidores de PLA<sub>2</sub>. Compuestos a evaluar PLAC11 a PLAC15 como inhibidores de PLA<sub>2</sub>. Compuesto de referencia PLAC16 indometacina.

## INHIBIDORES SINTÉTICOS

### INHIBIDORES 2-OXOAMIDAS

Los inhibidores 2-oxoamidas están diseñados para que actúen en el sitio activo de la cPLA<sub>2</sub>, específicamente en el aminoácido Ser. La estructura lineal que presentan dichos inhibidores (Figura 12), está basada en aminoácidos  $\gamma$  o  $\delta$ , que al tener un grupo carboxilo libre los hace ser inhibidores potentes y selectivos para cPLA<sub>2</sub>.

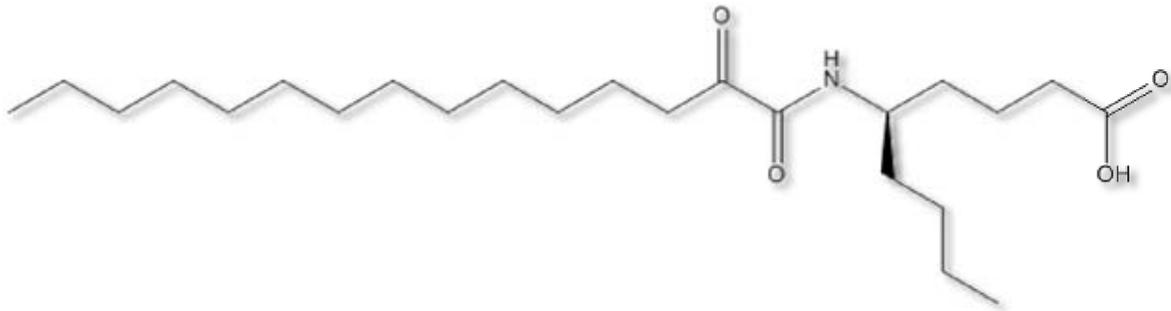


Figura 12. Estructura de 2-OXOAMIDA (PLAC7)

El inhibidor AX048 (PLAC1) tiene la capacidad de inhibir a 2 fosfolipasas la iPLA<sub>2</sub> y a la cPLA<sub>2</sub>, ya que tiene un grupo éster. Es un inhibidor con potente efecto antihiperálgico

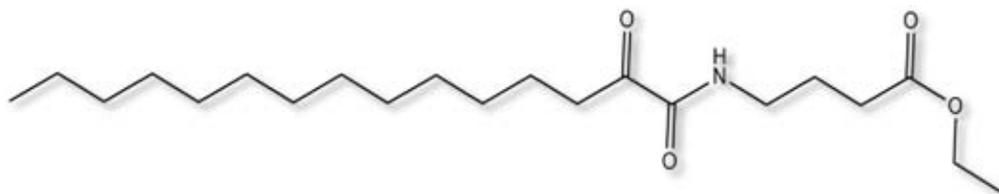


Figura 13. Estructura de AX048 (PLAC1)

Por otra parte, AX059 (PLAC2) es un inhibidor selectivo de la cPLA<sub>2</sub>, además es capaz de modular la inflamación y degeneración, por la promoción de células T reguladoras en ratas con Alzheimer. [28]

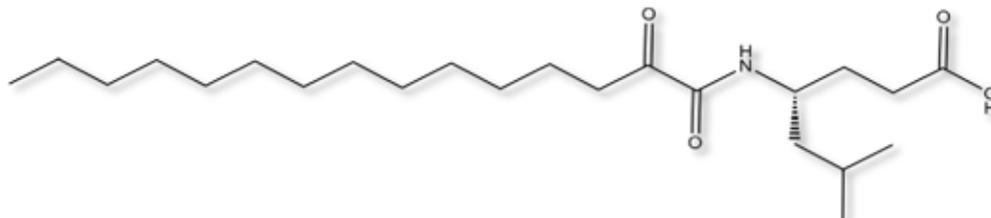


Figura 14. Estructura de AX059 (PLAC2)

### BROMOENOL LACTONA

La bromoenol lactona (BEL) es un inhibidor (PLAC3) que se une de forma covalente e irreversible a la iPLA<sub>2</sub>, ya que ha mostrado ser 1000 veces más selectiva para iPLA<sub>2</sub> que para la cPLA<sub>2</sub> y para sPLA<sub>2</sub>; de esta manera es comúnmente usada para inhibir a la iPLA<sub>2</sub> en sistemas celulares. [28]

BEL está usualmente presente como un racemato, que tienen diferentes propiedades inhibitorias en la enzima.

(S)-BEL inhibe a iPLA<sub>2</sub> $\beta$  10 veces más que el (R)-BEL, sin embargo, el (R)-BEL inhibe a iPLA<sub>2</sub> $\gamma$  10 veces más que (S)-BEL.

BEL inactiva a iPLA<sub>2</sub> por la generación de un cetoácido bromometilo que alquila tioles de CYS, en lugar de actuar con la SER del sitio activo. [28]

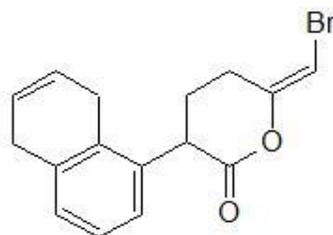


Figura 15. Estructura de Bromoenol lactona (PLAC3)

## FLUOROCETONAS Y FLUOROFOSFATOS

Las polifluorocetonas se diseñaron con base al aumento de la reactividad del grupo carbonilo mediante la introducción de átomos de flúor adicionales en las posiciones  $\alpha$  o  $\beta$ . El efecto inductivo de los átomos de flúor adicionales puede aumentar la reactividad carbonílica frente a nucleófilos, tal como el grupo hidroxilo de la serina del sitio activo en GIVA cPLA<sub>2</sub> y GVIA iPLA<sub>2</sub>. [41]

La pentafluoroetilcetona FKGK11 (PLAC4) es un inhibidor selectivo ya que presenta una alta actividad sobre la iPLA<sub>2</sub>. [28]

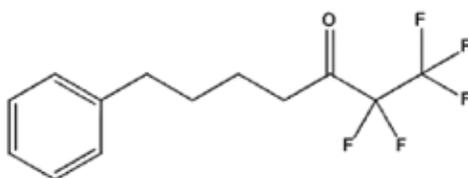


Figura 16. Estructura de Pentafluoroetilcetona FKGK11" (PLAC4)

## INHIBIDORES AMIDAS

Una variedad de amidas basadas en aminoácidos no naturales han sido reportadas como inhibidores de la sPLA<sub>2</sub>. La amida GK115 basada en Norleucina (*R*)- $\gamma$ , es un inhibidor selectivo para la sPLA<sub>2</sub>, ya que no tiene una inhibición significativa entre la cPLA<sub>2</sub> o iPLA<sub>2</sub>. Es interesante saber que su enantiómero es inactivo contra las tres PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>, iPLA<sub>2</sub> y cPLA<sub>2</sub>) [28].

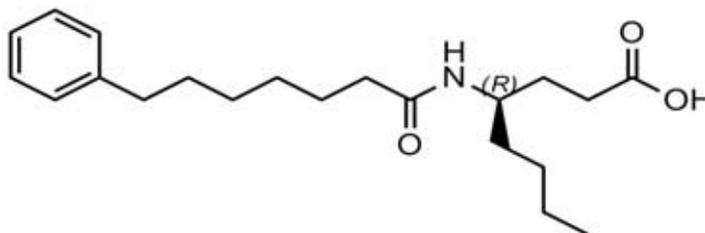


Figura 17. Estructura de GK115 (PLAC6)

## INHIBIDORES BASE PIRROLIDINA

Una serie de inhibidores basados en la pirrolidina de bajo peso molecular, han sido selectivos para la inhibición de la cPLA<sub>2</sub>, tal es el caso del pirroxifeno (PLAC8). En cultivos celulares suprime la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de PGE<sub>2</sub> células THP-1 estimuladas [28, 42].

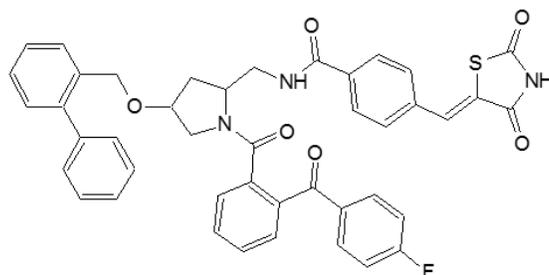


Figura 18. Estructura de Pirroxifeno (PLAC8)

## PRODUCTOS NATURALES

Manoalido (PLAC5) es un producto natural aislado de una esponja *Luffariella viribilis*, siendo el primer inhibidor de sPLA<sub>2</sub> de veneno de cobra. [28]

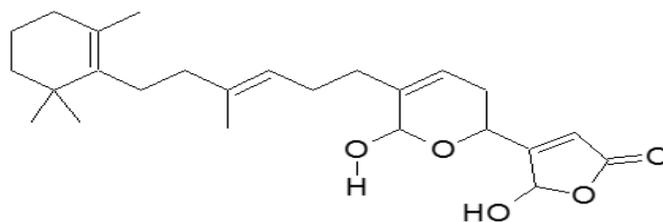


Figura 19. Estructura de Manoalido.

## JUSTIFICACIÓN

En México y en el mundo las enfermedades crónicas como cáncer, obesidad, Alzheimer y diabetes, están asociadas a diversas causas que han incrementado el número de defunciones. En dichas enfermedades se involucra la vía de señalización de la fosfolipasas  $A_2$  principalmente en la generación de metabolitos como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, que son importantes en el desarrollo de la enfermedad. .

Es por ello que este trabajo se enfoca en realizar un estudio *in silico* a partir de algunos inhibidores sintéticos y naturales ya conocidos, con el fin de determinar la selectividad para cada una de las fosfolipasas  $A_2$ , además de evaluar el compuesto ácido 5-[[2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico como posible inhibidor de la fosfolipasa secretora.

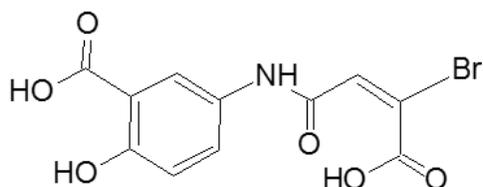


Figura 20. Estructura de C1.

El ácido 5-[[2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico es un derivado del ácido 5-aminosalicílico que contiene bromo en su estructura. Este compuesto ha demostrado efecto antiinflamatorio a través de un modelo de inducción de edema en la oreja de ratón utilizando el acetato de tetradecanoilforbo-13-ilo (TPA). Sin embargo, presenta poco efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en relación con la indometacina, evaluado por el método de oxidación de *O*-dianisidina en presencia de peróxido de hidrógeno.

Se ha reportado que la MPO se encuentra relacionada en varios procesos patológicos y está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas (generales o locales), las enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide) y la isquemia/reperfusión [42].

El ácido 5-{{(2e)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil}amino}-2-hidroxibenzoico fue sintetizado y caracterizado en el Laboratorio de Investigación de Biofísica y Biocatálisis de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Investigadora Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández y la Investigadora Dra. Jessica Mendieta Wejebe **[43]**.

## **HIPÓTESIS**

Sí el ácido 5-{{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil}amino}-2-hidroxibenzoico tiene un efecto inhibitorio de la mieloperoxidasa, una enzima presente en el proceso inflamatorio, entonces será capaz de inhibir la acción de la PLA<sub>2</sub>.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Llevar a cabo el estudio *in silico* de los inhibidores conocidos y del compuesto ácido 5-[[{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico con cada una de las PLA<sub>2</sub>, para evaluar su posible uso como inhibidor de la fosfolipasa secretora humana

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los números de identificación de la base de datos Protein Data Bank (PDB ID) de cada una de las fosfolipasas: fosfolipasa Secretora (sPLA<sub>2</sub>), fosfolipasa Citosólica (cPLA<sub>2</sub>) y fosfolipasa Independiente de Calcio (iPLA<sub>2</sub>).
- Identificar las características químicas del o los inhibidores para cada una de las PLA<sub>2</sub>
- Realizar estudios de acoplamiento molecular ligando-proteína dirigido (Docking) de los 16 inhibidores sintéticos y naturales conocidos, con cada una de las fosfolipasas.
- Evaluar la energía de acoplamiento y las interacciones químicas entre la proteína y el ligando ácido 5-[[{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico con cada una de las fosfolipasas.
- Determinar *in silico*, si el compuesto 5-[[{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico interacciona con los residuos del sitio activo de la fosfolipasa secretora.
- Determinar si el compuesto propuesto inhibe *in vitro* a la fosfolipasa A<sub>2</sub> empleando un kit comercial.

## METODOLOGÍA

### ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS

Las estructuras de los ligandos para la interacción con cada una de las fosfolipasas fueron tomadas en consideración debido a la existencia de estudios que demuestran que estos compuestos son inhibidores de las PLA<sub>2</sub>, siendo estos selectivos para cada una de las 3 fosfolipasas a estudiar, **Tabla 1 [17]**.

