



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Diseño *in silico* de triazoles como posibles inhibidores de la enzima GABA-AT**, que presenta el alumno **Víctor Manuel Pérez Piña (10033419)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	APROBADO	
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez FF-UAEM	APROBADO	
Dr. Juan Alberto Guevara Salazar Escuela Superior de Medicina-IPN	APROBADO	
Dr. Ivan Omar Romero Estudillo CIQ-UAEM Cátedra CONACYT	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2021-10-23 18:42:30 | Firmante

V+jdltuF+MfmcwJHSfCpcMpOkWQqaTew+PIDB7dB/n2SV9PNvrcmiaMqWhCtAjij7LIBviyxc1hhz5j13ZcLW28IXtGWWDIqr5AFTT0oU9X+GDLm5Qpb9MJTCvKm9/rtCCUUCvqLdla4kgHi/dFHifNbLryyPJIOfpBxks/vNptopce2yvvhMjLO6rgDIMaDc+LiEKVjSgbFESGRMTN7pJ/7PGemUHFiyatfxnoxR6tFkkW43HsZtSiJ6+7sc1wskGvzORMDCGSpCmGQW6v9OzEhuoVWimz+mMfV3081Ae8aMqazNqGrXvsVuqQzhcGNKvGEdlQf96J6/SMNPoQz7g==

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2021-10-25 17:01:36 | Firmante

YZ4XLSzRVy23dSCKfyp/bvAor/xD3RU+/nyZYPT08JVjJ5wCrj11pVosk003KfhNWRhC/S7c7r8PrunMWGT67EyyzoKY78VNuefTjzW322NyM5gGx5ICp45KftDEaJrscKzz5GP42r5okZhN21FujWlmlbwgMUFZXI/Zi053lN1scVjTXka3Q1X3/TC/2U8YotW+mf+cFqvKSaMO5yQKTeluBPVdp45FdG63CwqXeYESDRliZmGgS5YR1A57Y5hWVCOE/EDuxk/YW6zaA8g6Dnrk81i5UPjMr/gCTMji8lj2yIFKv7YEkM+jaZNw4dgOZVitkdpw18D++GsYXXw==

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2021-10-26 10:09:18 | Firmante

Np270kfLLPC8VH9yJBEx9i0e59A6MgbMCMVGT6pQgLVKq5KrnRIVzt9mLHJuytb1oNsEmAM9E8pDEZw1B13Xb4b8uk6YNqfGFKk4e3Q2yv26J6DNL1Y2iYXiF0yCFx2irfPyHI2lIT+lcH4/6iOfSvQho2oRqv5nAU/nTs0KhxYmrsAsQToOTA55NBIM7Ao2R.JZ4Sk5hMMmS2BAS7gydp37gsLTuncXb9V0K/pJbOLkWLwiCYHF4B+y/Ak8CkAdcLIL6bIDAOUv01bJyHbblyPxnImV5/s5CRaS6uvmKPY/J42j+IHNYHD00VhZqVHPoJfuldw9xAMBsQ9VbVajyTw==

MA. YOLANDA RIOS GOMEZ | Fecha:2021-10-26 11:14:58 | Firmante

m6xjOa9Tq6xKAT41WIQMBaOHJ8Q14cKlonox56+ZcAvIKFZP4TBx//d8c/2xmMrbIFXMrVagRcY4oNPaww/IFHRuLiu20IU+Binyp2h7W3qPP9dxUrt6m5sFPX2a3Wolz2pgFN0APgyoc3YEuXPHmUDLq4kQBc7+NGvkAEbR33yer7KoCvwAVGJKuRTaY3B4ZxLa8w5GZl1eLR2M01YaEmqxuPsk7GuFuBej0CJKEXPsb0tF22hEm5c7aTQl2G5rwwvrFHn/K1zrCJxySWaSXWARHo1sK5B4FJd23zG5HL75redLvANNbNMdbPafTuLoRByNu/e5chXS2tJL5mYg==

JUAN ALBERTO GUEVARA SALAZAR | Fecha:2021-11-24 10:01:18 | Firmante

ItYMp3Dwmly+JWjiguyMG26Ed5+I1X27dGghpexOXhBWASvdPNAEAww2vwWjEpfVkvOieglNvW2x9ZuY8hfXqoIX7ZMAyk8YPSIr9gzKSS59GO3QFGrzJ3noKNX+JIBMw41mB4tNbQglQsLrXV5GkdCAAxSjYV7SR24v0Uz9zhkyNyQ74hgyrxUg1h5ZmaPtA2rfTGdeFVG/000iJ7c/lKbAzpS3tkyZoDR/gL+29BcMIEKkWzvUGrqXa4ksjYabw6RrURHMaUZI9B3eU9NLSiT+Pk62np/yAjv/PCYPkpa0B1Wh3I9Cjow/TTwsloyrF66+ap7C3bXVUMQZBA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Jo7Q91Zya

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hhxceC63URILtAkjn97EftQVqrnRh21>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Diseño *in silico* de triazoles como posibles inhibidores de la
enzima GABA-AT”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.I. VÍCTOR MANUEL PÉREZ PIÑA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO FERNÁNDEZ ZERTUCHE

CODIRECTOR DE TESIS: DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ



CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2021



JURADO DE EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE: Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

SECRETARIO: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

VOCAL: Dr. Juan Alberto Guevara Salazar

SUPLENTE: Dr. Iván Omar Romero Estudillo

SUPLENTE: Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

CANDIDATO AL GRADO:

Q.I. VÍCTOR MANUEL PÉREZ PIÑA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO FERNÁNDEZ ZERTUCHE

CODIRECTOR DE TESIS:

DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ

Este trabajo se presentó de manera virtual en los siguientes foros:

- **Víctor Manuel Pérez Piña**, Mario Fernández Zertuche, Rodrigo Said Razo Hernández. “Diseño *in silico* de triazoles como análogos de GABA”. XVI Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, abril de 2021.

- **Víctor Manuel Pérez Piña**, Mario Fernández Zertuche, Rodrigo Said Razo Hernández. “Diseño *in silico* de triazoles como análogos de GABA”. 25 aniversario del Centro de Investigaciones Química, mayo de 2021.

- **Víctor Manuel Pérez Piña**, Mario Fernández Zertuche, Rodrigo Said Razo Hernández. “*In silico* design of triazoles as GABA analogues”. Congreso de Química, LatinXChem, septiembre de 2021.

- Se realizó un Artículo de Divulgación Científica de este trabajo, titulado “DISEÑO POR COMPUTADORA DE COMPUESTOS REGULADORES DE LA ACTIVIDAD EXCITATORIA NEURONAL”, el cual fue aceptado por la revista Hypatia (Publicación 1er. Trimestre del 2022). **Víctor Manuel Pérez Piña**, Zuleyma Martínez Campos, Rodrigo Said Razo Hernández.

- Se asistió de manera virtual: Al Curso de Biología Estructural, “International Meeting Structural Biology Structure, Dynamics and Interactions”, septiembre-octubre 2020.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), bajo la dirección del Dr. Mario Fernández Zertuche y en el Laboratorio de Quimioinformática y Diseño de Fármacos del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la Co-dirección del Dr. Rodrigo Said Razo Hernández, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de posgrado No. 1005984.

Agradecimientos

A Dios; *Por permitirme culminar una etapa más de mi vida profesional, por darme salud, fuerza y la fortaleza necesaria para seguir adelante, a pesar de los obstáculos que se interponen en el camino.*

A mis padres; *Que son parte fundamental en mi vida; no tengo palabras para expresar todo el amor y agradecimiento que tengo hacia ellos, porque siempre han estado conmigo en todo momento, apoyándome, estando juntos en las buenas y en las buenas, gracias mamá, gracias papá por enseñarme el valor de la vida a superarme día con día aprender a trabajar y ganarme los momentos especiales para saber disfrutarlos.*

A mis hermanos; *Gracias por ser esa otra parte en mi vida, por acompañarme en este camino y por brindarme su apoyo en cada uno de los momentos importantes, por nunca dejarnos solos y que a pesar de las discusiones pequeñas o grandes y los retos que nos ponga Dios en la vida salir adelante.*

A los miembros de mi Comité Tutorial; *Por su disposición, tiempo, sugerencias y observaciones al presente trabajo.*

Dr. Mario Fernández Zertuche

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

Dr. José Luis Viveros Ceballos

A los miembros de mi Jurado revisor; *Por su disposición, tiempo, sugerencias y observaciones al presente trabajo.*

Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Dr. Juan Alberto Guevara Salazar

Dr. Iván Omar Romero Estudillo

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

De manera especial

Al Dr. Mario Fernández Zertuche; *Por permitirme formar parte de su grupo de investigación y brindarme todo el apoyo desde el inicio y hasta la culminación de este proyecto.*

Al Dr. Rodrigo Said Razo Hernández; *Por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por aceptar ser el Co-director de este proyecto, gracias por su tiempo, dedicación y valiosas observaciones a lo largo del presente trabajo.*

A la Ing. Industrial Stefany Jacqueline Rodríguez Jaramillo; por todo su apoyo, consejos, motivaciones, paciencia y amor incondicional.

A mis amigos; Gracias en gran medida a cada una de las personas que integran mi mundo personal y académico, por todos los días que compartimos alegrías y tristezas, anécdotas y logros profesionales, por hacer esta etapa única y diferente. Espero seguir contando con su amistad y apoyo en la siguiente y en un futuro primero Dios prometedor para todos.

Al Centro de Investigaciones Químicas; Por las facilidades otorgadas en el uso de sus instalaciones y equipos.

Al Posgrado en Ciencias; Por las facilidades otorgadas en los trámites académicos y administrativos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Índice general

Índice.....	I
Abreviaturas.....	III
Figuras, tablas y esquemas.....	VI
Índice de compuestos.....	VII
Resumen.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Neurotransmisión.....	1
1.2. Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	2
1.3. Neuroreceptores.....	2
1.3.1. Receptores ionotrópicos.....	2
1.3.2. Receptores metabotrópicos.....	3
1.4. Síntesis y metabolismo de GABA.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Inhibidores de la GABA-AT reportados en la literatura.....	5
2.2. Análogos de GABA diseñados y sintetizados en el grupo de investigación.....	9
2.3. Estructura del triazol en química farmacéutica	12
2.4. Diseño racional de fármacos.....	13
2.5. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC).....	14
2.5.1. Diseño de fármacos en base a la estructura del receptor.....	14
2.5.2. Diseño de fármacos en base al ligando.....	14
2.6. Acoplamiento molecular.....	15
2.7. Modelado estructural por homología.....	16
2.8. Análisis de modo normal (eINémo).....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPOTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. General.....	21
5.2. Específicos.....	21
6. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	22

6.1. Propiedades moleculares de los análogos de GABA.....	23
6.2. Modelos de homología de GABA-AT.....	24
6.3. Estudios de acoplamiento molecular.....	25
6.4. Modelos de homología GABA-AT de <i>P. fluorescens</i> y humano	25
6.5. Acoplamiento molecular sobre el modelo proteico de <i>P. fluorescens</i>	27
6.6. Acoplamiento molecular de los compuestos GABA y vigabatrina.....	27
6.7. Acoplamiento molecular de los compuestos de referencia(8a-8b).....	29
6.8 Acoplamiento molecular de los compuestos análogos de interés (9a-9b).....	32
6.9. Acoplamiento molecular empleando modos normales (NMA).....	37
6.10. Acoplamiento molecular sobre el modelo proteico de humano.....	39
6.11. Acoplamiento molecular de los compuestos GABA y vigabatrina.....	40
6.12. Acoplamiento molecular de los compuestos de referencia(8a-8c).....	41
6.13. Acoplamiento molecular de los compuestos análogos de interés (9a-9c).....	47
6.14. Acoplamiento molecular empleando modos normales (NMA).....	54
7. CONCLUSIONES.....	57
8. PERSPECTIVAS.....	58
9. REFERENCIAS.....	59
10. ANEXOS.....	62
10.1 Cálculos de acoplamiento molecular.....	62
10.2. Optimización estructural de los análogos de GABA.....	62
10.3. Modelo GABA-AT de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	63
10.3.1 Compuestos de referencia (8c-8d).....	63
10.3.2. Análogos de interés (9c-9d).....	65
10.4. Modelo GABA-AT de humano.....	66
10.4.1. Compuestos de referencia (8d).....	66
10.4.2. Análogos de interés (9d).....	67
10.5. Síntesis general de los análogos de interés.....	68

Abreviaturas

Å	Ángstrom	Thr	Treonina
Arg	Arginina	Tyr	Tirosina
Asp	Ácido aspártico	u.m.a.	Unidad de masa atómica
ClogP	Coeficiente de partición		
Cys	Cisteína		
DIFAC	Diseño de fármacos asistido por computadora		
GABA	Ácido γ -aminobutírico		
GABA-AT	GABA-aminotransferasa		
Phe	Fenilalanina		
Gln	Glutamina		
Glu	Ácido glutámico		
Gly	Glicina		
Ile	Isoleucina		
Lys	Lisina		
NMA	Análisis de modo normal		
PDB	Protein Data Bank		
PLP	Piridoxal fosfato		
His	Histidina		
PMP	Piridoxima fosfato		
Pro	Prolina		
RMN	Resonancia Magnética Nuclear		
QSAR	Relación cuantitativa entre estructura-actividad		
Ser	Serina		
SNC	Sistema Nervioso Central		
Asn	Asparagina		
SSDH	Semialdehído Succínico Deshidrogenasa		

Figuras, tablas y esquemas

Figura 1. Sinapsis GABAérgica.

Figura 2. Ácido γ -aminobutírico (GABA).

Figura 3. A) Receptores ionotrópicos; B) Receptores metabotrópicos.

Figura 4. (S)-vigabatrina, análogo estructural de GABA

Figura 5.- Inhibidores de la GABA-AT.

Figura 6. Análogos de GABA basados en un anillo de tetrahidrotiofeno.

Figura 7. Interacción del compuesto **17** en el sitio de unión.

Figura 8. Inhibidores de la GABA-AT.

Figura 9. Inhibidores de la GABA-AT.

Figura 10. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

Figura 11. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

Figura 12. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

Figura 13. Fármacos con estructura de triazol.

Figura 14. Proceso de acoplamiento molecular.

Figura 15. Proceso general de modelado por homología. a) identificación de una estructura 3D conocida que sirve como plantilla; b) alineamiento de las secuencias de la plantilla y la diana para asignar la correspondencia entre los residuos de la plantilla y la diana. c) se construye un modelo para el objetivo basado en la alineación y la estructura de la plantilla.

Figura 16. Las direcciones de los movimientos de una proteína.

Figura 17. Esquematización de diferencias en diferentes modos normales

Figura 18. a) Triazoles de referencia; b) Triazoles objetivo.

Figura 19a. Modelo GABA-AT de *P. fluorescens*.

Figura 19b. Modelo GABA-AT de humano.

Figura 20. Interacciones de la molécula de **GABA** en el sitio catalítico.

Figura 21. Interacciones de (S)-**vigabatrina** en el sitio catalítico.

Figura 22. Interacciones de (R)-**8a** en el sitio catalítico.

Figura 23. Interacciones de (S)-**8a** en el sitio catalítico.

Figura 24. Interacciones de (R)-**8b** en el sitio catalítico.

Figura 25. Interacciones de (S)-**8b** en el sitio catalítico.

Figura 26. Interacciones de (R)-**9a** en el sitio catalítico.

Figura 27. Interacciones de (S)-**9a** en el sitio catalítico.

Figura 28. Interacciones de (R)-**9b** en el sitio catalítico.

Figura 29. Interacciones de (S)-**9b** en el sitio catalítico.

Figura 30. Cambio conformacional de la proteína de *P. fluorescens*; a) modo **7**, b) modo **8**, c) modo **9**.

Figura 31.- Acoplamiento molecular de (R)-**9a** empleando modos normales

Figura 32.- Acoplamiento molecular de (R)-**9b** empleando modos normales.

Figura 33. Interacciones de **GABA** en el sitio catalítico.

Figura 34. Interacciones de (S)-**vigabatrina** en el sitio catalítico.

Figura 35. Interacciones de (R)-**8a** en el sitio catalítico.

Figura 36. Interacciones de (S)-**8a** en el sitio catalítico.

Figura 37. Interacciones de (R)-**8b** en el sitio catalítico.

Figura 38. Interacciones de (S)-**8b** en el sitio catalítico.

Figura 39. Interacciones de (R)-**8c** en el sitio catalítico.

Figura 40. Interacciones de (S)-**8c** en el sitio catalítico.

Figura 41. Interacciones de (R)-**9a** en el sitio catalítico.

Figura 42. Interacciones de (S)-**9a** en el sitio catalítico.

Figura 43. Interacciones de (R)-**9b** en el sitio catalítico.

Figura 44. Interacciones de (S)-**9b** en el sitio catalítico.

Figura 45. Interacciones de (R)-**9c** en el sitio catalítico.

Figura 46. Interacciones de (S)-**9c** en el sitio catalítico.

Figura 47.- Cambio conformacional de la proteína de GABA-AT de humano; a) modo **7**, b) modo **8**, c) modo **9**.

Figura 48. Acoplamiento molecular de (R)-**9a** empleando modos normales.

Figura 49.- Acoplamiento molecular de (R)-**9b** empleando modos normales.

Figura 50. Geometría optimizada de todos los análogos de GABA en este estudio. Las esferas grises (carbono), blanca (hidrógeno), roja (oxígeno), azul (nitrógeno), amarilla (azufre) y verde (cloro).

Figura 51. Interacciones de a) (R)-**8c** y b) (S)-**8c** en el sitio catalítico.

Figura 52. Interacciones de c) (R)-**8d** y d) (S)-**8d** en el sitio catalítico.

Figura 53. Interacciones de e) (R)-**9c** y f) (S)-**9c** en el sitio catalítico.

Figura 54. Interacciones de g) (R)-**9d** y h) (S)-**9d** en el sitio catalítico.

Figura 55. Interacciones de a) (R)-**8d** y b) (S)-**8d** en el sitio catalítico.

Figura 56. Interacciones de c) (*R*)-**9d** y d) (*S*)-**9d** en el sitio catalítico.

Tabla 1. Constantes cinéticas para la inactivación de GABA-AT por 17-19.

Tabla 2. Resultados de acoplamiento molecular de los compuestos 27-34.

Tabla 3. Interacciones de enlace de hidrogeno presentes en el sitio de unión.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de todos los compuestos.

Tabla 5. Propiedades moleculares de los análogos de GABA.

Tabla 6. Estructuras cristalinas de GABA-AT disponibles en el servidor PDB.

Tabla 7a. Descriptores de la cavidad.

Tabla 7b. Descriptores de la cavidad.

Tabla 8. Interacciones de todos los compuestos de interés con los aminoácidos.

Tabla 9. Resultados de energía de unión.

Tabla 10. Resultados de energía de unión.

Tabla 11. Interacciones de todos los compuestos de interés con los aminoácidos.

Tabla 12. Resultados de energía de unión.

Tabla 13. Resultados de energía de unión.

Esquema 1. Síntesis y metabolismo de GABA.

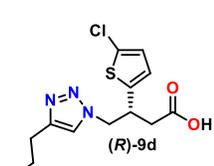
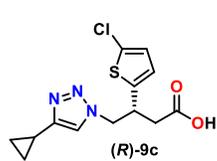
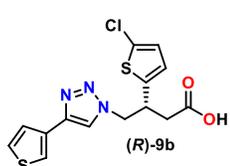
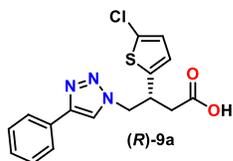
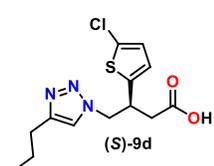
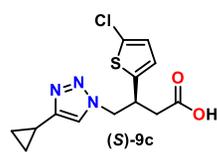
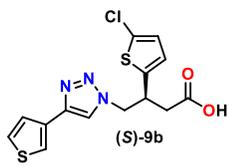
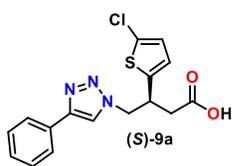
Esquema 2. Mecanismo de inactivación de GABA-AT por vigabatrina.

Esquema 3. Síntesis general de los análogos 8a-8d.

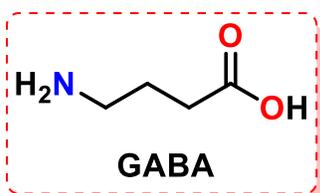
Esquema 4. Síntesis general de los análogos 8e-8h.

Esquema 5. Propuesta de síntesis de los análogos objetivo.

Índice de compuestos

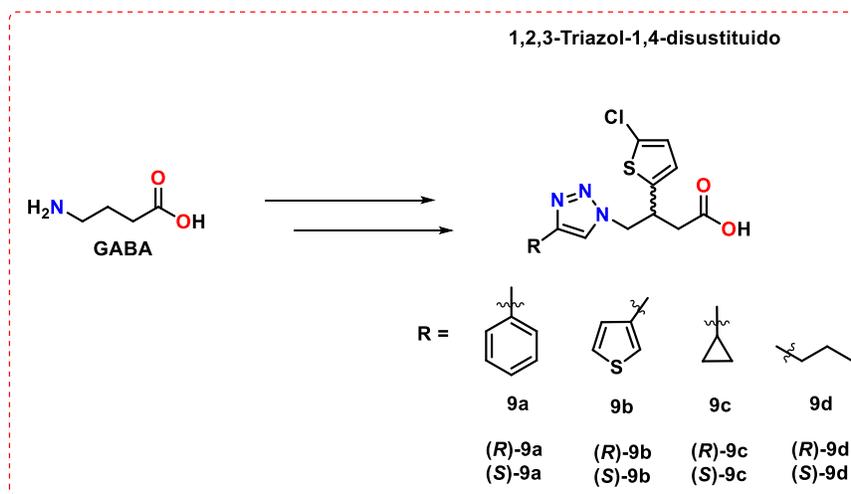


Resumen



El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central (SNC), éste es el encargado de regular la actividad neuronal del cerebro; es decir, mantiene concentraciones adecuadas de excitación en cada momento. Su acción fisiológica la lleva a cabo mediante la interacción con receptores específicos como: el GABA_A, GABA_B y GABA_C. Cuando se producen bajas concentraciones de GABA en el cerebro se altera el equilibrio inhibitorio-excitatorio, lo cual conduce a trastornos neurológicos como la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, entre otros.