*Tabla 1 Inhibidores selectivos para cada una de las fosfolipasas*

LIGANDOS				
NOMENCLATURA	NOMBRE	CARACTERÍSTICA		
		SELECTIVO		
		c PLA <sub>2</sub>	s PLA <sub>2</sub>	iPLA <sub>2</sub> β
PLAC1	Ax048	Selectivo		
PLAC2	Ax059	Selectivo		
PLAC3	Bromoenoil Lactona			Selectivo
PLAC4	Pentaflurometilcetona Fkgk11			Selectivo
PLAC5	Manoalido		Selectivo	
PLAC6	Norlecucina Gk115		Selectivo	
PLAC7	2-Oxoamida	Selectivo		
PLAC8	Pirroxi-fenona	Selectivo		
PLAC9	1,1,1,3-Tetrafluro-7- fenilheptan-2-ona			Selectivo
PLAC10	GK126		Selectivo	

Por otro lado, tomando en cuenta que durante la síntesis de eicosanoides se involucran enzimas como PLA<sub>2</sub> y otras como la ciclooxygenasa (COX), en este estudio se ha propuesto incluir compuestos que han sido diseñados y evaluados

como inhibidores de COX, para evaluar si éstos actúan como inhibidores de PLA<sub>2</sub>. Debido a los resultados de un estudio *ex vivo*, en el cual el compuesto PLAC15 tiene efecto antiinflamatorio como la indometacina e inhibe ligeramente a MPO, este PLAC15 se incluye en este estudio para conocer si tiene actividad como antiinflamatorio al actuar sobre PLA<sub>2</sub>. Además, se incluye a la indometacina, que se ha reportado como inhibidor de las fosfolipasas A<sub>2</sub>.

*Tabla 2 Compuestos propuestos*

LIGANDOS		
NOMENCLATURA	NOMBRE	CÓDIGO
PLAC11	2-(4-Bromofenil)-1-(4-nitrofenil) benzimidazol	AJ
PLAC12	1-(4-Aminofenil)-2-(4-bromofenil)benzimidazol	DJ
PLAC13	1,2-Bis(4-bromofenil)benzimidazol	EJ
PLAC14	2-(4-Bromofenil)-1-(4-hidroxifenil)benzimidazol	FJ
PLAC15	Ácido 5-[[{(2E)-3-bromo-3-carboxyprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico	C1
PLAC16	Indometacina	IND

## ACOPLAMIENTO MOLECULAR

### PREPARACIÓN DE LOS LIGANDOS

La estructura de los compuestos se realizaron en 2-D mediante el software ACD/ChemSketch 14.01. [29] Posteriormente se les agregó hidrógenos y se realizó una pre-optimización geométrica en 3D, en donde las estructuras fueron guardadas

en formato \*.mol. A través de la interfaz gráfica GaussView 5.0.9 [30] fue generada la matriz Z para cada molécula, tomando como archivos de entrada las moléculas ya guardadas en formato .mol, donde los archivos de salida fueron salvados en formato \*.gjf. Posteriormente dichas estructuras y sus respectivas matrices Z, fueron sometidas a una optimización geométrica y energética mediante el método semi empírico AM1 (Austin Model 1) utilizando el programa de GAUSSIAN 09W 9.5, los archivos obtenidos se guardaron en formato \*.out, y mediante el visualizador GaussView 5.0.9 fueron convertidos a un formato en 3-D con extensión \*.pdb, y fueron utilizados para la posterior simulación mediante acoplamiento molecular.

## PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

### SELECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para la selección de las proteínas, se llevó a cabo la búsqueda de dichas proteínas cristalizadas utilizando la base de datos Protein Data Bank [31], de la que se obtuvieron los datos de la cPLA<sub>2</sub> ( $\alpha$ ) con un código PDB 1CJY, así como los datos de la sPLA<sub>2</sub> IIA (pla2g2a), PDB 1DB4, como se muestra en la Figura 21.

Una vez obtenido el PDB de las proteínas, también obtuvo el formato FASTA, que es un formato informático basado en texto que se utiliza para representar las secuencias de aminoácidos; gracias a este formato, es posible seleccionar la cadena o los aminoácidos de interés.

Respecto cPLA<sub>2</sub> ( $\alpha$ ), solo se trabajó con la cadena A, ya que contiene el sitio catalítico, que corresponde a los aminoácidos S228, D549 y R200, que posteriormente apoyaron al estudio de acoplamiento molecular dirigido hacia este sitio.

Finalmente, para trabajar la iPLA<sub>2</sub> ( $\beta$ ), que no tiene un cristal, se utilizó el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para la búsqueda de la secuencia de dicha proteína, que contiene 752 aminoácidos con un peso molecular de 88/85 kDa, cuyo código de acceso es NP\_001004426.1, del cual solo se pudo obtener su secuencia FASTA.

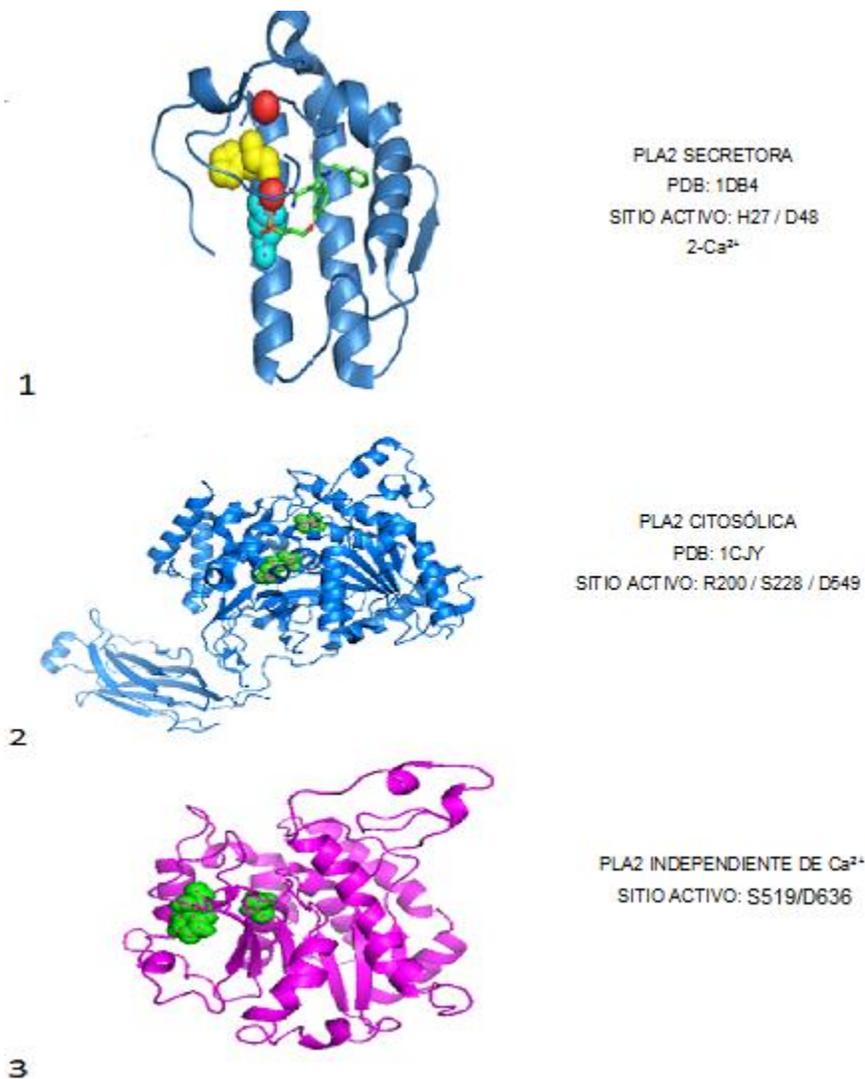


Figura 21. Fosfolipasa humana A<sub>2</sub> secretora PDB 1DB4 [18]), donde en color rojo se observan 2 moléculas de Ca<sup>2+</sup> y en color amarillo, se muestra el residuo del sitio activo H27 y color magenta el residuo D48/ (1) Fosfolipasa humana A<sub>2</sub> citosólica PDB 1CJY [16] en donde se puede observar de color azul, la cadena A de la proteína, y en color verde se observan los residuos del sitio activo, que son R200, S228 y D54. (3) Fosfolipasa independiente de calcio [32] Se observa de color verde los residuos del sitio activo que son S45 y D160.

Sin embargo, ya existe un estudio que establece la unión de un ligando, que es conocido como PHFK, en el dominio catalítico de la iPLA<sub>2</sub> (β), así como las condiciones de dicha interacción, así que para nuestro estudio, se nos proporcionó el PDB de la fosfolipasa [32], con el fin de realizar de mejor manera el acoplamiento molecular y obtener mejores resultados.

Así, se llevó a cabo un alineamiento de la secuencia FASTA de la iPLA<sub>2</sub> ( $\beta$ ) con la secuencia de aminoácidos del PDB proporcionado (Figura 22) [33].

Como se puede observar, el alineamiento comienza a partir del aminoácido P475, esto se deberá tener muy en cuenta, ya que al analizar los resultados del acoplamiento molecular, se tendrá una numeración diferente que deberemos relacionar con la numeración de los residuos de la iPLA<sub>2</sub> ( $\beta$ ).

## **ANÁLISIS POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LOS LIGANDOS SELECCIONADOS Y CADA DE UNA DE LAS PROTEÍNAS**

Los estudios de unión de los ligandos (inhibidores) con las fosfolipasas, se realizaron con el programa AutoDock4.2 en una plataforma Linux. De manera general, el procedimiento consiste en preparar los archivos de entrada a partir de las estructuras ya optimizadas de los ligandos, así como la estructura de la macromolécula, que en este caso son las PLA<sub>2</sub>.

Como ya se ha mencionado, solo para 2 de las 3 fosfolipasas que fueron utilizadas para el acoplamiento molecular, se obtuvieron del PDB y respecto a la iPLA<sub>2</sub> ( $\beta$ ), ésta se nos proporcionó, en formato PDB, por Hsu YH, Bucher D., y colaboradores. Una vez obtenidos los formatos PDB de las tres PLA<sub>2</sub>, a cada una se le adicionaron átomos de hidrógeno polares, además de cargas parciales y parámetros de solvatación, esto con ayuda del programa AutoDockTools 1.5.6 [34] con la finalidad de evaluar la contribución electrostática en el reconocimiento; además, se calcularon las cargas parciales de Kollman. Estas modificaciones realizadas en el PDB se guardaron en archivos con extensión \*.pdbqt.

EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	1	MOFFGRLVNTYFSGVTLNLFSPNPFVKEVAVADYTSSEDRVREKQQLILFQNT	50
EMBOSS_		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	51	PNRTWDCVVLNPRNSQSGFRLFOLELEADALVNFHQYSSOLLPFYESSPO	100
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	101	VLNTEVLQHLTDLIRNHPSWSVAHLAVELGIRECFHNSRIISCANCAENE	150
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	151	EGCTPLHLACRXKGDGEILVELVQYCHTQMDVTDYKGETVVFHYAVQGDNSQ	200
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	201	VLQLLGRNAVAGLNCVNNQGLTFLHLACOLGKCEMVRVLLLCNARCNIHG	250
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	251	PNGYPINSAMKFSQKGCACEMIISMDSSQIHSKDPYVAGASPLHWAKNAEMA	300
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	301	RMLLKRGCNVNSTSSAGNTALHVAVMRNRFDCAIVLLTHGANADARGKNG	350
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	351	NTPLHLAMSKDNVEMIKALIVFGAEVDTPNDFGETPTFLASKIGRLVTRK	400
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	401	AILTLRLTVGAEYCFPPINGVPAEQGSAAPHHPFSLERAQPPPISLNNLE	450
EMBOSS_001		1	-----	0
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	451	LQDLNHSRARKPAFILGSMRDEKRDHLLCLDGGGVKGLIIIQLLIAI	500
EMBOSS_001		1	-----RDHLLCLDGGGVKGLIIIQLLIAI	26
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	501	EKASGVATKDLFDWVAGTSSGGILALAILHNSKSNMAYMRGMVFRMKDEVFR	550
EMBOSS_001		27	EKASGVATKDLFDWVAGTSSGGILALAILHNSKSNMAYMRGMVFRMKDEVFR	75
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	551	GSRPYESGPLEEFLKREFGENTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFR	600
EMBOSS_001		76	GSRPYESGPLEEFLKREFGENTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFR	125
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	601	NYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLVWRAARSSGAAPTYFRPNGRF	650
EMBOSS_001		126	NYDA-----PPAQPSDQLVWRAARSSGAAPTYFRPNGRF	159
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	651	LDGGLANNPTLDAMTEIHEYNOGLIRKGOANKVKKLSIVVSLGTGRSPQ	700
EMBOSS_001		140	LDGGLANNPTLDAMTEIHEYNOGLIRKGOANKVKKLSIVVSLGTGRSPQ	209
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	701	VPVICVDVFRPSNFWELAKTVFGAKELGKMVVDCCCTDPDGRAVDRARAWC	750
EMBOSS_001		210	VPVICVDVFRPSNFWELAKTVFGAKELGKMVVDCCCTDPDGRAVDRARAWC	259
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	751	EMVGIQYFRLNPQLGTDIMLDEVSDTVLVNALWETEYVIYEHREEFQKLI	800
EMBOSS_001		260	EMVGIQYFRLNPQLGTDIMLDEVSDTVLVNALWETEYVIYEHREEFQKLI	309
EMBOSS	iPLA <sub>2</sub> (β)	801	QLLLP	804
EMBOSS_001		310	QLLL-	313

Figura 22. Alineamiento de la secuencia de iPLA<sub>2</sub> (β) y la secuencia de aminoácidos del PDB proporcionado por Yuan-Hao Hsu y colaboradores. Se muestra en rectángulos rojos el inicio y fin de la secuencia proporcionada. En rectángulos azules se muestran los aminoácidos del sitio activo de la proteína, en donde lo reportado es S519 y D652, y en la nueva secuencia corresponden a los aminoácidos S45 y D161.