En este trabajo se presenta el diseño *in silico* de triazoles como nuevos análogos estructurales de GABA, como potenciales inhibidores de la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT), responsable de la degradación de GABA. Se presenta el estudio de la interacción (ligando-enzima) entre los análogos objetivo y los modelos de homología de la GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens* y de humano. Los resultados demostraron que todos los análogos se unen de manera similar en el sitio activo en los modelos estudiados que los inhibidores que se usaron como referencia, con una afinidad de unión aceptable.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Neurotransmisión

La neurotransmisión es un proceso biológico llevado a cabo en el Sistema Nervioso Central (SNC), el cual es esencial para la comunicación entre una neurona y otra, a este mecanismo de comunicación se le conoce como sinapsis. Existe una variedad de funciones biológicas clave que se llevan a cabo por medio de la neurotransmisión, lo que involucra que la información transmitida de una neurona a otra es mediante un mensajero químico llamado neurotransmisor, los cuales interactúan con receptores específicos.¹ Un neurotransmisor puede ser excitador o inhibitor, según produzca despolarización o hiperpolarización de la membrana neuronal, respectivamente.²

El funcionamiento normal del cerebro requiere una red neuronal inhibitor/excitadora. GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC, se produce a partir de L-glutamato en neuronas presinápticas (GABAérgica) (**Figura 1**); la despolarización de neuronas presinápticas estimula la liberación y transporte de GABA al espacio sináptico por varios transportadores de GABA (GAT) para la neurotransmisión.

Una vez liberado en el espacio sináptico, GABA puede unirse a uno de los dos principales receptores GABA (GABA_A y GABA_B) en la neurona postsináptica. La unión del GABA a los receptores GABA_A causa la apertura del canal de iones cloruro central del receptor, lo que establece la hiperpolarización de la membrana neuronal, lo que resulta en una excitabilidad celular reducida y, por lo tanto, en una inhibición neuronal. Los receptores GABA_B son metabotrópicos; la activación por GABA da como resultado una apertura mediada por un receptor acoplado a proteína G de los canales de potasio, lo que da como resultado una hiperpolarización e inhibición neuronal similar a los receptores GABA_A.²

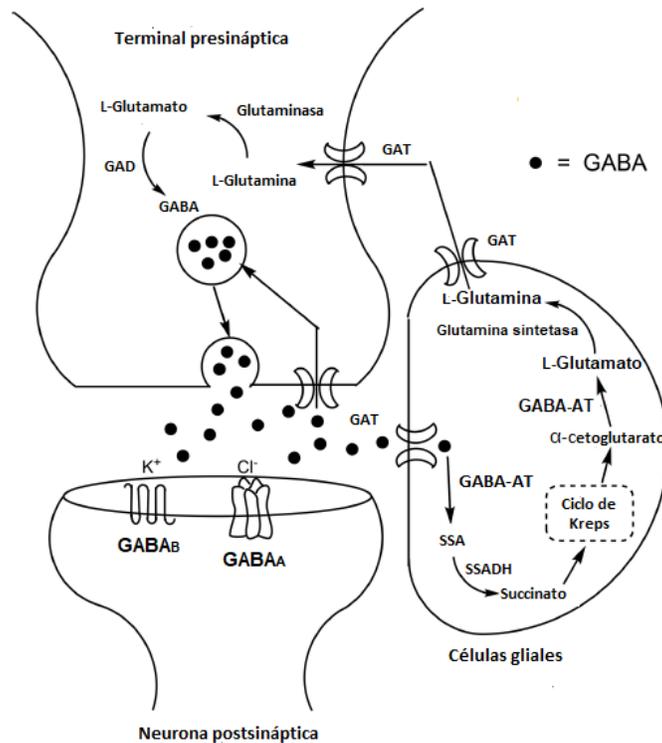


Figura 1. Sinapsis GABAérgica.³

Con base en lo anterior, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro, sus funciones están mediadas por diferentes tipos de receptores. Mientras que el ácido γ -aminobutírico es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC.⁴

1.2. Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el Sistema Nervioso Central⁵, siendo fundamental en los mecanismos de neurotransmisión (Figura 2).⁶

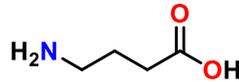


Figura 2. Ácido γ -aminobutírico (GABA).

Su función como inhibidor la lleva a cabo mediante la interacción con tres receptores: GABA_A, GABA_B y GABA_C.

Este neurotransmisor es el responsable de regular la actividad neuronal del cerebro, sus bajas concentraciones en el SNC están asociadas a algunos trastornos neurológicos como la epilepsia, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, entre otros. La administración directa de GABA no es una terapia efectiva para revertir estos trastornos, ya que, por su naturaleza polar, el GABA no puede cruzar la barrera hematoencefálica y actuar en el sistema nervioso central.⁷

1.3. Neurorreceptores

Los neurorreceptores son proteínas ubicadas en las membranas celulares, la interacción entre estos genera un cambio en la conformación de la proteína, generando diversas reacciones en la neurona (respuesta biológica) como la contracción, relajación, entre otros. A su vez, los receptores en las neuronas presinápticas se encargan de regular la liberación de neurotransmisores hacia el espacio sináptico. Por otra parte, los receptores postsinápticos reciben la señal de la neurona presináptica que desencadena un cambio en el potencial de la neurona a través de la apertura y/o cierre de canales iónicos específicos. De modo que, el efecto final del neurotransmisor depende del tipo de receptor al cual este unido específicamente. Hay que mencionar, además, que existen dos clases de receptores que transducen señales de neurotransmisores, los cuales son: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos.⁸

1.3.1. Receptores ionotrópicos los cuales son canales iónicos. Son modulados por la unión específica de neurotransmisores, provocando la apertura o cierre del canal iónico, controlando el flujo de iones Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ en la célula (Figura 3).⁹

Algunos de los receptores de este tipo son GABA_A y GABA_C, compuesto por proteínas transmembranales que constan de cinco subunidades dispuestas alrededor de un poro central de iones cloruro. En respuesta a la unión de GABA, estos receptores permiten la entrada de iones cloruro en la célula.¹⁰

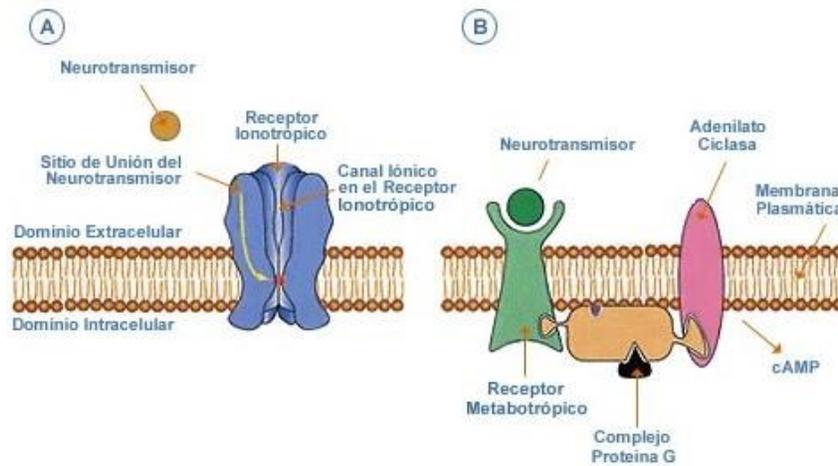
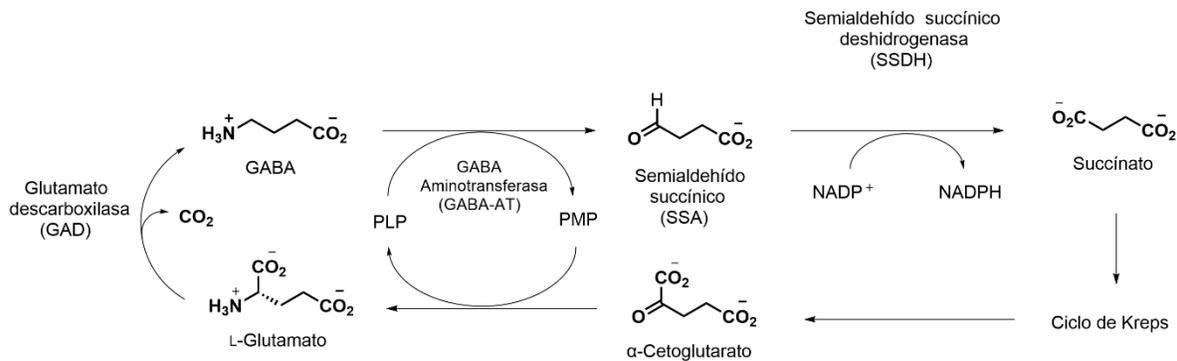


Figura 3. A) Receptores ionotrópicos; B) Receptores metabotrópicos.

1.3.2. Receptores metabotrópicos son proteínas con un dominio extracelular que contiene un sitio de unión a neurotransmisores y un dominio intracelular que se une a las proteínas G. Son llamados metabotrópicos porque el movimiento de iones a través de un canal depende de uno o más pasos metabólicos. El receptor GABA_B es un receptor acoplado a proteína G el cual regula la neurotransmisión en el cerebro.¹¹

1.4. Síntesis y metabolismo de GABA

Una vez llevada a cabo la interacción con dichos receptores, el GABA es obtenido a partir de la descarboxilación del ácido glutámico por acción de la enzima glutamato descarboxilasa, posteriormente el GABA es degradado a semialdehído succínico por la acción de la enzima GABA-aminotransferasa (GABA-AT) con la conversión simultánea de Piridoxal 5'-fosfato (PLP) a Piridoxamina 5'-Fosfato (PMP), ahí el semialdehído succínico (SSA) es oxidado a succinato por acción de la semialdehído succínico deshidrogenasa (SSDH); el α-cetoglutarato es empleado en un segundo paso para devolver el PMP A PLP con la formación de ácido glutámico, esto de acuerdo a la secuencia de reacciones mostradas en el **Esquema 1**.³



Esquema 1. Síntesis y metabolismo de GABA.³

Una estrategia que ha resultado eficaz para aumentar la concentración del GABA en el cerebro ha sido el uso de compuestos más lipófilos que atraviesen la barrera por difusión simple, inhibiendo la enzima GABA-AT.¹² Debido a esto, se han diseñado compuestos análogos de GABA que puedan inhibir dicha enzima.¹³

En la actualidad, existen algunos medicamentos disponibles en la clínica, los cuales son análogos estructurales de GABA, que son empleados para contrarrestar los trastornos neurológicos mencionados anteriormente. Un ejemplo es la (S)-vigabatrina, un inhibidor irreversible de la enzima GABA-AT¹⁴ que fue aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) de EE. UU. y comercializado como Sabril®, este inhibidor fue desarrollado por primera vez por Lippert et al¹⁵ (**Figura 4**). La (S)-Vigabatrina es un agente antiepiléptico, también, es utilizado para el tratar las convulsiones parciales complejas, así como monoterapia para tratar los espasmos infantiles.³

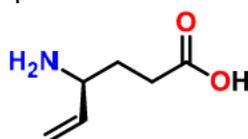
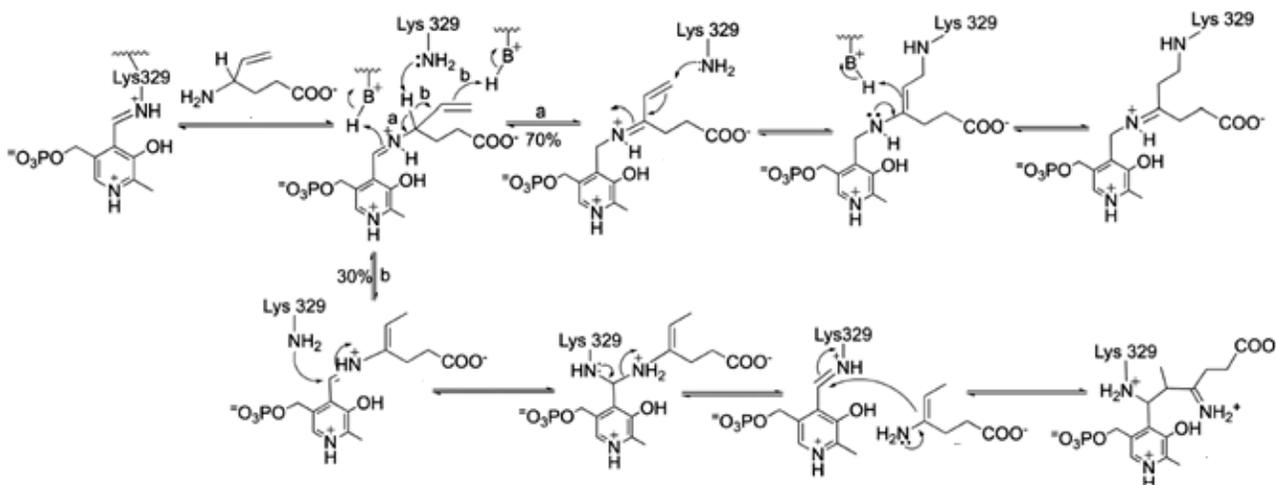


Figura 4. (S)-Vigabatrina, análogo estructural de GABA.

El mecanismo de acción de Vigabatrina reportado en la literatura es mediante la inhibición irreversible covalente al unirse a la Lys329 de la GABA-AT, mediante una adición de Michael como se observa en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Mecanismo de inactivación de GABA-AT por Vigabatrina.

Siguiendo este contexto, se demostró, que el mecanismo vía adición de Michael (**Esquema 2, a**) correspondía solo al 70% de la inactivación de GABA-AT; mientras que el 30% restante procedía a través de un intermediario de enamina, por un mecanismo diferente (**Esquema 2, b**). Logrando confirmar lo anterior mediante cristalografía de rayos X a los compuestos finales.³

2. ANTECEDENTES

2.1. Inhibidores de la GABA-AT reportados en la literatura

Esta reportado en la literatura que la administración directa de GABA no es considerada como una terapia farmacológica eficiente (debido su naturaleza polar, el GABA no puede cruzar la barrera hematoencefálica y actuar en el SNC) debido a esto, diversos grupos de investigación han propuesto una gran variedad de modificaciones a la estructura del neurotransmisor GABA, generando análogos conformacionalmente restringidos¹⁶, aminoácidos quirales y aquirales¹⁷ y aminoácidos cíclicos¹⁸, con mayor probabilidad de cruzar la barrera hematoencefálica y puedan actuar en el SNC.

En este contexto, en el grupo de investigación de Silverman y colaboradores se han diseñado y sintetizado análogos conformacionalmente restringidos (compuestos **13-16**), los cuales han sido propuestos como inactivadores de la GABA-AT (**Figura 5**). Los estudios que reportaron fueron que todos actuaban como inhibidores de la GABA-AT, de los cuales **13** y **14** mostraron una potencia baja como inhibidores, estos siguieron el mecanismo de enamina. Sin embargo, los compuestos **15** y **16** fueron los que mejor resultados obtuvieron, incluso, a **16** lo nombraron como **CPP-115** y es 186 veces más eficaz en la inactivación de GABA-AT que (S)-vigabatrina; incluso probaron **16** en un modelo de rata de múltiples espasmos infantiles, esto demostró que este compuesto disminuyó los espasmos en dosis de 0,1-1 mg/kg/día.¹⁹

Cabe mencionar que estos compuestos presentan el grupo farmacológico del GABA, incluso la mayoría presenta el mismo número de carbonos entre la amina y el carboxilato (excepto el compuesto **14**). Así mismo, estos compuestos presentan una región hidrofóbica en el enlace doble de cada una de las moléculas. El compuesto **16** fue el que presentó mayor inactivación de la GABA-AT, quizá eso se deba a que los átomos de flúor le confieren una hidrofobicidad mayor con respecto a los otros compuestos, generando que pueda atravesar la BHE.

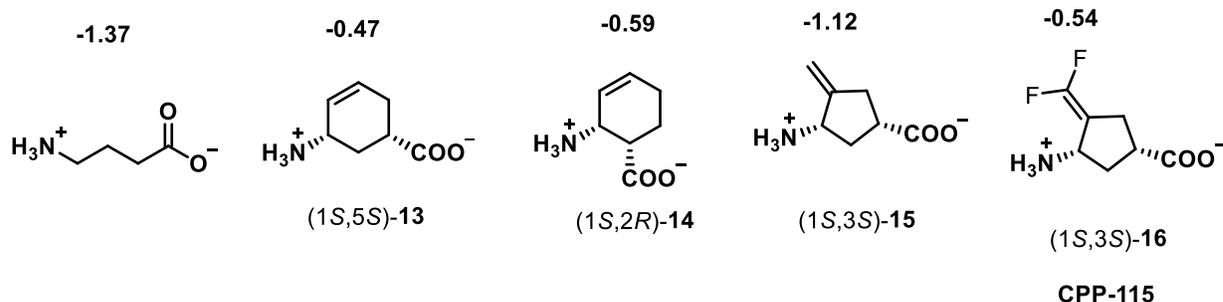


Figura 5.- Inhibidores de la GABA-AT.

Este mismo grupo de investigación ha seguido el diseño y síntesis de inactivadores de la GABA-AT, mediante nuevos mecanismos de inactivación, realizando modificaciones estructurales, empleando un anillo de tetrahidrotiofeno logrando de esta manera que los nuevos análogos sean conformacionalmente restringidos (**Figura 6**).¹⁹

Cabe mencionar que estos compuestos presentan el grupo farmacológico del GABA, como en el caso anterior, incluso, en todos los compuestos se observa presenta el mismo número de carbonos entre la amina y el carboxilato.

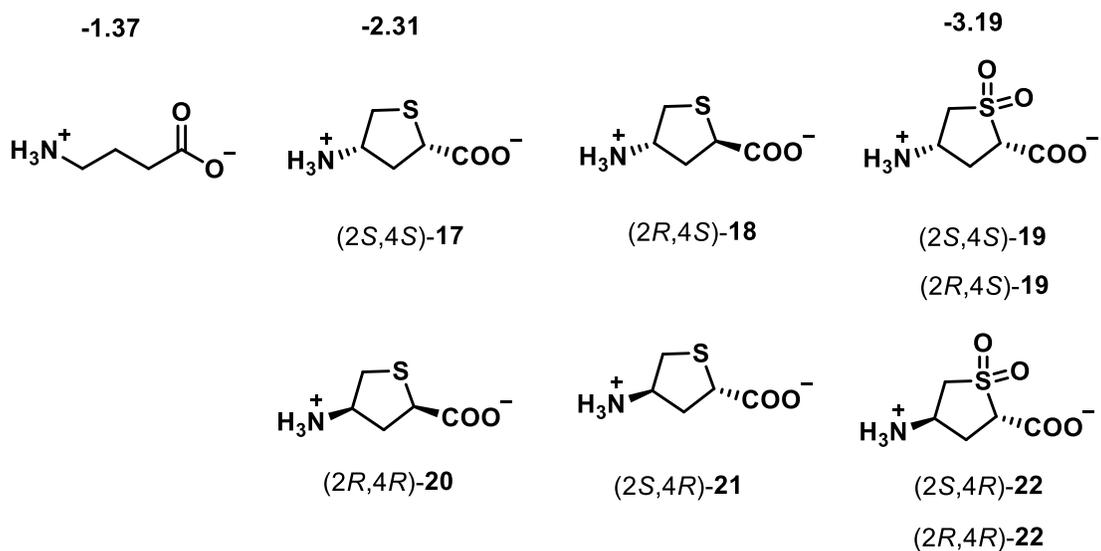


Figura 6. Análogos de GABA basados en un anillo de tetrahidrotiofeno.

Mediante resultados experimentales *in vitro* demostraron que los análogos **19-22** eran inactivadores débiles de la GABA-AT, mientras que **17** y **18** eran potentes inactivadores de la GABA-AT. Finalmente, a partir de los valores de K_{inact}/K_I (**Tabla 1**), lograron concluir que **17** es un inactivador de GABA-AT ocho veces más eficiente que la (S)-vigabatrina y **18** es la mitad de eficiente que la (S)-vigabatrina.¹⁹

Tabla 1. Constantes cinéticas para la inactivación de GABA-AT por **17-19**.

Compuesto	K _I (mM)	K _{inact} (min ⁻¹)	K _{inact} /K _I (min ⁻¹ mM ⁻¹)	K _i (mM)
17	0.182	0.17	0.93	-
18	2.23	0.12	0.05	-
19	-	-	-	3.2±0.7
20	-	-	-	3.4±0.8
21	-	-	-	3.3±0.7
22	-	-	-	7.5±0.7
(S)-Vigabatrina	3.2	0.37	0.11	-

Además, mediante a la estructura cristalina de rayos X del inactivador de GABA-AT **17**, observaron que el metabolito inactivante está unido covalentemente a PLP (**Figura 7**), este inactiva mediante un mecanismo de aromatización.

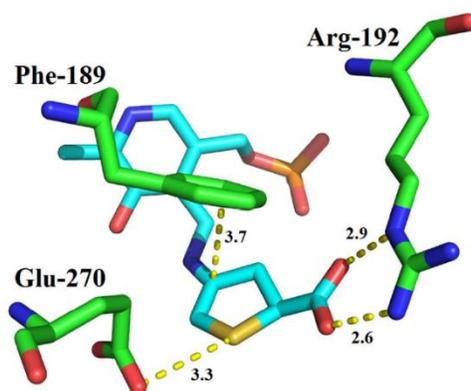


Figura 7. Interacción del compuesto **17** en el sitio de unión.

En la figura anterior, se puede observar que el compuesto **17** (azul) se estabilizó en el sitio de unión, mediante una interacción entre el carboxilato y los grupos amina de Arg192, así, como la interacción entre la enamina y el anillo de fenilo de Phe189, y finalmente, entre el átomo de azufre y un átomo de oxígeno carboxilo de Glu270. Cabe mencionar que estas interacciones han sido de gran interés, porque podrían desempeñar puntos importantes en la estructura y la actividad biológica de algunos compuestos de azufre.¹⁹

Por otra parte, el grupo de Wanner²⁰ y colaboradores han realizado el diseño y síntesis de análogos de GABA con estructura heterocíclica, enantioméricamente puros (compuestos **23-26**), los cuales presentaron actividad inhibitoria sobre la GABA-AT (**Figura 8**). La potencia inhibitoria de los compuestos sintetizados y su selectividad, la determinaron mediante ensayos de captación de GABA, basados en transportadores de GABA de ratón. Los compuestos (*S*)-**24b** y (*S*)-**24c** mostraron alta inhibición ($IC_{50} = 0.40$ y 0.34 , respectivamente) mientras que el compuesto (*R*)-**24d** mostró una potencia de $IC_{50} = 3.1$.