Una vez obtenidos estos archivos \*.pdbqt, los cuales provienen de las proteínas con sus ligandos, se focaliza esta interacción colocando las coordenadas X Y Z, de un aminoácido implicado en el sitio activo, después de ajustar la caja de Grid a dimensiones 60 x 60 x 60 Å, donde todas estas simulaciones de acoplamiento molecular fueron realizadas utilizando el Algoritmo Genético Lamarckiano, con una población inicial de 100 individuos aleatorizados y con un número máximo de evaluaciones de energía de  $1 \times 10^7$ . Los mapas de afinidad atómica fueron generados para cada archivo \*.pdbqt y por cada átomo encontrado en los ligandos utilizando el programa AutoGrid 4.0, donde esta información fue almacenada en un archivo con extensión \*.gpf, el cual es utilizado por dicho programa para que posteriormente se puedan generar los mapas de afinidad. Estos mapas que se generan, se utilizan por el programa AutoDock 4.2 para determinar la afinidad de los ligandos (inhibidores) por el receptor (PLA<sub>2</sub>), archivo con extensión \*.dlg, donde los complejos formados tridimensionalmente inhibidor-fosfolipasa, se visualizaron y analizaron utilizando el programa AutoDock Tools, considerando las diferentes interacciones formadas en cada complejo, así como los residuos de sitio activo. Algunos parámetros a considerar durante el análisis, son los criterios para la selección de las moléculas; uno de ellos es el valor de delta G ( $\Delta G$  de la disposición espacial en la interacción de las 100 conformaciones con menor energía).

El trabajo computacional fue realizado mediante CUDA con una computadora Linux Intel Core i7-980x 3.33 GHz Linux con 12 GB de RAM, (2x) tarjetas de vídeo NVIDIA Geforce GTX580 y una (1x) tarjeta de vídeo NVIDIA Geforce GTX560.

## **EVALUACIÓN DEL MÉTODO**

Para llevar a cabo la evaluación del método, es decir corroborar que nuestros ligandos se unen al sitio activo, se realizó el acoplamiento molecular dirigido al sitio activo con compuestos ya reportados que cumplen con la característica de ser selectivos para cada una de las proteínas.

## **FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> CITOSÓLICA**

Se llevó a cabo la validación con la proteína cristalizada con código PDB: 1CJY, la cual es solo la apoproteína, es decir, el cristal no tiene algún compuesto o inhibidor unido.

Sin embargo, existe un estudio con dicha proteína que utilizaremos para la validación de nuestro método, en el cual el ligando es una oxoamida (PLAC7) y se encuentra unido en el sitio activo, S228 y D549 [13].

## **FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> SECRETORA**

Para la validación del método para la sPLA<sub>2</sub>, se utilizó la proteína cristalizada con código PDB: 1DB4. Una vez obtenido el archivo, se utilizó un editor de texto para poder generar 2 archivos más, el primero de ellos corresponde a la proteína 1DB4 y el segundo corresponde al ligando que fue el indol. [19]. Una vez obtenidos los archivos se utilizó AutoDock Tools para realizar el acoplamiento molecular.

## **FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> INDEPENDIENTE**

Para el caso de la fosfolipasa iPLA<sub>2</sub>β, se realizó un acoplamiento molecular dirigido con el PDB ya proporcionado [32]. Dicha validación se realizó con el compuesto PLAC9, el cual es un inhibidor que pertenece a una fluorocetona, la 1,1,1,3-tetrafluoro-7-fenilheptan-2-ona (PHFK), que se une en el sitio activo de la proteína con los aminoácidos S519 Y D652 [32].

## **VISUALIZACIÓN DE LAS INTERACCIONES**

Para las visualizaciones de las interacciones se utilizaron los programas: PyMOL y BIOVIA DISCOVERY STUDIO VISUALIZER.

## **ESTUDIO *in vitro*.**

Para realizar el estudio *in vitro*, se utilizó un kit comercial “EnzChek Phospholipase A<sub>2</sub> Assay Kit”, que utiliza como enzima la PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja [35].

Se llevó a cabo un alineamiento de PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja y la PLA<sub>2</sub> humana para saber qué porcentaje tienen de similitud. Para ello se utilizó la base de datos BRENDA [36] para obtener el PDB de la PLA<sub>2</sub> de veneno de abeja (PDB 1POC) [37] y el PDB de la PLA<sub>2</sub> humana (PDB 3U8B) [38].

Una vez obtenidos ambos PDB's se alinearon ambas secuencias mediante BLAST protein-protein de NCBI [39] (Figura 23) y, como se observa, tienen un 45% de identidad, lo cual indica que se tienen una similitud en la función. Por otra parte se tiene un E-value de 0.004, que indica que este alineamiento es significativo y además los genes son homólogos.

Este kit está diseñado para una monitorización continua de la fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) por un método fluorométrico. El sustrato que se utiliza (Red/Green BODIPY PC-A2) es selectivo para PLA<sub>2</sub>, y proporciona una monitorización rápida en tiempo real, ya que es sensible y continua ante la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub> para su análisis rápido, sencillo y directo, al utilizar instrumentos automatizados. Con este ensayo enzimático se puede detectar una señal basada en una detección radiométrica o una detección de la intensidad, con alta sensibilidad y una alta especificidad para PLA<sub>2</sub>.

En nuestro caso se llevó a cabo la medición de la actividad de la PLA<sub>2</sub> a través de la medición de la fluorescencia, usando un lector de microplacas con un rango de excitación de 450-490nm y emisión de fluorescencia aproximadamente de 515nm y 575nm.

Dicho estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad de la fosfolipasa ante su interacción con el ligando PLAC15 para inhibir PLA<sub>2</sub> de abeja por método fluorométrico. Es importante establecer que se utilizó la indometacina como un compuesto de referencia para corroborar que existe una actividad, en este caso una inhibición de la proteína, ya que se ha reportado que la indometacina inhibe la actividad de la PLA<sub>2</sub>, y su IC<sub>50</sub> es de 35 µM.



Figura 23. Alineamiento de las secuencias de PLA2 de humano (Query) y de abeja (sbjct). [39]

Para llevar a cabo dicha evaluación se lleva a cabo la preparación del kit de la PLA<sub>2</sub>, como se muestra en la Tabla 3, con base a sus especificaciones.

Los cálculos y el diagrama general se encuentran en el Anexo 1.

*Tabla 3 Preparación de reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción*

<b>FOSFOLIPASA A2</b>	<b>AGREGAR 80 µL BUFFER 1X</b>		
<i>DOPG</i>	AGREGAR 100 µL ETANOL	Tomar 6 µL	LIPID MIX  SOLUCION MAYOR 18µL + 982 µL  Llevar a 1000 mL
<i>DOPC</i>	AGREGAR 100 µL ETANOL	Tomar 6 µL	
<i>SUSTRATO PLA2 1Mm</i>	AGREGAR 40 µL DMSO	Tomar 6 µL	
<i>SUSTRATO LIPOSOMA</i>	5mL Buffer de reacción 1x PLA <sub>2</sub> + 50 µL LIPID MIX		

*Tabla 4 Secuencia de la adición de los reactivos y sus cantidades en microplaca para PLAC15*

SISTEMAS COMPUESTO PLAC15							
MUESTRA	BUFFER	PLA2	LIPID MIX	Sistemas de diluciones			
				0.1 Mm	1 mM	10 mM	100mM
Control+	48 µL	2 µL	50 µL				
Control -	50 µL		50 µL				
Dilución 1	48 µL	2 µL		50 µL			
Dilución 2	48 µL	2 µL			50 µL		
Dilución 3	48 µL	2 µL				50 µL	
Dilución 4	48 µL	2 µL					50 µL

Incubar 10 min protegido de la luz  
Rango excitacion 450-490 nm emisión 515-575nm

**Tabla 5** Secuencia de la adición de los reactivos y sus cantidades en microplaca para PLAC16

SISTEMAS PLAC16							
MUESTRA	BUFFER	PLA2	LIPID MIX	Sistemas de diluciones			
				0.1 Mm	1 mM	10 mM	100mM
Control +	48 µL	2 µL	50 µL				
Control -	50 µL		50 µL				
Dilución 1	48 µL	2 µL		50 µL			
Dilución 2	48 µL	2 µL			50 µL		
Dilución 3	48 µL	2 µL				50 µL	
Dilución 4	48 µL	2 µL					50 µL

Incubar 10 min protegido de la luz  
Rango exitacion 450-490 nm    emisión 515-575nm

## RESULTADOS

### SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para llevar a cabo la selección de las proteínas, se recurrió a la búsqueda de las secuencias (Figura 24) y para que éstas fueran seleccionadas, se tomó en cuenta que no presentaran mutaciones (Tabla 6).

```
A
>1DB4:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE NLVNFHRMIKLTGKEAALSYGFYGCHCGVGGRGSPKDATDRCCVTHDCCYKRLEKRCGCTKFL
SYKFSNSGSRITCAKQDSCRSQLCECDKAAATCFARNKTTYNNKYYQYYSNKHCRGSTPRC
B
>1CJY:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MSFIDPYQHIIVEHQYSHKFTVWLRATKVTKGAFGDMLDTPDPYVELFISTTPDSRKRTRHFNNDINPWWNETFEFILDPNQENVLEITLMDANYVMDE
TLGTATFTVSSMKVGEKKEVPFIFNQVTEMVLEMSLEVCSCLDLRFSMALCDQEKTFRQQRKEHIRESMKLLGPKNSEGLHSARDVPVVALGSGGG
FRAMVGFSGVMKALYESGILDCAITYVAGLSGSTWYMSLYSHDPFPEKGPPEEINEELMKNVSHNPLLLLPQKVKRYVESLWKKSSGQPVTFTDIFG
MLIGETLIHNRMTTSSLKEKVNTAQCPPLFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPEYIEGMKYGTFMAPDLFGSKFFMGTVVKYEEENPLHFLMGVWG
SAFSILFNRVLGVSGSQSRGSTMEEELENIITKHIVSNDSSDDESHEPKGTENEDAGSDYQSDNQASWIHRMIMALVSDSALFNTREGRAGKVHNF
MLGLNLNTSYPLSPLSDFATQDSFDDDELDAVADPDEFERIEYPLDVKSKIHVVDSGLTFNLPLYLILRPQRGVDLISDFDSARPSDSSPPFKELLAE
KWAKMNLKLPFKIDPYVFDREGLKECYVFKPKNPDMEKDCPTIIHFVLANINFRKYKAPGVPRETEEEKEIADFDIFDDPESPFSTFNQYPNQAFKRLH
DLMHFNTLNNIDVIKEAMVESIEYRRQNPSRCSVLSNVEARRFFNKEFLSKPKA
>1CJY:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
MSFIDPYQHIIVEHQYSHKFTVWLRATKVTKGAFGDMLDTPDPYVELFISTTPDSRKRTRHFNNDINPWWNETFEFILDPNQENVLEITLMDANYVMDE
TLGTATFTVSSMKVGEKKEVPFIFNQVTEMVLEMSLEVCSCLDLRFSMALCDQEKTFRQQRKEHIRESMKLLGPKNSEGLHSARDVPVVALGSGGG
RAMVGFSGVMKALYESGILDCAITYVAGLSGSTWYMSLYSHDPFPEKGPPEEINEELMKNVSHNPLLLLPQKVKRYVESLWKKSSGQPVTFTDIFGM
LIGETLIHNRMTTSSLKEKVNTAQCPPLFTCLHVKPDVSELMFADWVEFSPEYIEGMKYGTFMAPDLFGSKFFMGTVVKYEEENPLHFLMGVWGS
AFSILFNRVLGVSGSQSRGSTMEEELENIITKHIVSNDSSDDESHEPKGTENEDAGSDYQSDNQASWIHRMIMALVSDSALFNTREGRAGKVHNF
MLGLNLNTSYPLSPLSDFATQDSFDDDELDAVADPDEFERIEYPLDVKSKIHVVDSGLTFNLPLYLILRPQRGVDLISDFDSARPSDSSPPFKELLAE
KWAKMNLKLPFKIDPYVFDREGLKECYVFKPKNPDMEKDCPTIIHFVLANINFRKYKAPGVPRETEEEKEIADFDIFDDPESPFSTFNQYPNQAFKRLH
DLMHFNTLNNIDVIKEAMVESIEYRRQNPSRCSVLSNVEARRFFNKEFLSKPKA
C
>NP_001004426.1
MQFFGRLVNTFSGVTNLFNSNPFVKEVAVADYTSSDRVREEGQLILFQNTPNRTWDCVLVNPVNSQSGFRLFQLELEADALVNFHQYSSQLLPHYESS
PQVLHTEVLQHLTDLIRNHPWSVAHLAVELGIRECFHHSRIISCANCAENEEGCTPLHLACRKGDEILVELVQYCHTQMDVTDYKGETVFHYAVQGD
NSQVLQLLGRNAVAGLNQVNNQGLTPLHLACQLGKQEMVRVLLCNARCNIMGPNGYPIHSAMKFSQKGCAMIIISMDSSQIHSKDPRIYGASPLHWA
KNAEMARMLLKRCGNVNSTSSAGNTALHVAVMRNRFDAIVLLTHGANADARGEHNTPLHLAMSKDNVEMIKALIVFGAEVDTPNDFGETPTFLASKI
GRQLQDLMHISRARKPAFILGSMRDEKRTHDHLLCLDGGGVKGLIIQLLIAIEKASGVATKDLFDWAGTSTGGILALAILHKSMMAYMRGMYFRM
KDEVFRGSRPYESGPLEEFLKREFGEHTKMTDVRKPKVMLTGTLSDRQPAELHLFRNYDAPETVREPRFNQNVNLRPPAQPSDQLVWRAARSSGAA
PTYFRPNGRFLDGGLLANNPTLDAMTEIHEYNQDLIRKQGANVKKLSIVVSLGTGRSPQVPVTCVDVFRPSNPWELAKTVFGAKELGKMVDDCCTD
PDGRAVDRARAWCEMVGIQYFRNLNQLGTDIMLDEVSDTVLVNALWETEVIYEHREEFQKLIQLLLSP
```

Figura 24. Secuencia de las proteínas utilizadas para el estudio *in silico*. (A) Corresponde a la PLA<sub>2</sub> secretora H27 y D48 (PLA2G2A) [18]. (B) Corresponde a la PLA<sub>2</sub> citosólica, donde se muestran las 2 cadenas que componen a esta proteína, de las cuales se utilizó solo la cadena A, ya que contiene el sitio catalítico, que corresponde a los aminoácidos S228, D549 y R200 [16]. (C) Corresponde a la secuencia de la PLA<sub>2</sub> independiente de calcio, sin embargo no hay un cristal reportado [32]

*Tabla 6 Secuencias de la PLA<sub>2</sub> humana seleccionadas*

PLA <sub>2</sub>	PDB	NP
PLA <sub>2g2a</sub> SECRETORA	1DB4	
cPLA <sub>2α</sub> CITOSÓLICA	1CJY	001155201
iPLA <sub>2β</sub> INDEPENDIENTE	No hay cristal	001004426.1

## **ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE LOS LIGANDOS SELECCIONADOS Y CADA DE UNA DE LAS PROTEÍNAS**

Antes de realizar el estudio de la interacción de cada una de las fosfolipasas con los 16 ligandos ya mencionados en las Tablas 1 y 2, se hizo la validación del método.