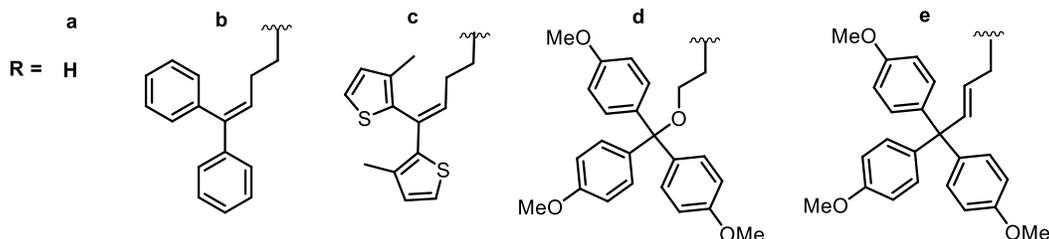
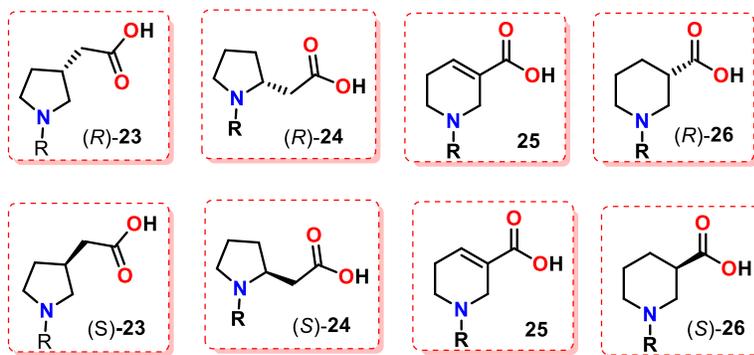


Figura 8. Inhibidores de la GABA-AT.

Posteriormente, el grupo de investigación de Andrews²¹ y de Deep²², han reportado el diseño *in silico* de compuestos que presentan actividad inhibitoria sobre la GABA-AT (compuestos **27-28** y **29-34**), **Figura 9**. Empleando la técnica de modelado por homología para elucidar la estructura 3D de humano, utilizando la estructura cristalina de la GABA-AT de cerdo (PDB: 10HV); la cual consideraron presentaba una alta similitud de secuencia (80%).

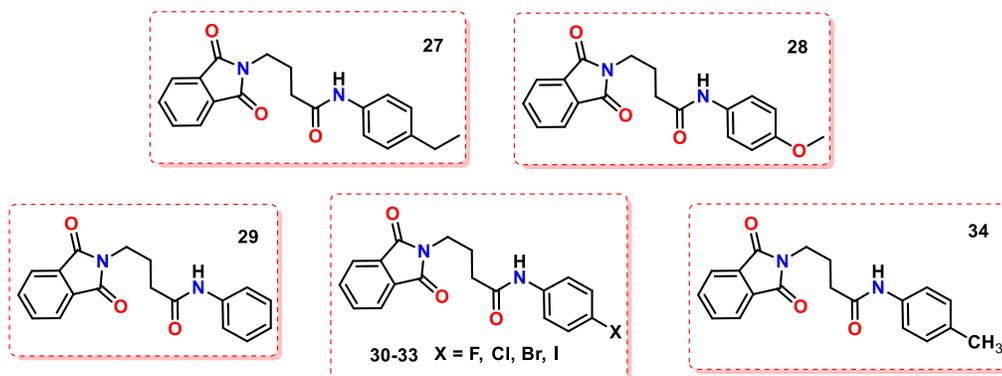


Figura 9. Inhibidores de la GABA-AT.

En la **Tabla 2** se pueden observar los resultados obtenidos de acoplamiento molecular con en blanco biológico de homología. Se encontró que todos los compuestos inhiben fuertemente al ocupar completamente el sitio activo de la proteína. Todos los inhibidores mostraron valores de energía bajos.

Tabla 2. Resultados de acoplamiento molecular de los compuestos 27-34.

Compuesto	Energía de enlace (kcal/mol)	Ki (µM)	Energía electrostática (kcal/mol)	Energía de torsión (kcal/mol)
27	-8.19	0.99	0.03	1.79
28	-6.89	8.85	-0.21	1.79
29	-7.13	5.89	-0.19	1.49
30	-7.30	4.48	-0.17	1.49
31	-7.87	1.71	-0.18	1.49
32	-8.04	1.27	-0.25	1.49
33	-7.59	2.74	-0.31	1.49
34	-8.34	0.77	-1.06	1.79

Así mismo, demostraron que sus compuestos presentaron interacciones con los mismos residuos presentes en el sitio activo como Gly164, Asp326, Val328, **Arg220**, **Thr381**, **Ser165** y Gln329. Observaron fuertes enlaces de hidrogeno con los residuos de **Arg220**, **Thr381** y **Ser165** como se observa en la **Tabla 3**. Con base a la alta actividad, fuerte unión y bajos valores de energía, ellos determinaron que estos compuestos pueden emplearse para el diseño de nuevos fármacos contra ciertas enfermedades que estén vinculadas a la proteína GABA-AT.

Tabla 3. Interacciones de enlace de hidrogeno presentes en el sitio de unión.

Compuesto	Residuo	Puente de hidrógeno	Distancia (Å)
27	Ser165	O-H	2.03
	Thr381	NH-O	1.91
28	Ser165	O-HN	2.01
29	Arg220	O-HN	2.35
	Thr381	O-HN	2.35
30	Arg220	O-HN	1.78
		O-HN	1.95
31	Arg220	O-HN	2.09
	Thr381	NH-O	1.84
32	Arg220	O-HN	2.05
33	Ser165	O-HN	2.11
	Thr381	NH-O	2.13
34	Arg220	O-HN	1.90
	Thr381	O-HN	1.83

2.2. Análogos de GABA diseñados y sintetizados en el grupo de investigación

En el grupo de investigación de Síntesis Orgánica del Dr. Mario Fernández Zertuche de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos se ha explorado la síntesis de análogos de GABA y Baclofeno, en los cuales el átomo de nitrógeno en posición γ forma parte de diferentes sistemas heterocíclicos²³, con el objetivo de aumentar la lipofilia de estos. Inicialmente, estos análogos fueron diseñados como posibles inhibidores de la enzima GABA-AT, con el objetivo de incrementar las concentraciones de GABA en el cerebro.

La primera serie de compuestos que se sintetizaron y reportaron²⁴ fueron los análogos **6a-6g**, de los cuales los compuestos **6d** y **6f** fueron los que mostraron mejores resultados de inhibición sobre la enzima GABA-AT (**Figura 10**), con un 35% y 32% de inhibición, respectivamente. En comparación con (S)-vigabatrina (42% de inhibición) no se presentó diferencia en la inhibición, debido a que los porcentajes de inhibición de estos compuestos fueron menos. Sin embargo, comparándolos con valproato sódico (23%) si se observa una diferencia significativa en los porcentajes de Inhibición de estos compuestos. Cabe mencionar que tanto (S)-vigabatrina como valproato sódico fueron empleados como controles positivos a una concentración constante de sustrato (GABA) de 0.8mM.

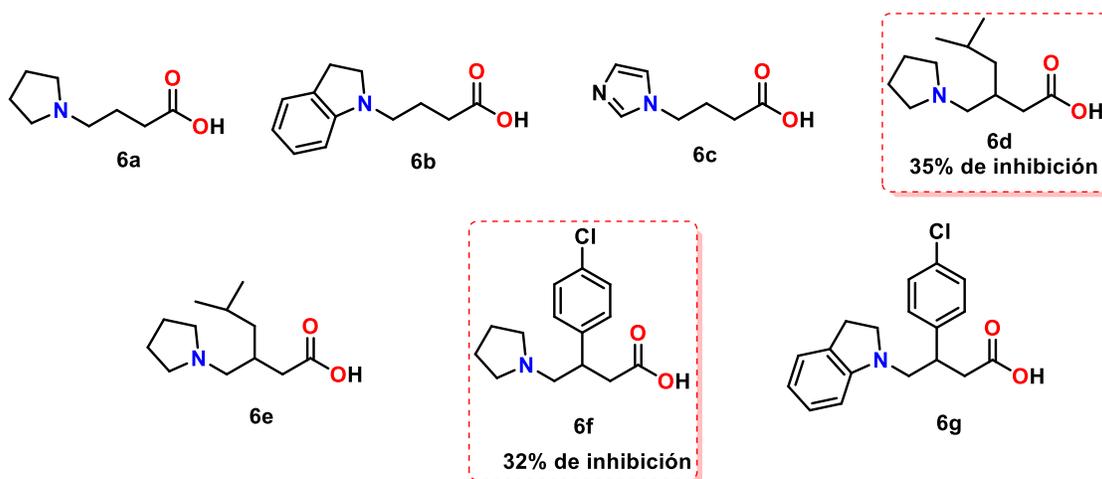


Figura 10. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

La segunda serie de compuestos sintetizados y reportados²⁵ fueron los análogos **7a-7k**, los cuales presentan similitud estructural con respecto a la primera serie de compuestos mencionados anteriormente. De esta serie, el compuesto **7i** fue el que mostró mejor perfil de inhibición con un 73% sobre la GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*, lo cual demuestra un mayor poder inhibitorio con respecto a los fármacos de control; (S)-vigabatrina y Valproato sódico, a una concentración constante de sustrato (GABA) de 0.8mM. Además, el compuesto **7i** presentó una actividad de efecto neuroprotector en ratones (**Figura 11**).

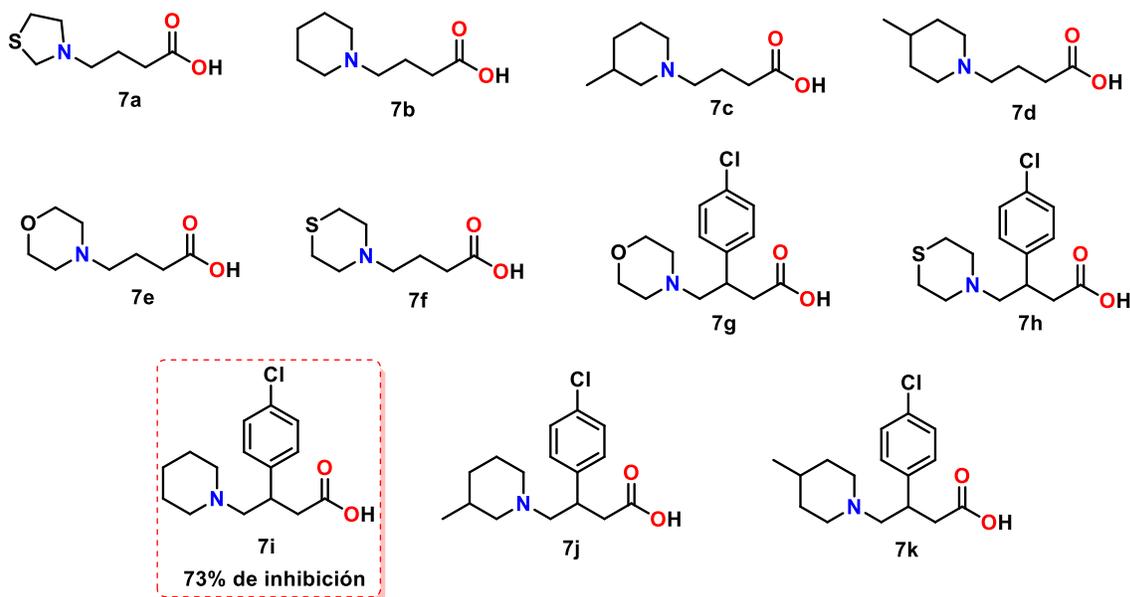


Figura 11. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

Para la tercera serie de compuestos sintetizados y reportados²⁶ se decidió explorar la química de los triazoles, con la finalidad de determinar si podrían actuar como posibles inhibidores de la GABA-AT, con base en esto, se sintetizaron los compuestos **8a-8h** (**Figura**

12)., de los cuales los compuestos **8a** presentó un 43% de actividad inhibitoria y **8b** presentó un 59% de actividad inhibitoria ambos contra la GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*. Como en los casos anteriores, la (*S*)-vigabatrina (48%) y el valproato sódico (31%) fueron empleados como controles positivos a una concentración constante de sustrato (GABA) de 0.8mM. El compuesto **8b** presentó un mayor grado de inhibición que ambos controles positivos. Sin embargo, el compuesto **8a** mostró un grado de Inhibición ligeramente menor que vigabatrina, pero superior a valproato sódico.

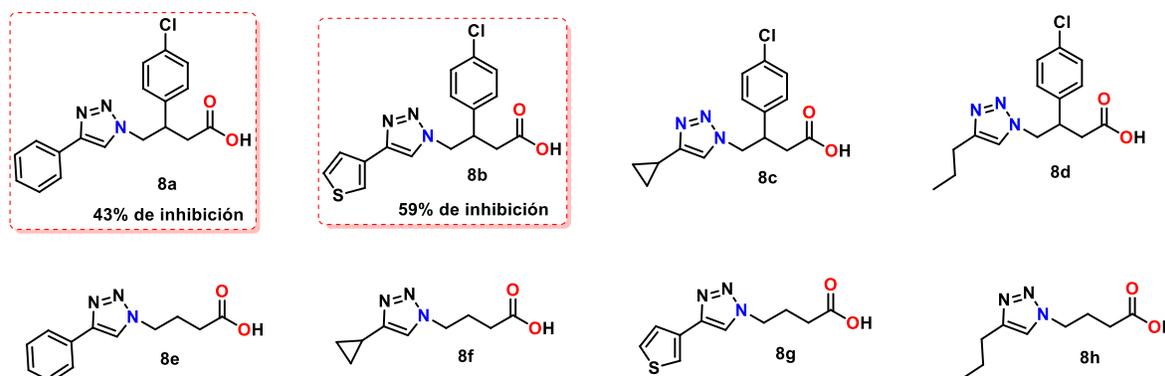
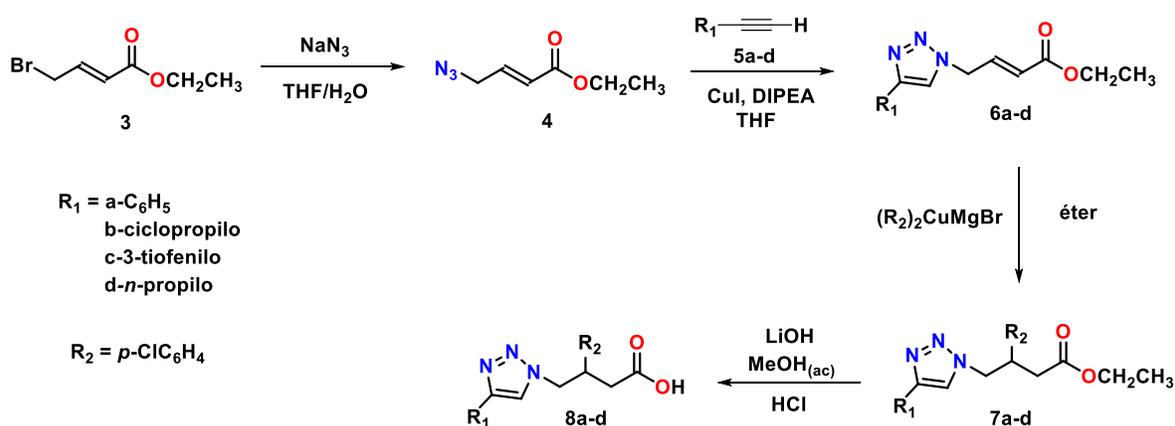


Figura 12. Análogos estructurales de GABA y Baclofeno.

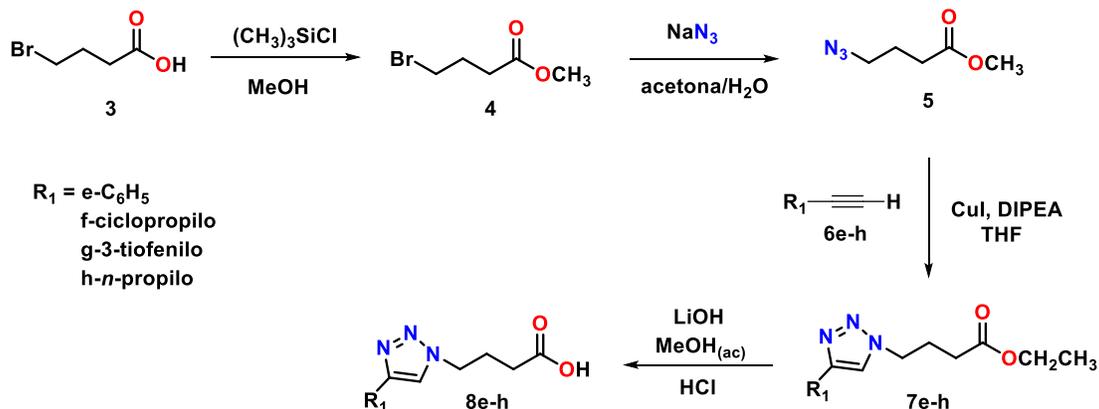
A continuación, en el **Esquema 3** se observa la metodología general de los compuestos **8a-8d**, en la cual da inicio con el compuesto α, β -insaturado **3** el cual se trata con azida de sodio, THF en medio acuoso para generar el azida **4**, la cual posteriormente, se trata con los alquinos correspondientes **5a-d**, CuI y DIPEA en THF para obtener de esta manera los triazoles **6a-d** (reacción de cicloadición 1,3-dipolar). En seguida, se realizó una adición 1,4 empleando el cuprato correspondiente para generar los compuestos **7a-d** y finalmente, se llevó a cabo una hidrolisis en medio básico, obteniendo de esta manera los análogos correspondientes **8a-d**.



Esquema 3. Síntesis general de los análogos **8a-8d**.

Por otra parte, para los compuestos **8e-8h**, se siguió la metodología mostrada en el **Esquema 4**. La cual dio inicio con el ácido **3** el cual se trató con cloro-trimetil-silano en metanol, para obtener el éster metílico **4**, posteriormente se trató con azida de sodio en una

mezcla de disolventes acetona/agua, para llevar a cabo la formación del azida **5**. En seguida, se hizo reaccionar el azida **5** con los alquinos correspondientes **6e-h**, CuI y DIPEA en THF obteniendo de esta manera los triazoles **7e-h** (reacción de cicloadición 1,3-dipolar). Finalmente, se llevó a cabo una hidrólisis en medio básico, obteniendo de esta manera los análogos correspondientes **8e-h**.



Esquema 4. Síntesis general de los análogos **8e-8h**.

Siguiendo este contexto, se decidió para este proyecto desarrollar una nueva serie de análogos, manteniendo el anillo de triazol y variando el sustituyente en posición β con respecto al ácido carboxílico, con el objetivo de predecir si existe un cambio en la interacción entre éstos y en su posible actividad inhibitoria sobre la GABA-AT. Esto con la finalidad de poder determinar que tanto influye este cambio en la parte de farmacodinamia y en la parte de farmacocinética con respecto a sus propiedades fisicoquímicas.

2.3. Estructura del triazol en química farmacéutica

Se considera que los triazoles son estructuras de gran interés dentro de la química farmacéutica, debido a que estos están relacionados en una gran variedad de compuestos con diversas actividades biológicas. En la actualidad existen fármacos que contienen el heterociclo del triazol y que fueron introducidos al mercado como fármacos activos; en este contexto, esta clase de compuestos heterocíclicos tiene gran importancia en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos²⁷, debido a que son estables a la degradación metabólica y a su capacidad de formar enlaces de hidrogeno que pueden favorecer en la unión con un blanco biológico.²⁸

Estas estructuras presentan una amplia variedad de propiedades biológicas entre las que destacan como ansiolíticos, antimicrobiano, antimicóticos, antivirales, antioxidantes, anticonvulsivas, entre otras (**Figura 13**).

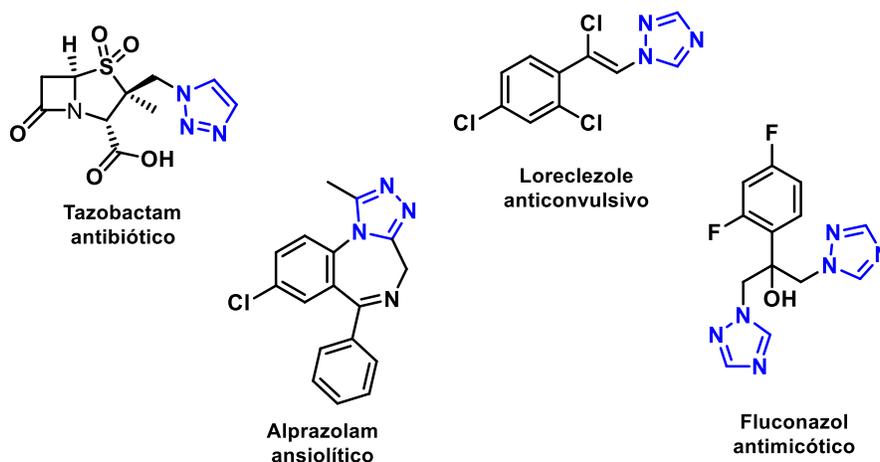


Figura 13. Fármacos con estructura de triazol.