### **VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

Para saber que los parámetros utilizados en el acoplamiento molecular son adecuados, se llevó a cabo la validación de la interacción del ligando de referencia con cada una de las proteínas.

### **FOSFOLIPASA CITOSÓLICA**

Para llevar a cabo el método de validación de cPLA<sub>2</sub> se hizo un acoplamiento molecular de la proteína nativa 1CJY con un compuesto ya conocido PLAC9, con el fin de demostrar que nuestro método es similar a los estudios que ya existen de esta proteína.

Cabe destacar que para hacer el acoplamiento molecular, no se utilizó la proteína cristalizada que tuviera un ligando y con ello verificar que se tiene una unión similar.

Es por eso que la validación se hizo empleando un compuesto con el que ya ha sido reportada su interacción en el sitio activo de la enzima por métodos *in silico*.

Como se puede ver en la Figura 24 de lado izquierdo, el compuesto 2-oxoamida interactúa con los 3 residuos de aminoácidos del sitio activo R200, S228 y D549. Sin embargo, este complejo proteína-ligando fue generado por una simulación de dinámica molecular, lo cual es importante tener en cuenta, ya que puede ser que en este estudio no se tengan las mismas interacciones debido a que no se realizó dinámica molecular, en donde la proteína adquiere diferentes conformaciones [13], de tal modo, que al hacer el acoplamiento molecular, como se observa en la figura 25 de lado derecho, sí existe una unión a los 3 residuos de aminoácidos del sitio activo, pero no se observó la misma orientación de los aminoácidos.

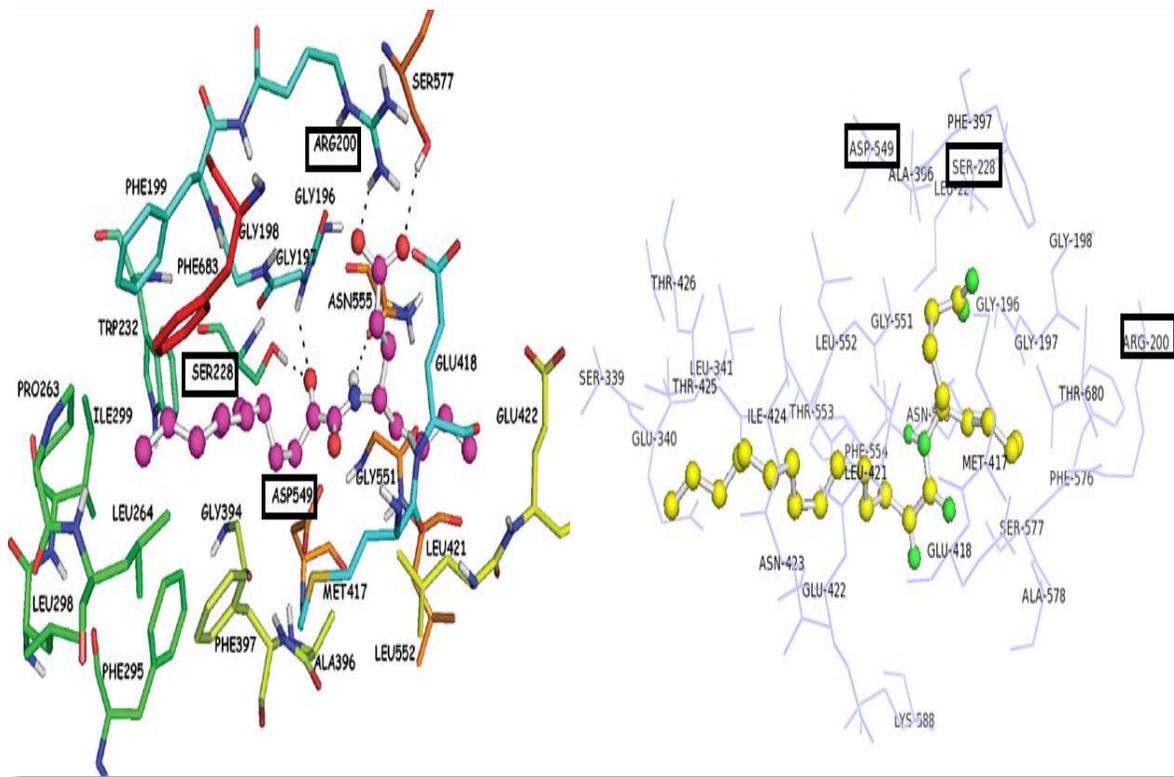


Figura 25 Caracterización de la unión del compuesto 2-OXOMAIDA (PLAC9) al sitio activo de la cPLA2 mediante Docking. Se muestran los residuos de aminoácidos a 5 Å de distancia. (a) Caracterización de unión al sitio catalítico de la cPLA2 [13] (b) Caracterización de unión al sitio catalítico por Docking dirigido a S228, utilizando una Grid Box 60 x 60 x 60 y coordenadas X: 39.748 Y: -10.870 Z: 53.396

## FOSFOLIPASA SECRETORA

Para la validación del método con la sPLA<sub>2</sub>, se utilizó una proteína cristalizada con el compuesto ácido 3-[3-(2-amino-2-oxoetil)-1-benzil-2-metillindol-5-il]oxipropil fosfónico, código PDB: 8IN (Figura 26) con el cual se pudo corroborar que nuestro acoplamiento molecular proporciona resultados similares.

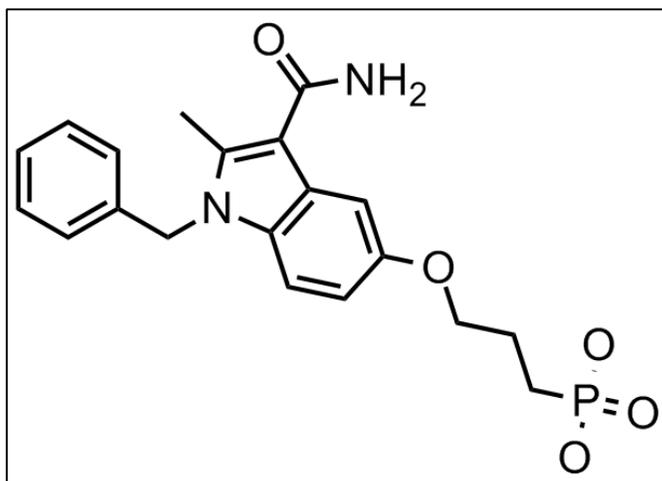


Figura 26 Estructura 8IN.

Como se puede ver en la Figura 27, los dos ligandos que se observan tienen una conformación estructural similar a tal grado que se sobreponen, lo que nos indica que la manera en que se llevó a cabo el acoplamiento de esta proteína, con los 16 compuestos, nos arroja resultados válidos, ya que todos tienen las mismas condiciones, es decir, que se hizo un acoplamiento molecular focalizado al residuo D48 y utilizando una Grid Box de 60 x 60 x 60.

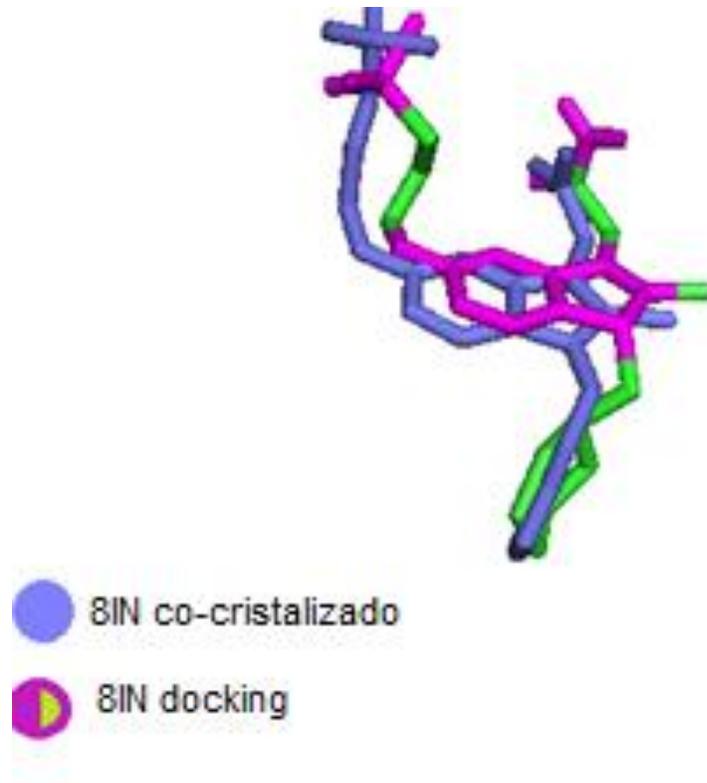


Figura 27. Conformación del compuesto 8IN código PDB 8IN, en la proteína sPLA<sub>2</sub>: 8IN cristalizado con la proteína 1DB4 y la obtenida por acoplamiento molecular

## FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE DE CALCIO

Finalmente, para la validación de la iPLA<sub>2</sub>, se utilizó el compuesto PLAC9, que es un ligando que pertenece a los inhibidores de fluorocetona (FK), los cuales fueron diseñados para reconocer el sitio activo SER y también son activos contra cPLA<sub>2</sub>.

Sin embargo, se ha demostrado que los inhibidores FK son selectivos para iPLA<sub>2</sub> frente a cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>, tras una modificación del grupo fluorocetona y la adición de un residuo terminal hidrofóbico, conectado por una cadena media de carbono, simulando una cadena de ácido graso.

Como se puede ver en la Figura 28, al llevar a cabo el acoplamiento molecular dirigido con la iPLA<sub>2</sub>, se puede ver que se reproduce de manera similar a lo que ya había sido estudiado [32], en donde se ha establecido que el grupo carbonilo del PLAC9 forma interacciones favorables con los grupos amida de G486 y G487;

además, se crea un “sitio fluorófilico” por K489, N658 y K729, mientras el carbono alifático de la cadena está estabilizado por un estrecho túnel hidrofóbico formado por los residuos T520, F549 y L770. El anillo del grupo fenilo forma un contacto hidrofóbico con los residuos M544, V548, F549 y L560.