La estructura de los 1,2,3-triazol son de interés para el desarrollo de fármacos comerciales, ya que muestran diversas actividades biológicas. Además, estas unidades son estables a la degradación metabólica y son capaces de formar puentes de hidrogeno que pueden resultar favorables en la unión de objetivos biomoleculares para mejorar la solubilidad.²⁸

2.4. Diseño racional de fármacos

El diseño racional se aplica en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, mediante un punto de vista multidisciplinario. En este sentido, se considera que su desarrollo se atribuye principalmente a los avances en informática, biología molecular, biofísica, bioquímica, química farmacéutica, farmacocinética y farmacodinámica, entre otras. La característica principal en la aplicación del diseño racional de fármacos es que utiliza todo el conocimiento teórico y experimental conocido del sistema en estudio. A su vez, tiene como objetivo reducir el costo de energía, el ahorro de tiempo y los gastos de laboratorio en el descubrimiento de fármacos.

Cabe mencionar que el diseño racional tiende a sustituir el enfoque clásico en el que se sintetizan nuevas moléculas basadas en la intuición química. Dicho lo anterior, existen algunas razones que contribuyeron a la preferencia del diseño racional frente al enfoque clásico: 1) el avance de la informática que conduce a la construcción de computadoras más potentes y "fáciles de usar"; 2) el desarrollo de datos teóricos o experimentales de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR); 3) el desarrollo de nuevas técnicas experimentales para caracterizar proteínas y blancos biológicas (rayos X y espectroscopía de RMN); entre otras. Así mismo, el desarrollo en los avances en enzimología, biología molecular, farmacocinética y farmacodinamia.²⁹

La absorción de fármacos es muy importante en el diseño racional de estos, debido a que, los fármacos tienen que atravesar una serie de barreras, ya sea mediante una difusión pasiva o una captación mediada por un portador. Uno de los parámetros principales para estimar la lipofilicidad (o solubilidad en lípidos) de compuestos químicos es el coeficiente de partición octanol/agua, (log P). El log P también se utiliza como una de las propiedades estándar identificadas por Lipinski en la "regla de 5". Si una molécula contiene

grupos básicos o ácidos, se ioniza y su distribución en octanol/agua se vuelve dependiente del pH. Por otra parte, se demostró que el coeficiente de distribución dependiente del pH, $\log D$, se correlaciona con una serie de parámetros biológicos, como la permeabilidad efectiva en el intestino, la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, unión a proteínas plasmáticas y volumen de distribución (VD). Los fármacos orales, para poder ser absorbidos por difusión pasiva, deben tener su lipofilidad dentro de un rango dado (generalmente entre 1 y 4 en la escala $\log D$). Ambos coeficientes, $\log P$ y $\log D$, son parámetros muy importantes en el desarrollo de fármacos, y, por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos para calcularlos con precisión a partir de estructuras químicas.³⁰

2.5. Diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC)

El diseño de fármacos asistido por computadora (DIFAC) es una técnica que hace uso de herramientas computacionales, ésta tiene numerosas aplicaciones específicas durante el proceso de desarrollo de fármacos, teniendo como objetivo el diseño, optimización y selección de compuestos con actividad biológica. Es por ello que esta técnica ha tenido gran importancia en la investigación y desarrollo de fármacos, siendo ampliamente utilizada en la industria farmacéutica, así como también en centros de investigación y en universidades.³¹

En las últimas décadas se ha incrementado el uso y aplicación del diseño de fármacos mediante la información estructural disponible de las macromoléculas biológicas. Hoy en día, existe un gran interés en desarrollar métodos computacionales que además de descubrir moléculas activas y optimizarlas, permitan predecir su absorción, distribución, su biotransformación, eliminación y toxicidad.³²

Muchos fármacos ejercen su acción debido a su interacción con una macromolécula presente en el organismo. Siguiendo este contexto, el DIFAC cuenta con estrategias, las cuales se dividen en dos partes principales: a) Diseño basado en la estructura del ligando; b) Diseño basado en la estructura del receptor.³²

2.5.1. Diseño de fármacos con base en la estructura del receptor

Esta estrategia considera la estructura tridimensional de la biomolécula o macromolécula, con la cual interacciona el ligando. En ella se pueden emplear procedimientos computacionales para el diseño de moléculas con actividad biológica. Una de la base de datos en la cual se pueden obtener estructuras tridimensionales es el Protein Data Bank (PDB), estas estructuras son obtenidas por cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).³³

2.5.2. Diseño de fármacos con base en el ligando

Esta estrategia se enfoca en la estructura química de la molécula con actividad biológica. Debido a que en este diseño no se tiene conocimiento del receptor, se hace uso de la información experimental disponible para una serie de estructuras químicas con actividad biológica conocida.³² El objetivo de esta es mejorar las propiedades fisicoquímicas del compuesto, así como el perfil terapéutico como el toxicológico.³⁴

2.6. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (docking) es una técnica de simulación por computadora que se emplea para predecir la conformación e interacción que se origina entre una proteína (diana terapéutica o receptor) y una molécula pequeña (ligando) generando un complejo receptor-ligando, esto mediante el uso de herramientas computacionales.³⁵

Para llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular, es necesario contar con dos elementos fundamentales: 1) la estructura del blanco biológico (estructura tridimensional); y 2) un conjunto de ligandos de interés (**Figura 14**). La estructura del blanco biológico puede ser determinada mediante técnicas experimentales como la cristalografía de rayos-X o la resonancia magnética nuclear, las cuales se encuentran disponibles en el Protein Data Bank.³⁶

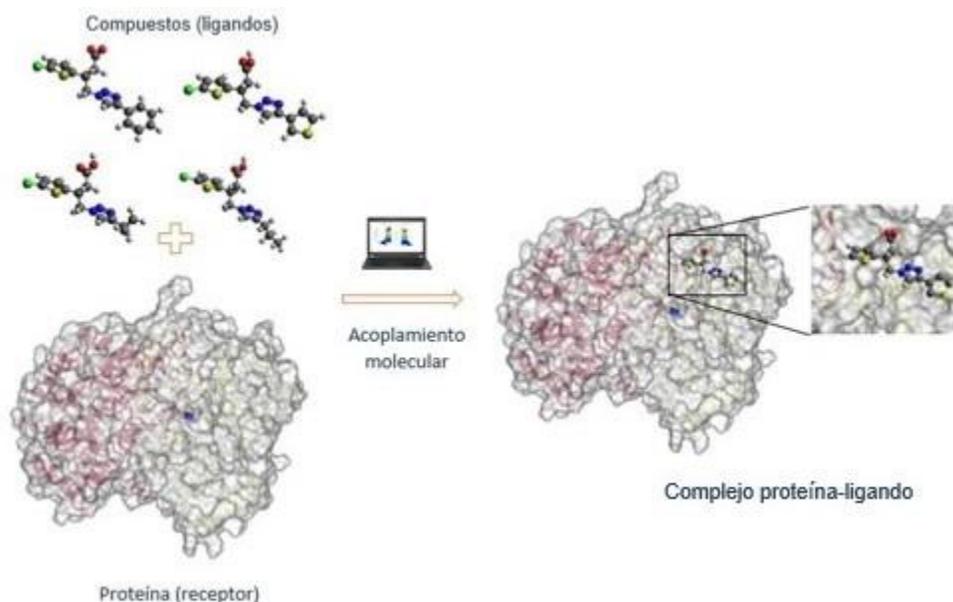


Figura 14. Proceso de acoplamiento molecular.

Esta técnica nos permite predecir la conformación del ligando en el sitio de unión del blanco biológico (poses) y las interacciones que este pueda favorecer. El proceso de acoplamiento implica dos pasos básicos: 1) la validación del método, evaluando mediante funciones de puntaje (scoring), midiendo la energía del sistema con base en la complementariedad de forma y propiedades fisicoquímicas, mediante los cuales se pueda reproducir el modo de unión del ligando; 2) la predicción de la conformación del ligando, así como su orientación dentro del sitio de unión (poses).^{35,37}

En la actualidad el acoplamiento molecular proteína-ligando se clasifica de la siguiente manera:

- acoplamiento rígido (tanto el receptor como el ligando se mantienen rígidos);
- acoplamiento con ligandos flexibles (el receptor se mantiene rígido);
- acoplamiento con ligandos rígidos (el receptor se mantiene flexible);
- acoplamiento flexible (tanto el receptor como el ligando se mantienen flexibles).³⁸

Anteriormente, Fisher³⁹ consideraba el acoplamiento molecular rígido mediante su modelo de la llave-cerradura, donde consideraba a la proteína y al ligando como moléculas rígidas; posteriormente, Koshland⁴⁰ introdujo el término del ajuste inducido, el cual hace referencia a que tanto el ligando como la proteína deberían ser flexibles en el acoplamiento.

Siguiendo el contexto anterior, todo método teórico requiere de pruebas experimentales que permitan comprobar las predicciones obtenidas en el estudio teórico. De esta manera, el acoplamiento molecular se emplea para hacer más eficiente y reducir los costos y tiempos en el desarrollo de nuevos fármacos.

2.7. Modelado estructural por homología

En los últimos años, el modelado de homología se ha convertido en una herramienta accesible para la obtención de estructuras tridimensionales (3D) teóricas de dianas moleculares. Para llevar a cabo un modelado de proteína se necesita conocer la secuencia de aminoácidos primaria y la estructura de rayos X de la proteína relacionada. Hoy en día, se ha logrado llevar a cabo la construcción de varios modelos 3D de proteínas mediante esta técnica. Sin embargo, es necesario considerar si los modelos son lo suficientemente consistentes con las estructuras experimentales para hacer de esta técnica una herramienta eficaz y confiable para el descubrimiento de fármacos.⁴¹

En este contexto, el objetivo final del modelado de proteínas es predecir una estructura a partir de su secuencia con una precisión comparable a los mejores resultados obtenidos experimentalmente (**Figura 15**). Esto permitirá utilizar de forma segura modelos de proteínas *in silico*, que contribuyan al estudio de diseño de fármacos basado en la estructura, así como al análisis de la función de una proteína y al estudio de interacciones presentes en una proteína.⁴²

El desarrollo para la construcción del modelado por homología implica lo siguiente:

- 1.- Identificación de la plantilla: Es decir, se debe tener una estructura 3D experimental conocida, obtenida de algún banco de datos de proteínas (PDB)
- 2.- La alineación de las secuencias: Las plantillas se alinean con la secuencia objetivo para establecer la correspondencia espacial entre los residuos de aminoácidos, utilizando software o algoritmos (SwissModel, Modeler y Raptor). Las identidades secuenciales >25% sugieren que la plantilla y el objetivo tienen estructuras 3D similares, por lo tanto, la plantilla es adecuada para el modelado.
- 3.- La generación de las coordenadas del modelo: Las coordenadas de la hélice α y las hojas β del modelo, generalmente se definen en función de la estructura de la plantilla más similar, cambiando diferentes residuos en la plantilla por sus residuos correspondientes en la proteína objetivo.
- 4.- La optimización: Para eliminar o minimizar las interacciones desfavorables entre átomos no unidos covalentemente.
- 5.- La validación del modelo: Mediante un análisis estereoquímico de la consistencia del modelo, mediante parámetros como: distribución de los ángulos de torsión, cadena

principal, distribución de los ángulos de rotación. Esto con el fin de corregir errores experimentales y de interpretación.⁴¹