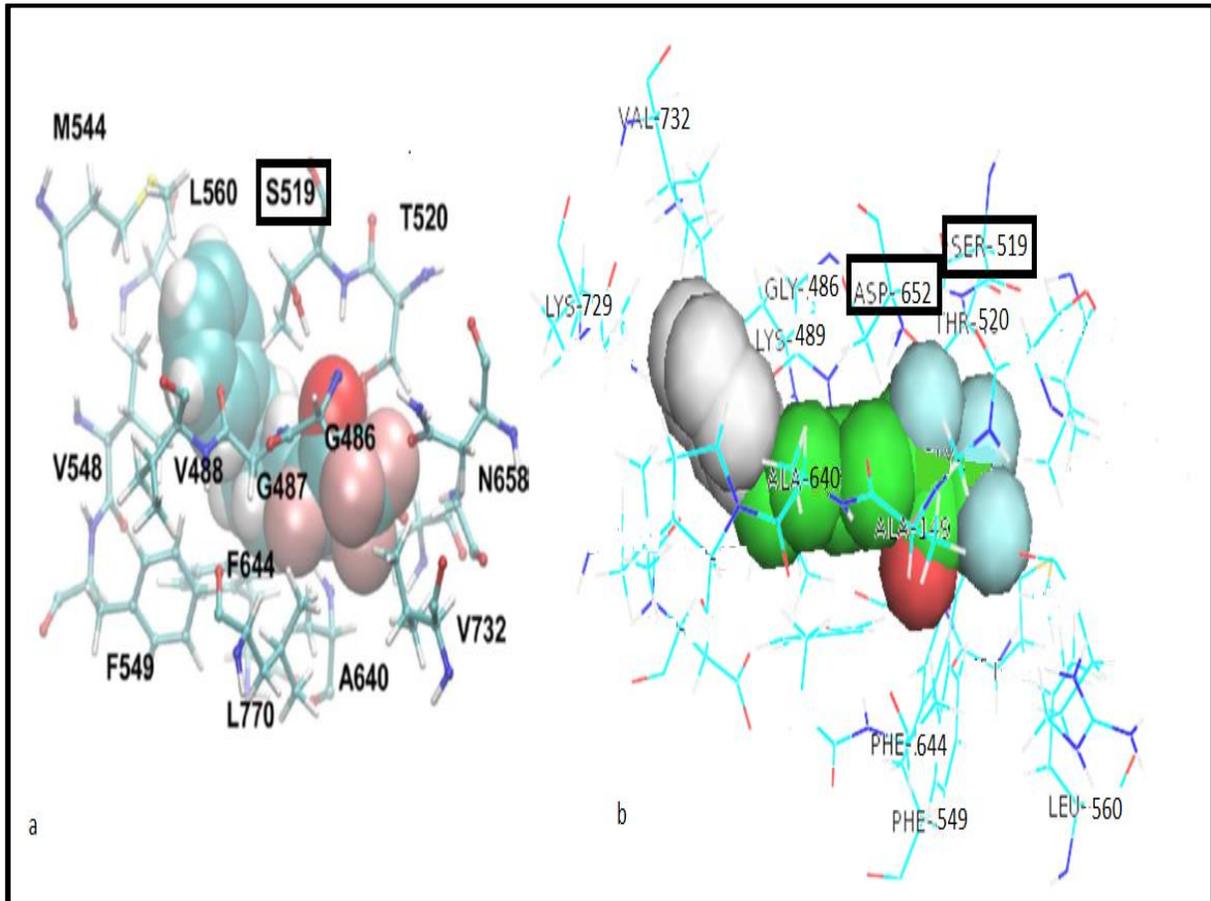


Figura 28 Caracterización de la unión del compuesto PHFK (PLAC9) al sitio activo de la iPLA2 mediante Docking. Se muestran los residuos de 5 Å de radio. (a) Caracterización de unión al sitio catalítico de la iPLA2 [32]. (b) Caracterización de unión al sitio catalítico por acoplamiento molecular dirigido a S519, utilizando una Grid Box 60 x 60 x 60 y coordenadas X: 39.543 Y: 32.950 Z: 39.020

## ACOPLAMIENTO MOLECULAR

### FOSFOLIPASA SECRETORA

Para el caso de la fosfolipasa sPLA<sub>2</sub>, en el cristal utilizado se conservaron las moléculas de H<sub>2</sub>O para llevar a cabo el acoplamiento molecular. Está reportado que los compuestos PLAC5, PLAC6 y PLAC10 son inhibidores selectivos. Como se puede observar en la Tabla 7, estos compuestos tienen un  $\Delta G$  de -11.41, -9.47 y -9.31 Kcal/mol, respectivamente, además interactúan con los 2 aminoácidos del sitio activo H27/D48.

A pesar de que todos los compuestos evaluados interactúan con H27 y D48, no todos tuvieron valores de  $\Delta G$  favorables, por lo que las interacciones en el sitio activo de la sPLA<sub>2</sub> también fue explorado para los ligandos PLAC13 y PLAC16, ya que éstos tuvieron un  $\Delta G$  entre -9.31 y -11.41 Kcal/mol, respectivamente.

Por otro lado, el compuesto PLAC15, ácido 5- $\{[(2E)-3\text{-bromo-3-carboxiprop-2-enoil}]\text{amino}\}$ -2-hidroxibenzoico, el cual se ha propuesto en este trabajo como posible inhibidor de esta enzima en específico, muestra un  $\Delta G$  de -8.52 Kcal/mol; debido a esto, también fue incluido en el análisis de las interacciones.

Tabla 7 Interacciones de los ligandos de sPLA<sub>2</sub>

COMPUESTO	$\Delta G^*$ Kcal/mol	RESIDUOS 5 A **
PLAC1	-7.24	F48 Y21 G22 C44 C28 H27 G29 Ca 128 G32 G31 V30 F5 L2 D48 H47 Y51 K52 K62 A17 A18 A94 I9 H6
PLAC2	-8.8	F48 Y21 G22 C44 C28 H27 G29 Ca 128 H47 V30 D48 G31 Y51 A17 A18 I9 H6 F5 V3 L2 K62
PLAC3	-9.12	F48 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 Ca128 V30 D48 Y51 H47 A17 A18 I9 F5 L2K62
PLAC4	-6.3	F48 I9 F5 L2 Y51 K62 A17 H47 Y21 A18 C44 D48 G22 C28 G29 Ca198 V30 H27 G31
PLAC5	-11.41	F48 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 Ca128 G31 V30 D48 Y51 H47 A17 A18 I9 F5 L2 K52 V3 H6 K62
PLAC6	-9.47	A17 F98 A18 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 CA128 V30 D48 G32 G31 Y51 I9 F5 L2 K62
PLAC7	-7.47	F98 Y21 G22 C28 C43 C28 C44 H27 A94 G29 Ca198 H47 D48 V30 Y51 A17 A18 I8 I9 H6 F5 L2
PLAC8	-8.55	F98 Y21 G22 C28 H27 G32G31 G29 Ca198 V30 D48 H47 Y51 K52 E55 K62 L2 F5 H6 A18 A17 I9
PLAC9	-6.29	F98 Y21 G22 C43 C28 C44 G29 H27 Ca198 V30 G31 D48 H47 Y51 A17 A18 A94 I9 F5 L2
PLAC10	-9.31	G31 H27 V30 Ca198 C28 G29 C44 G22 Y21 A17 H6 L2 F5 V3 D48
PLAC11	-9.71	F98 C43 C48 C44 H27 H47 Ca198 D48 G31 Y51 K52 E55 C28 G29 V30 F5 L2 K62
PLAC12	-9.08	F98 C43 C44 H27 H47 D48 Y51 K52 C28 Ca198 V30 G31 G29 C28 Y21
PLAC13	-9.37	E55 K52 Y51 H47 D48 K62 F5 C44 L2 F98 Ca198 V30 G31 H27 G29 C28 Y21
PLAC14	-8.7	F98 Y21 C28 C44 H27 G29 H47 Ca198 V30 D48 G31 K52 Y51 E55 F5 L2 K62
PLAC15	-8.52	F98 Y21 G22 C28 C44 G29 H47 H27 Ca198 V30 D48 G32 G31 Y51 I9 F5 L2 K62
PLAC16	-9.49	F98 I9 A17 Y21 A18 G22 F23 C44 C28 H27 G29 Ca198 V30 G31 F5 H47 L2 D48 Y51 K52 K62

\* $\Delta G$  del primer conformero ligando-proteína (PDB 1DB4).

\*\*Unión con residuos del sitio activo de la proteína. Obtenidos con el programa PyMOL [40]

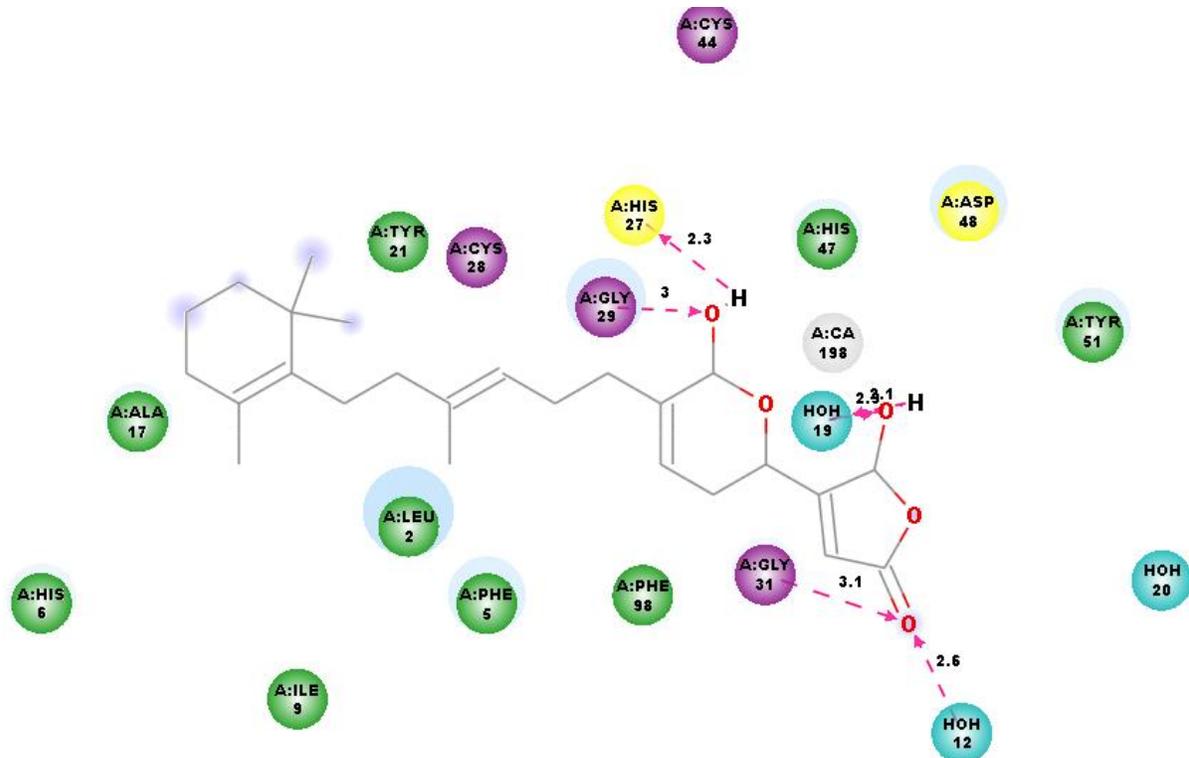


Figura 29. Interacción del compuesto selectivo PLAC5, *manoalido* con la *sPLA*<sub>2</sub>, el cual tiene un  $\Delta G$  de -11.41. Se muestra la estructura de la Norleucina de color negro. Se encuentran los residuos del sitio activo de color amarillo, His 27 y Asp 48. De color rosa se muestran las interacciones  $\pi$  ( $Pi$ ) y sus distancias en Å [41].

El compuesto PLAC5 (Figura 29) es selectivo para esta fosfolipasa, y tiene el mejor valor de  $\Delta G$  de -11.41kcal/mol, en comparación con el resto de los compuestos analizados e interactúa con los residuos del sitio activo de la proteína.

## FOSFOLIPASA CITOSÓLICA

Para el caso de la *cPLA*<sub>2</sub>, los compuestos que se han reportado y que son selectivos e inhiben la acción de la *cPLA*<sub>2</sub>, son PLAC1, PLAC2, PLAC7 y PLAC8.

Sin embargo, como se observa en la Tabla 8, respecto a estos compuestos selectivos, el que tiene mejor valor de  $\Delta G$  es el PLAC8, pero no interactúa con ninguno de los residuos del sitio activo (Figura 30)

Por otro lado, el compuesto selectivo PLAC7 que también es selectivo (Figura 31) tiene un  $\Delta G$  de -5.34kcal/mol, interactúa con los 3 residuos del sitio activo: S228 R200 D549. Este compuesto se utilizó para la validación del método, sabiendo que éste es un compuesto selectivo ya estudiado.

Cabe destacar que los resultados que se presentan en la Tabla 8, son obtenidos por PyMOL Molecular Visualization [40] y pueden ser un poco diferentes a los obtenidos con el visualizador Discovery Studio [41]

Tabla 8 Interacciones de los ligandos de cPLA<sub>2</sub>

COMPUESTO	$\Delta G^*$ Kcal/mol	RESIDUOS 5 <sup>a</sup>
PLAC1	-5.31	L592 K588 E589 F554 T553 M342 E340 L341 N555 G551 L552 E422 D549 L421 I424 A396 F397 S577 F576 A578 G196 G197 S228 E418 M417 G198 T680 R200
PLAC2	-5.66	G196 N555 G197 R200 F576 S577 T680 E589 A578 G551 F554 L592 M417 G418 L552 T553 L421 E422 L341 I424 N423 T426 E34 T425 S339
PLAC3	-7.21	E478 T416 F681 T680 S679 F678 F671 S676 A578 R579 P580
PLAC4	-4.75	L227 S228 D549 S550 F397 A396 G196 G198 G551 L552 R200 G197 N555 F576 T680 S577 E589 A278 0417 E418 K588 L421
PLAC5	-7.64	N687 F690 Q688 A689 R692 P686 Y685 Q684 F683 N262 L264 F678 P677 N682 S679 S676 F681 V404 L405 E675
PLAC6	-5.97	L421 L492 G229 S228 D549 R200 S550 G196 G198 G197 F576 F397 A396 G551 N555 T680 S577 A578 R579 P580 M417 E418 L552L421
PLAC7	-5.34	L227 S228 G198 G196 R200 G197 F576 T680 N555 S577 A578 K588 D549 F397 A396 G551 F554 M417 E418 L552 T553 L421 E422 N423 I424 L341 T426 T425 E340 S339
PLAC8	-9.52	R692 Q688 A689 N262 F683 Q684 L264 F678 P677 I670 S676 F671 F668 D669 T416 S415 E675 D673 D672 P674 N682 S679 R579 F681 V404 L405 M417 R403
PLAC9	-4.94	L227 S228 G196 G198 G197 T680 E589 R200 F576 S777 A578 N555 F397 G551 F554 M417 E418 A396 L552 T553 L421
PLAC10	-5.28	L227 S228 D549 A396 F397 G196 G198 G197 R200 T680 F576 S777 A578 G551 N555 L552 T553 F554 L341 E340 I424 L592 M417 E418 E589 L421 E422
PLAC11	-6.83	R403 V404 L264 F681 N682 F683 Q684 P677 S676
PLAC12	-6.82	F683 F678 L284 P677 N262 S276 Q684 S679 N682 E675 F681 P674 V404 S415 R403
PLAC13	-7.02	P263 P677 L264 S679 N262 S676 F683 Q684 E675 N682 S415 F681 V404 L405 R403
PLAC14	-6.94	P263 P677 N262 L264 Q684 F683 L405 V404 N682 R403 F681 F678 S679 S676 E675 P674 S415
PLAC15	-5.43	R403 T416 S415 V404 L405 F681 T680 S679 N682 F683 Q684 N262 L264 P263
PLAC16	-6.64	S228 D549 S195 G196 G198 R200 G197 N555 G551 F397 A396 S577 F576 T680 L552 A578 M417 E418 L421 K588 E419 E422

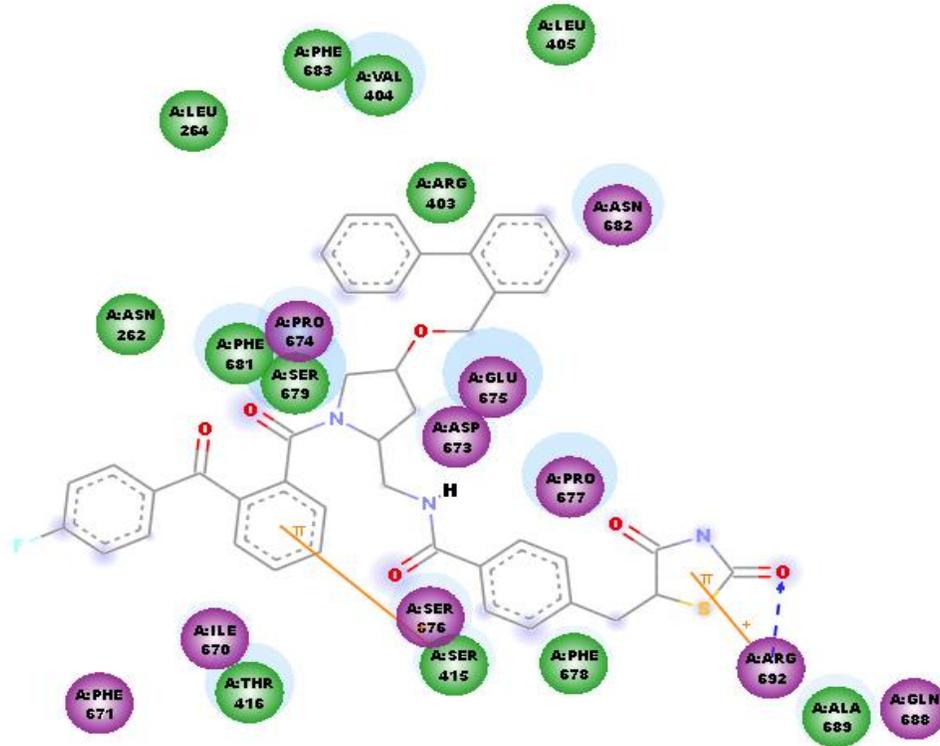


Figura 30. Interacción con el compuesto reversible PLAC8 con la cPLA<sub>2</sub>, con un  $\Delta G$  de -9.52kcal/mol. Se observa la estructura del compuesto en color gris y en esferas de color verde y lila los residuos de la proteína. [41]

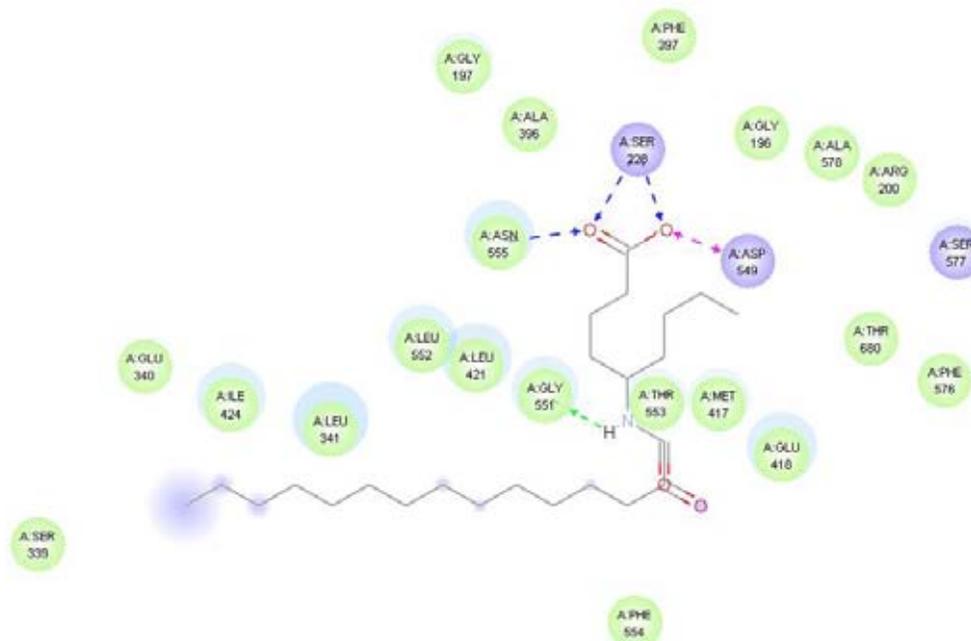


Figura 31. Interacción con el compuesto selectivo PLAC7 2-oxoamida con la cPLA<sub>2</sub>, el cual tiene un  $\Delta G$  de -5.34 Kcal/mol. Se observa la estructura del compuesto en color gris y en esferas de color verde se muestran los residuos de la proteína con los que interactúa el compuesto. Se observa una esfera de color violeta, los residuos del sitio activo con el cual se encuentra interaccionando el compuesto. [41]

## **FOSFOLIPASA INDEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$**

Finalmente, para el caso de la iPLA<sub>2</sub> se tienen 3 compuestos selectivos que son PLAC3 (Bromoenol lactona), el cual tiene un  $\Delta G$  de -4.34 kcal/mol; el segundo compuesto selectivo es el PLAC4 (pentafluorometilcetona), el cual tiene un  $\Delta G$  de -3.78 kcal/mol y el tercer compuesto selectivo es PLAC9 que es el 1,1,1, 3 - tetrafluoro-7-fenilhepta-2-ona, el cual tiene un  $\Delta G$  de -3.92 kcal/mol y se unen a los 2 residuos del sitio activo que son S519 y D636.

Con los resultados anteriores, se puede decir que de los compuestos selectivos para dicha proteína, el PLAC3 es el mejor compuesto a utilizar para inhibir esta proteína.

Por otra parte como se observa en la Tabla 9, el mejor valor al comparar todos los compuestos, es el PLAC15 con un  $\Delta G$  de -4.6 kcal/mol.

Es importante saber que los valores de  $\Delta G$  positivos se descartan, ya que entre más negativo es el valor, mayor es la afinidad entre el ligando y la proteína.

Tabla 9 Interacciones de los ligandos de iPLA<sub>2</sub>

COMPUESTO	$\Delta G^*$ Kcal/mol	RESIDUOS 5A**
PLAC1	0.64	V623 L627 G628 N642 K713 G712 G486 K489 D636 G487 V488 L754 P625 D755 A624 A623 Y627 F628 F549 L560 R619 A168 A617 M574 G622 Y541 S519 T520 S521 M583 F522 I523 L526
PLAC2	4.77	D751 M753 L754 D755 V715 T679 V716 N642 D484 K713 K489 G712 G486 V488 G487 L639 G638 G485 G521 T518 G637 G522 S519
PLAC3	-4,34	L560 A618 R619 S621 G622 F628 A623 D636 Y627 A624 G638 D756 V716 L755 K713 F549 S519 I523 T520 T518 G521 G485 G487 V488 N642 G486
PLAC4	-3.78	V716 G712 K713 G638 D636 P625 A624 S519 S621 G486 A623 G622 T520 A618 L716 K489 G487 Y627 I523 F628 A618 R619 D756 V488 Y541 F549 M540 L560
PLAC5	1.78	L639 G637 D636 N642 G638 S621 T44 S519 G521 G622 A623 A24 R625 I523 T520 L560 G485 A624 V716 P625 G712 K713 F628 G486 Y627 K489 V488 Y555 F549 V716 G712 K713 L755 D756 D752
PLAC6	-0.1	L639 G637 N168 G638 D636 S621 S519 A618 V716 G712 K713 P151 A624 G486 A123 G122 T520 I523 R619 G487 F628 Y627 K489 L280 D277 M754 D756 Y555 F549 L560
PLAC7	6.62	V715 V716 K713 G712 M753 L754 D755 A641 N642 L639 D484 G638 G637 T518 G485 G486 K489 G521 S519 D636 T520 L635 I523 S621 G487 V488 P625 A624 Y541 Y627 M540 F628 F549 L560 G622 A623 A618 R619
PLAC8	168.92	L639 G238 V716 T620 G638 G637 T585 LF599 N648 L584 F599 N648 D636 K713 P151 A624 L755 M754 D756 G757 G486 Y627 T679 D756 G757 G486 Y627 T679 F628 G187 V488 Y55 F549 Y541 M540 2545 A1232 D484 G485 G622 S519 T518 S121 G517
PLAC9	-3.92	R600 N601 F599 T575 M574 K573 V582 V614 T572 M109 K107 D102 G522 V103 V41 L526 A531 F568 K532
PLAC10	-1.33	V715 V716 K713 G712 D751 M502 D755 L639 N642 G538 G637 G485 G486 K489 D625 A624 G486 V487 T520 D636 S519 S621 G622 A623 I523 F628 R619 A618 F549 L560 L566
PLAC11	2.75	D484 K489 N642 A641 V716 G521 G522 Y541 I523 G485 T518 T520 G486 V488 S519 G638 G637 G487 T585 K713 L754 D755 D636 S621 G622 A618 A624 A623Y627 R619 F549 F628 L560
PLAC12	0.23	K713 V242 A641 G638 N582 G637 T585 L110 L754 D755 A624 G486 L489 Y627 G487 V488 F628 Y541 F549 L560 D636 D484 T518 G485 A623 S519 S621 G521 G622 T520 G522 I523 R619 A618
PLAC13	1.76	V716 N642 D484 K713 G485 G486 G521 G638 T518 G637 K489 L754 V488 L755 Y541 G487 T520 S519 D636 A624 I523 S621 G622 A623 Y627 R625 F628 F549 L560
PLAC14	-0.21	N642 V716 D484 K713 G485 G521 G486 T520 K489 L754 G487 G488 D755 Y541 G638 G637 T518 G522 S519 D636 A624 I523 A624 S621 G622 A623 A618 R619 Y627 F489 L560 F549
PLAC15	-4.6	R600 N601 F599 T101 M574 K573 V582 V614 T572 M583 K581 D576 G522 V577 V515 L526 A531 F568 K532
PLAC16	4.7	R619 A618 F628 L560 S621 A623 G622 I523 F549 Y627 T 520 G521 G487 V488 D755 Y541 T385 D636 S519 A624 T518 P625 G637 T518 P625 G485 G486 L755 G638 N642 G712 V716 K713 D717

\* $\Delta G$  del primer conformero ligando-proteína

## EVALUACION *in vitro*

Para llevar a cabo la evaluación *in vitro*, se utilizó como compuesto de referencia la indometacina, la cual se ha reportado como inhibidor de PLA<sub>2</sub> en fluido sinovial de humano (IC 50 de 35  $\mu$ M) [44]. Sin embargo, como se puede observar en las tablas 10 y 11, sólo se utilizó una concentración de 1  $\mu$ M, ya que al preparar los sistemas cercanos al IC 50 de la indometacina, dichos compuestos C1 (ácido 5-[[{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico) e indometacina, no se disolvieron completamente, de tal manera que se hizo un ajuste a las concentraciones para favorecer la solubilidad de los compuestos.

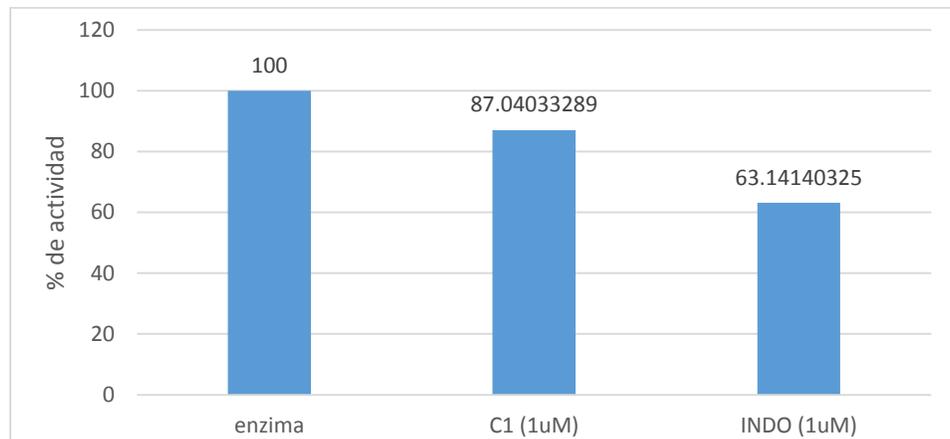
Tabla 10 Fluorescencia del PLAC15

MUESTRA	ABSORCIÓN (nm)					
control negativo	1128	1142	1135	0		
Enzima	39717	42339	41028	39893	100	0
C1 (1uM)	41992	29724	35858	34723	87.0403329	12.9596671

Tabla 11 Fluorescencia de Indometacina PLAC16

MUESTRA	ABSORCIÓN (nm)					
control negativo	1128	1142	1135	0		
Enzima	39717	42339	41028	39893	100	0
IND (1uM)	22101	30547	26324	25189	63.1414033	36.8585967

Gracias a las absorciones obtenidas en la tabla 10 y 11, se construyó la gráfica 1, en la cual se observa el porcentaje de actividad que tiene la enzima, que es del 100%. Sin embargo al interactuar con el compuesto C1 (1 $\mu$ M) se observa que la actividad de la enzima ha reducido alrededor del 13%, lo que indica que el compuesto efectivamente inhibe la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub>. Por otro lado se observa que el compuesto de referencia, que en este caso es la indometacina (1 $\mu$ M) reduce la actividad hasta un 63%.



Gráfica 1 Porcentaje de la actividad de la enzima PLA<sub>2</sub> al interactuar con el compuesto C1 (1µM) y la indometacina (1µM) mediante fluorometría.

La actividad de la enzima con el compuesto C1 es inhibida un 13% y en comparación con la indometacina, la inhibición es alrededor del 37%.

## DISCUSIÓN

Las fosfolipasas A<sub>2</sub>, bajo condiciones fisiológicas ayudan a mantener la estructura de las membranas y su función mediante la remoción de fosfolípidos dañados. Sin embargo, en condiciones patológicas, existe un aumento de su actividad y con ello el incremento de la generación de ácidos grasos y lisofosfolípidos, los cuales pueden ser metabolizados a mensajeros secundarios y en metabolitos que contribuyen a un daño neuronal.

Por ejemplo, el AA, es metabolizado por COX y lipoxigenasa (LO) en prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y lipoxinas. Dichos productos, conocidos como eicosanoides que se encuentran involucrados en diversas actividades biológicas, por ejemplo en inflamación, vasodilatación, vasoconstricción, por mencionar algunas.

También existe un proceso de oxidación del AA del cual derivan aquellos biomarcadores de lipoperoxidación, como isoprostanos e isofuranos, de tal manera que tras el conocimiento de las diversas funciones que tiene dicha enzima, principalmente en condiciones patológicas, se han desarrollado inhibidores selectivos para cada una de las PLA<sub>2</sub> (Tabla 1), sin embargo, no se han tomado en

cuenta como tratamiento, ya que algunos han presentado toxicidad y otros aunque se dice que son inhibidores selectivos, actúan inhibiendo dos PLA<sub>2</sub> diferentes.

Al llevar a cabo el estudio *in silico* de diferentes inhibidores, algunos ya reportados, podemos ver que efectivamente algunos compuestos pueden actuar en el sitio activo de otra PLA<sub>2</sub>.

#### FOSFOLIPASA SECRETORA

Como se ve en la Tabla 12, los compuestos que ya están reportados como selectivos para las tres fosfolipasas sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> y la fosfolipasa iPLA<sub>2</sub>, ninguno de ellos es selectivo, es decir, que todos los compuestos actúan en el sitio activo de las 3 fosfolipasas.

Tabla 12 Comparación de los compuestos selectivos de cada PLA<sub>2</sub>

COMPUESTO	RESIDUOS 5 A sPLA <sub>2</sub>	ΔG* Kcal/mol	RESIDUOS 5A cPLA <sub>2</sub>	ΔG* Kcal/mol	RESIDUOS 5A iPLA <sub>2</sub>	ΔG* Kcal/mol
PLAC1	F48 Y21 G22 C44 C28 H27 G29 Ca 128 G32 G31 V30 F5 L2 D48 H47 Y51 K52 K62 A17 A18 A94 I9 H6	-7.24	L592 K588 E589 F554 T553 M342 E340 L341 N555 G551 L552 E422 D549 L421 I424 A396 F397 S577 F576 A578 G196 G197 S228 E418 M417 G198 T680 R200	-5.31	V623 L627 G628 N642 K713 G712 G486 K489 D636 G487 V488 L754 P625 D755 A624 A623 Y627 F628 F549 L560 R619 A168 A617 M574 G622 Y541 S519 T520 S521 M583 F522 I523 L526	0.64
PLAC2	F48 Y21 G22 C44 C28 H27 G29 Ca 128 H47 V30 D48 G31 Y51 A17 A18 I9 H6 F5 V3 L2 K62	-8.8	G196 N555 G197 R200 F576 S577 T680 E589 A578 G551 F554 L592 M417 G418 L552 T553 L421 E422 L341 I424 N423 T426 E34 T425 S339	-5.66	D751 M753 L754 D755 V715 T679 V716 N642 D484 K713 K489 G712 G486 V488 G487 L639 G638 G485 G521 T518 G637 G522 S519	4.77
PLAC3	F48 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 Ca128 V30 D48 Y51 H47 A17 A18 I9 F5 L2K62	-9.12	E478 T416 F681 T680 S679 F678 F671 S676 A578 R579 P580	-7.21	L560 A618 R619 S621 G622 F628 A623 D636 Y627 A624 G638 D756 V716 L755 K713 F549 S519 I523 T520 T518 G521 G485 G487 V488 N642 G486	-4.34
PLAC4	F48 I9 F5 L2 Y51 K62 A17 H47 Y21 A18 C44 D48 G22 C28 G29 Ca198 V30 H27 G31	-6.3	L227 S228 D549 S550 F397 A396 G196 G198 G551 L552 R200 G197 N555 F576 T680 S577 E589 A278 O417 E418 K588 L421	-4.75	V716 G712 K713 G638 D636 P625 A624 S519 S621 G486 A623 G622 T520 A618 L716 K489 G487 Y627 I523 F628 A618 R619 D756 V488 Y541 F549 M540 L560	-3.78
PLAC5	F48 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 Ca128 G31 V30 D48 Y51 H47 A17 A18 I9 F5 L2 K52 V3 H6 K62	-11.41	N687 F690 Q688 A689 R692 P686 Y685 Q684 F683 N262 L264 F678 P677 N682 S679 S676 F681 V404 L405 E675	-7.64	L639 G637 D636 N642 G638 S621 T44 S519 G521 G622 A623 A24 R625 I523 T520 L560 G485 A624 V716 P625 G712 K713 F628 G486 Y627 K489 V488 Y555 F549 V716 G712 K713 L755 D756 D752	1.78
PLAC6	A17 F98 A18 Y21 G22 C28 C44 G29 H27 CA128 V30 D48 G32 G31 Y51 I9 F5 L2 K62	-9.47	L421 L492 G229 S228 D549 S550 G196 G198 R200 G197 F576 F397 A396 G551 N555 T680 S577 A578 R579 P580 M417 E418 L552L421	-5.97	L639 G637 N168 G638 D636 S621 S519 A618 V716 G712 K713 P151 A624 G486 A123 G122 T520 I523 R619 G487 F628 Y627 K489 L280 D277 M754 D756 Y555 F549 L560	-0.1
PLAC7	F98 Y21 G22 C28 C43 C28 C44 H27 A94 G29 Ca198 H47 D48 V30 Y51 A17 A18 I8 I9 H6 F5 L2	-7.47	L227 S228 G198 G196 R200 G197 F576 T680 N555 S577 A578 K588 D549 F397 A396 G551 F554 M417 E418 L552 T553 L421 E422 N423 I424 L341 T426 T425 E340 S339	-5.34	V715 V716 K713 G712 M753 L754 D755 A641 N642 L639 D484 G638 G637 T518 G485 G486 K489 G521 S519 D636 T520 L635 I523 S621 G487 V488 P625 A624 Y541 Y627 M540 F628 F549 L560 G622 A623 A618 R619	6.62
PLAC8	F98 Y21 G22 C28 H27 G32G31 G29 Ca198 V30 D48 H47 Y51 K52 E55 K62 L2 F5 H6 A18 A17 I9	-8.55	R692 Q688 A689 N262 F683 Q684 L264 F678 P677 I670 S676 F671 F668 D669 T416 S415 E675 D673 D672 P674 N682 S679 R579 F681 V404 L405 M417 R403	-9.52	L639 G238 V716 T620 G638 G637 T585 LF599 N648 L584 F599 N648 D636 K713 P151 A624 L755 M754 D756 G757 G486 Y627 T679 D756 G757 G486 Y627 T679 F628 G187 V488 Y55 F549 Y541 M540 2545 A1232 D484 G485 G622 S519 T518 S121 G517	168.92
PLAC9	F98 Y21 G22 C43 C28 C44 G29 H27 Ca198 V30 G31 D48 H47 Y51 A17 A18 A94 I9 F5 L2	-6.29	L227 S228 G196 G198 G197 T680 E589 R200 F576 S777 A578 N555 F397 G551 F554 M417 E418 A396 L552 T553 L421	-4.94	R600 N601 F599 T575 M574 K573 V582 V614 T572 M109 K107 D102 G522 V103 V41 L526 A531 F568 K532	-3.92
PLAC10	G31 H27 V30 Ca198 C28 G29 C44 G22 Y21 A17 H6 L2 F5 V3 D48	-9.31	L227 S228 D549 A396 F397 G196 G198 G197 R200 T680 F576 S777 A578 G551 N555 L552 T553 F554 L341 E340 I424 L592 M417 E418 E589 L421 E422	-5.28	V715 V716 K713 G712 D751 M502 D755 L639 N642 G538 G637 G485 G486 K489 D625 A624 G486 V487 T520 D636 S519 S621 G622 A623 I523 F628 R619 A618 F549 L560 L566	-1.33

Los cuadros azules son los compuestos selectivos para cada fosfolipasa. Los aminoácidos en color rojo son los que pertenecen al sitio activo de cada PLA<sub>2</sub>.

Por otra parte, en la Tabla 13 se observa que el compuesto PLAC15, ácido 5- $\{[(2E)-3\text{-bromo-3-carboxiprop-2-enoil}]\text{amino}\}$ -2-hidroxibenzoico, es un posible inhibidor de la fosfolipasa secretora humana, ya que solo se une al sitio activo de esta enzima secretora.

*Tabla 13 Comparación de los compuestos propuestos para cada PLA<sub>2</sub>*

COMPUESTO	RESIDUOS 5 A sPLA <sub>2</sub>	RESIDUOS 5A cPLA <sub>2</sub>	RESIDUOS 5A iPLA <sub>2</sub>
PLAC11	F98 C43 C48 C44 H27 H47 Ca198 D48 G31 Y51 K52 E55 C28 G29 V30 F5 L2 K62	R403 V404 L264 F681 N682 F683 Q684 P677 S676	D484 K489 N642 A641 V716 G521 G522 Y541 I523 G485 T518 T520 G486 V488 S519 G638 G637 G487 T585 K713 L754 D755 D636 S621 G622 A618 A624 A623Y627 R619 F549 F628 L560
PLAC12	F98 C43 C44 H27 H47 D48 Y51 K52 C28 Ca198 V30 G31 G29 C28 Y21	F683 F678 L284 *677 N262 S276 Q684 S679 N682 E675 F681 P674 V404 S415 R403	K713 V242 A641 G638 N582 G637 T585 L110 L754 D755 A624 G486 L489 Y627 G487 V488 F628 Y541 F549 L560 D636 D484 T518 G485 A623 S519 S621 G521 G622 T520 G522 I523 R619 A618
PLAC13	E55 K52 Y51 H47 D48 K62 F5 C44 L2 F98 Ca198 V30 G31 H27 G29 C28 Y21	P263 P677 L264 S679 N262 S676 F683 Q684 E675 N682 S415 F681 V404 3405 R403	V716 N642 D484 K713 G485 G486 G521 G638 T518 G637 K489 L754 V488 L755 Y541 G487 T520 S519 D636 A624 I523 S621 G622 A623 Y627 R625 F628 F549 L560
PLAC14	F98 Y21 C28 C44 H27 G29 H47 Ca198 V30 D48 G31 K52 Y51 E55 F5 L2 K62	P263 P677 N262 3264 Q684 F683 L405 V404 N682 R403 F681 F678 S679 S676 E675 P674 S415	N642 V716 D484 K713 G485 G521 G486 T520 K489 L754 G487 G488 D755 Y541 G638 G637 T518 G522 S519 D636 A624 I523 A624 S621 G622 A623 A618 R619 Y627 F489 L560 F549
PLAC15	F98 Y21 G22 C28 C44 G29 H47 H27 Ca198 V30 D48 G32 G31 Y51 I9 F5 L2 K62	R403 T416 S415 V404 L405 F681 T680 S679 N682 F683 Q684 N262 L264 P263	R600 N601 F599 T101 M574 K573 V582 V614 T572 M583 K581 D576 G522 V577 V515 L526 A531 F568 K532
PLAC16	F98 I9 A17 Y21 A18 G22 F23 C44 C28 H27 G29 Ca198 V30 G31 F5 H47 L2 D48 Y51 K52 K62	S228 D549 S195 G196 G198 R200 G197 N555 G551 F397 A396 S577 F576 T680 L552 A578 M417 E418 L421 K588 E419 E422	R619 A618 F628 L560 S621 A623 G622 I523 F549 Y627 T 520 G521 G487 V488 D755 Y541 T385 D636 S519 A624 T518 P625 G637 T518 P625 G485 G486 L755 G638 N642 G712 V716 K713 D717

Como se puede observar en la figura 32, el PLAC15 es selectivo para proteína sPLA<sub>2</sub>, ya que se une en el sitio activo. Con las dos fosfolipasas restantes la cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, el compuesto no se encuentra en el sitio activo.

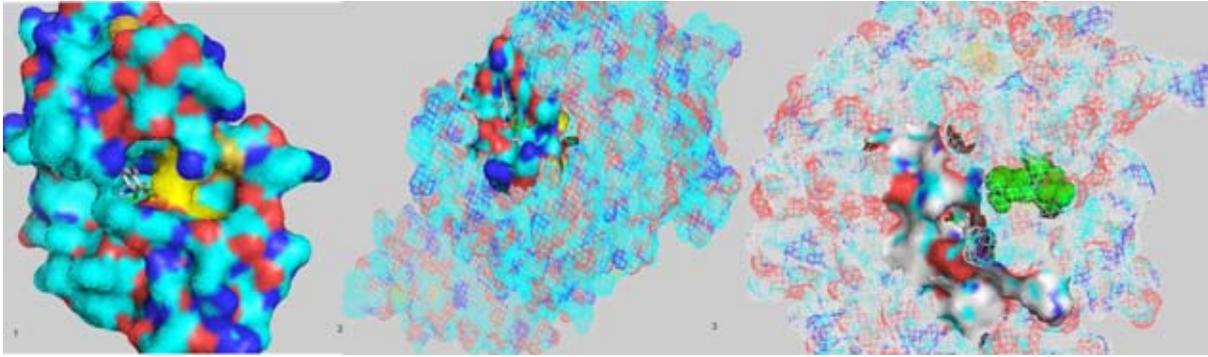


Figura 32. Interacción con el compuesto selectivo PLAC15 con las tres PLA<sub>2</sub>. 1) Interacción con la sPLA<sub>2</sub>. Se muestra de color amarillo el sitio activo de la proteína secretora. 2) Interacción con la cPLA<sub>2</sub>. Se muestra de color amarillo el sitio activo de la proteína citosólica. 3) Interacción con la iPLA<sub>2</sub>. Se muestra de color verde el sitio activo de la proteína independiente de calcio.

Para la evaluación *in vitro* no se utilizó un kit en específico para sPLA<sub>2</sub>, con el fin de demostrar que el compuesto C1 efectivamente actúe en esta proteína PLA<sub>2</sub>, ya que al ser un compuesto nuevo no se tienen estudios con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos.

Con este estudio se puede decir que el compuesto C1 es capaz inhibir a la PLA<sub>2</sub> a una concentración 1  $\mu$ M, lo cual se pudo comparar con el compuesto de referencia. Se sugiere realizar otro estudio *in vitro* para calcular la IC 50 y además emplear un kit específico para sPLA<sub>2</sub> y con ello establecer si el compuesto C1 es selectivo para dicha enzima y de esta manera validar el estudio *in silico*.

## **CONCLUSIONES**

Con el acoplamiento molecular realizado con los 16 inhibidores y con las tres fosfolipasas sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, se observó que cada una de las enzimas tiene una conformación y sitio activo diferente, lo que permitió conocer las características estructurales de los compuestos que les confiere la selectividad a una enzima en específico, en donde el compuesto ácido 5-{{(2E)-3-bromo-3-carboxiprop-2-enoil]amino}-2-hidroxibenzoico demostró ser un inhibidor selectivo para la sPLA<sub>2</sub> y finalmente, tras el estudio *in vitro*, se detectó que la actividad de la PLA<sub>2</sub> es inhibida hasta un 13% con una concentración de 1  $\mu$ M.

## REFERENCIAS

- [1] Hsieh HL., Yang CM. (2013) Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int.* 2013, 484613
- [2] Quach ND., Arnold RD., Cummings BS. (2014) Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol.* 90, 338-48
- [3] Dennis E. A., Cao J., Hsu YH., Magrioti V, Kokotos G. (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 111, 6130-85
- [4] Sun G.Y., Xu J., Jensen M. D., Simonyi A. (2004) Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J Lipid Res.* 45, 205-13
- [5] Sun, G. Y., Shelat, P. B., Jensen, M. B., He, Y., Sun, A. Y., & Simonyi, A. (2010). Phospholipases A2 and Inflammatory Responses in the Central Nervous System. *Neuromolecular Medicine*, 12 133–148.
- [6] Jiménez KL., Zavaleta Al., Izaguirre V., Yarleque A. (2005) Biología celular y molecular de las fosfolipasas A2. UNMSM. [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v08\\_n1/pdf/a02.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v08_n1/pdf/a02.pdf). Visitado el 21 junio 2016
- [7] Farooqui AA., Ong WY., Horrocks LA. (2006) Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol Rev* 58,591-620
- [8] Smith LW., Murphy CR. (2002) The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edition. Volume 36. Pages 341–371. USA.
- [9] Kitadokoro K., Hagishita S., Sato T. Ohtani M., Miki K. (1998) Crystal structure of human secretory phospholipase A2-IIA complex with the potent indolizine inhibitor 120-1032. *J Biochem.* 123, 619-23.

[10] Gentile MT., Reccia MG., Soreentino PP., Vitale E., Sorrentino G., Puca AA., Colucci-D'Amato L. (2012) Role of Cytosolic calcium-dependent phospholipase A2 in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Mol Neurobiol* 45, 596-604

[11] Ong WY., Farooqui T Kokotos G., Farooqui AA. (2015) Synthetic and Natural inhibitors of Phospholipases A2: Their importance for understanding and treatment of Neurological Disorders." *ACS Chem Neurosci*. 6, 814-31

[12]. King Michael W (2016) The medical biochemistry page. <http://themedicalbiochemistrypage.org/eicosanoids.php>. (Visitado el 02.03.2017)

[13] Mouchlis VD., Michopoulou V., Constantinou-Kokotou V. Mavromoustakos, T., Dennis EA., & Kokotos G. (2012) Binding conformation of 2-oxoamide inhibitors to group IVA cytosolic phospholipase A2 determined by molecular docking combined with molecular dynamics. *J Chem Inf Model*. 52, 243-54

[14] Burke JE., Dennis EA. (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50,S237-42

[15] Leslie CC. (2015) Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>: physiological function and role in disease. *J Lipid* 56, 1386-402

[16] Dessen A., Tang J., Schmidt H., Stahl M., Clark JD., Seehra J., & Somers WS. (1999) Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*. 97, 349-60

[17] Connolly Stephen., Bennion Colin., Botterell Sarah., Croshaw Pamela J., Hallam Catherine., Hardy Kim., Hartopp Paul., Jackson Clive G., King Sarah J., Lawrence Louise., Mete Antonio., Murray David., Robinson David H., Smith Gillian M., Stein Linda., Walters Lain., Wells Edward., & Withnall John W. (2002) Design and Synthesis of a Novel and Potent Series of Inhibitors of Cytosolic. Phospholipase A2 Based on a 1,3-Disubstituted Propan-2-one Skeleton. *J. Med. Chem* 45, 1348-1362

[18] Mouchlis VD., Magrioti V., Barbayianni E. Cermak N., Oslund RC., Mavromoustakos TM., Gelb MH., & Kokotos G. (2011) Inhibition of secreted

phospholipases A<sub>2</sub> by 2-oxoamides based on  $\alpha$ -amino acids: Synthesis, *in vitro* evaluation and molecular docking calculations. *Bioorg Med Chem* 19, 735-43

[19] Schevitz RW., Bach NJ., Carlson DG. Chirgadze NY., Clawson DK., Dillard RD., Draheim SE., Hartley LW., Jones ND., Mihelich ED., Olkowski JL., Snyder DW., Sommers C., & Wery J.-P. (1995) Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Nat Struct Biol.* 2, 458-65

[20] Hsu Y., Bucher D., Cao J., Li S., Yang SW., Kokotos G., Woods VL Jr., McCammon JA., & Dennis EA. (2013) Fluoroketone inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A<sub>2</sub> through binding pocket association defined by hydrogen/deuterium exchange and molecular dynamics. *J Am Chem Soc* 135, 1330-7

[21] Winstead MV., Balsinde J., Dennis EA. (2000) Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>: structure and function. *Biochimica et Biophysica* 28-39

[22] Sun GY., He Y., Chuang DY., Lee JC., Gu Z., Simonyi A., & Sun AY. (2012) Integrating cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> with oxidative/nitrosative signaling pathways in neurons: a novel therapeutic strategy for AD. *Mol Neurobiol* 46,85-95

[23] Lee, J. C.-M., Simonyi, A., Sun, AY., & Sun GY. (2011). Phospholipases A<sub>2</sub> and neural membrane dynamics: Implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 116(5), 813–819

[24] OMS "CANCER" [en línea] <http://www.who.int/features/qa/15/es/> (visitado el 16.10.2016).

[25] Park JB., Lee CS., Jang JH., Ghim J., Kim YJ., You S., Hwang D., Suh PG., & Ryu SH. (2012) Phospholipase signalling networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* 12, 782-792

[26] OMS "OBESIDAD" [en línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (visitado el 20.10.2016).

[27] Abbott MJ., Tang T., & Sul HS. (2010). The Role of Phospholipase A2-derived Mediators in Obesity. *Drug Discov Today Dis Mech.*, 7(3-4), e213–e218

[28] Ong WY., Farooqui T., Kokotos G., & Farooqui AA. (2014) Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. *ACS Chem Neurosci* 6, 814-31

[29] ACD/Structure Elucidator, version 14.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2014

[30] The official Gaussian Website. <http://www.gaussian.com/>, 2015

[31] Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, 2016 (visitado 01.01.17)

[32] Hsu YH., Bucher D., Cao J., Li S., Yang SW., Kokotos G., Woods VL Jr., McCammon JA., & Dennis EA. (2013) Fluoroketone inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 through binding pocket association defined by hydrogen/deuterium exchange and molecular dynamics. *J Am Chem Soc.* 135, 1330-7

[33] EMBL-EBI

[www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/emboss\\_needle/result/embos\\_needle](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/emboss_needle/result/embos_needle) (visitado 03.04.16)

[34] AutoDock. <http://autodock.scripps.edu/>, 2016 (visitado 01.08.16).

[35] EnzChek® Phospholipase A2 Assay Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E10217>. (visitado 07.06.16)

[36] BRENDA. The comprehensive Enzyme Information system. <http://www.brenda-enzymes.org/>, 2016 (visitado 11.11.16)

[37] Scott DL., Otwinowski Z., Gelb MH., & Sigler PB. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science.* 250, 1563-6

[38] Lee LK., Bryant KJ., , Bouveret R., Lei PW., Duff AP., Harrop SJ., Huang EP., Harvey RP., Gelb MH., Gray PP., Curmi PM., Cunningham AM., Church WB., & Scott KF. (2013) Selective inhibition of human group IIA-secreted phospholipase A2 (hGIIA) signaling reveals arachidonic acid metabolism is associated with colocalization of hGIIA to vimentin in rheumatoid synoviocytes. *J Biol Chem.* 288, 15269-79

[39] NCBI. National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), (visitado 11.11.16)

[40] PyMOL. A molecular visualization system on an open source foundation, maintained and distributed by Schrodinger. <http://www.pymol.org>, 2016 (visitado 01.08.16).

[41] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes (2016) <https://accelrys.com/discovery-studio> (visitado 01.08.16)

[41] Baskakis C., Magrioti V., Cotton N., Stephens D., Constantinou-Kokotou V., Dennis EA., & Kokotos G. (2008) Synthesis of Polyfluoro Ketones for Selective Inhibition of Human Phospholipase A2 Enzymes. *J Med Chem.* 51, 8027–8037

[42] Tai N., Kuwabara K., Kobayashi M., Yamada K., Ono T., Seno K., Gahara Y., Ishizaki J., & Hori Y. (2009) Cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitor, pyrroxyphene, displays anti-arthritic and anti-bone destructive action in a murine arthritis model. *Inflamm* 59, 53-62

[43] Cabrera Pérez Laura Cristina., Gutiérrez Sánchez Mara., Mendieta Wejebe Jessica Elena., Hernández Rodríguez Maricarmen., Fragoso Vázquez Manuel Jonathan., Rodrigo Salazar Juan., Correa Basurto José., Padilla Martínez Itzia Irene., & Rosales Hernández Martha Cecilia. (2017) Novel 5-aminosalicylic derivatives as anti-inflammatories and myeloperoxidase inhibitors evaluated *in silico*, *in vitro* and *ex vivo*. *Arabian Journal of Chemistry*

[44] García O., Pereira N., Flores R. (1998) Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 17, 190-7

[45] Benito I., Hoult J.R. S. (1994) Groups I, II and III extracellular phospholipases A2: Selective inhibition of group II enzymes by indomethacin but not other NSAIDs. *Agents Actions* 41,111-113

## ANEXO 1

### KIT FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>

Cálculos para las diluciones del PLAC15

1000µM	1mM	1 mol	330.08g PLAC15	1 L	5 mL
1L	1000µM	1000mM	1 mol	1000mL	

=  $1.6504 \times 10^{-3}$  g PLAC15  
= 1.7mg PLAC15

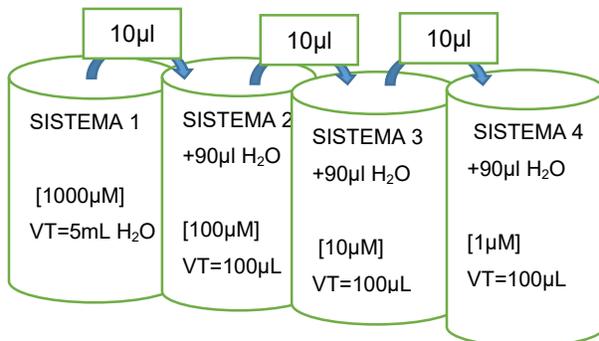
Cálculos para las diluciones del PLAC16

1000µM	1mM	1 mol	357g PLAC16	1 L	5 mL
1L	1000µM	1000mM	1 mol	1000mL	

=  $1.785 \times 10^{-3}$  g PLAC16  
= 1.8mg PLAC16

### PREPARACION DE SISTEMAS

#### COMPUESTO DE BROMO PLAC15



#### INDOMETACINA PLAC16