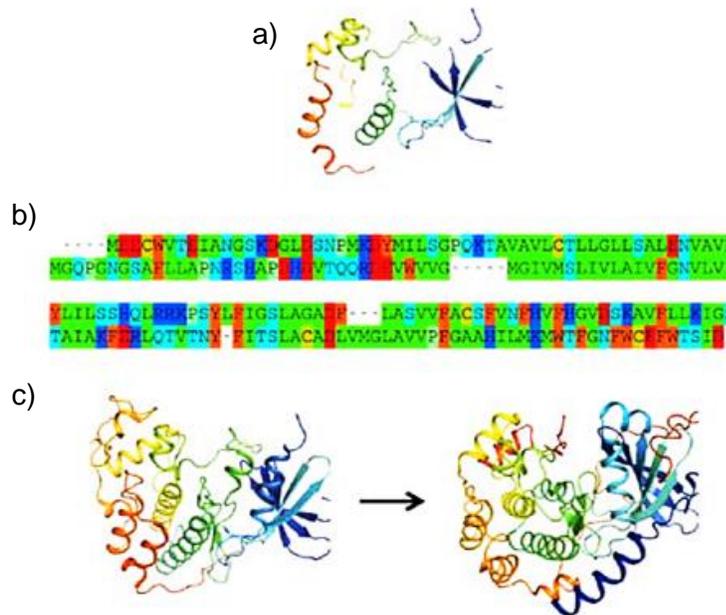


Figura 15.- Proceso general de modelado por homología. a) identificación de una estructura 3D conocida que sirve como plantilla; b) alineamiento de las secuencias de la plantilla y la diana para asignar la correspondencia entre los residuos de la plantilla y la diana. c) se construye un modelo para el objetivo basado en la alineación y la estructura de la plantilla.⁴³

2.8. Análisis de modo normal (eINémo)

El análisis de modo normal (NMA) es una herramienta que permite predecir los posibles movimientos de una macromolécula de interés. Hoy en día se ha demostrado que los movimientos de proteínas pueden modelarse utilizando los modos normales de baja frecuencia. Las aplicaciones de la NMA cubren amplias áreas de la biología estructural, entre las que destacan el estudio de los cambios conformacionales de las proteínas en la unión del ligando, la apertura y el cierre de los canales de la membrana.

En la **Figura 16** se puede observar un ejemplo de las direcciones de los movimientos esquematizados (flechas) de una proteína.⁴⁴ El NMA se apoya de eINémo, el cual es un servidor que proporciona una herramienta útil para calcular, visualizar y analizar modos normales de baja frecuencia de grandes macromoléculas que contribuyan al movimiento de proteína correspondiente.

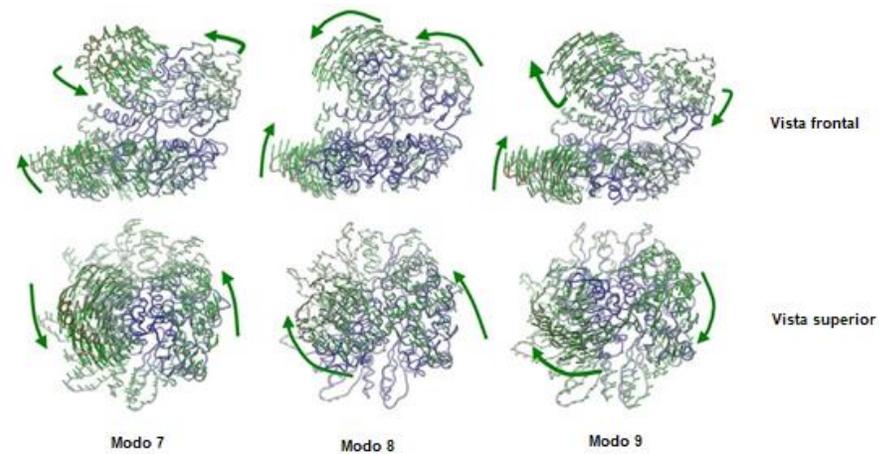


Figura 16. Las direcciones de los movimientos de una proteína. ⁴⁵

Además, permite observar si existe un cambio en los residuos de aminoácidos en cada modo, incluso se puede observar diferencias de tamaño y forma en el sitio catalítico. En este contexto, para cada modo se obtiene su grado de colectividad de movimiento y el desplazamiento de todos los residuos ahí presentes, considerando esto, se toman en cuenta los primeros modos que corresponden al movimiento traslacional y rotacional, además de la elasticidad y vibraciones.

En otras palabras, los modos normales nos permiten observar una variación en los residuos presentes en el sitio de unión, incluso se logran observar diferencias en las interacciones y en la orientación de las moléculas con respecto a cada modo. Un ejemplo de esto se observa en la **Figura 17**, se observa una cavidad abierta, también, se observa el acomodado de los residuos en esa región (lado izquierdo); mientras que por otra parte (lado derecho) se observa más cerrada la cavidad debido a los movimientos de la proteína, incluso se observa un pequeño aumento en el número de residuos ahí presentes.

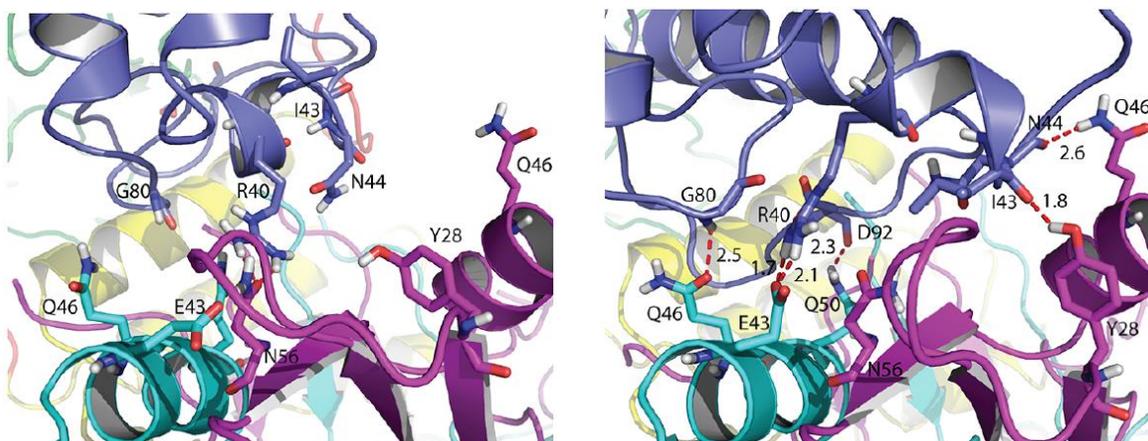


Figura 17. Esquematización de diferencias en diferentes modos normales. ⁴⁵

Además, debido al hecho de que el 50% de los movimientos de proteínas observados pueden describirse con precisión mediante solo uno o dos modos normales de

baja frecuencia, la NMA representa una herramienta útil para una amplia gama de aplicaciones en biología estructural y cristalografía de rayos X.⁴⁴

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los métodos computacionales han contribuido significativamente al desarrollo de medicamentos que se encuentran en uso clínico. Estos permiten entender el modo de unión de moléculas activas de interés dentro del diseño de fármacos, ya que permite la optimización de estructuras moleculares que puedan tener alguna actividad biológica deseada.

Para este proyecto, se llevará a cabo el diseño de nuevos posibles inhibidores de la enzima GABA-AT, considerando la estructura química del anillo de triazol (estructuras andamio) sintetizados y reportados en el grupo de investigación, los cuales presentaron actividad inhibitoria sobre la GABA-AT de *P. fluorescens*. Con base en esto, se proponen los siguientes puntos:

- 1) Mantener el átomo de nitrógeno en posición γ y el ácido carboxílico con base a la estructura química de GABA.
- 2) Incorporar un sistema heterocíclico de triazol, con una variedad de sustituyentes en este sistema, el cual posiblemente ayude a favorecer las interacciones con el blanco biológico.
- 3) Introducir un anillo aromático (5-clorotiofeno) en la posición β con respecto al grupo ácido carboxílico, que permita favorecer la lipofilia, la cual es importante para que los compuestos sean permeables a las membranas.

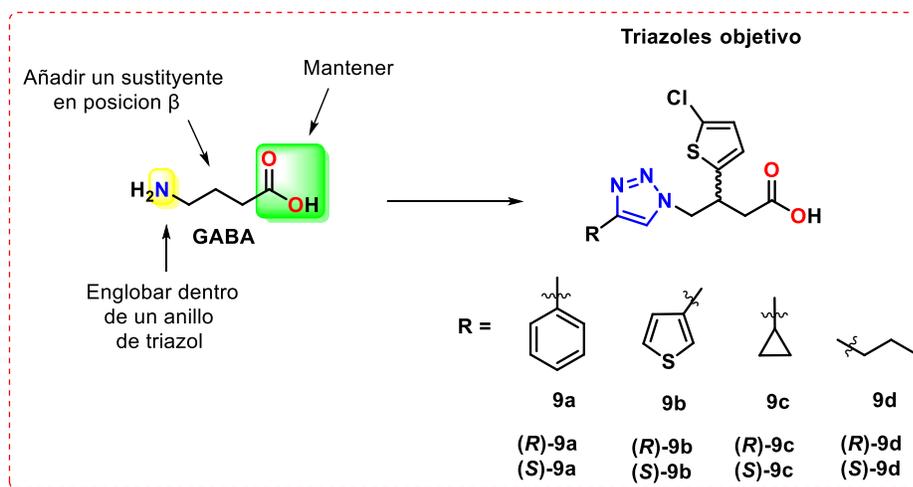
4. HIPÓTESIS

Los análogos estructurales de GABA, con un anillo 1,2,3-triazol-1,4-disustituido y un sustituyente aromático en el carbono tres, son potenciales inhibidores de la enzima GABA-AT.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Llevar a cabo el diseño *in silico* de nuevos análogos de GABA con estructura 1,2,3-triazol-1,4-disustituido, con una variedad de sustituyentes en este sistema e incorporando un sustituyente aromático en posición β con respecto al ácido carboxílico.



5.2. Específicos

- Identificar el sitio de unión de los modelos de homología de GABA-AT de *P. fluorescens* y de humano, y determinar sus descriptores de tamaño y forma.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular a las moléculas de GABA y vigabatrina; obtener su orientación en el sitio de unión y el tipo de interacciones que presentan.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular a los compuestos de referencia (**8a-d**) e interpretar sus interacciones ligando-enzima.
- Predecir la actividad inhibitoria de los análogos de interés (**9a-d**), evaluando su modo de unión y el tipo de interacciones intermoleculares.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este proyecto se planificó una nueva serie de análogos de GABA, con base en la estructura química de los triazoles de referencia (**8a-d**, **Figura 18a**), en los cuales se mantuvieron algunos grupos funcionales como: el ácido carboxílico, el átomo de nitrógeno en posición γ (anillo de triazol) y los sustituyentes en el anillo de triazol. Considerando esto ya que son grupos que favorecen las interacciones con el receptor.

Por otra parte, se decidió realizar una modificación estructural en posición β , cambiando el grupo *p*-clorofenilo por el grupo 5-clorotieno, esto con la finalidad de que se pudiera favorecer la lipofilia de las moléculas objetivo y poder observar si existe un incremento en el número de interacciones en el sitio de unión (**Figura 18b**).

En la **Tabla 4** se observan los valores de logP y logD de los compuestos de referencia y los compuestos objetivo, se observa que estos últimos se encuentran en el rango de 2 con relación a los andamios de referencia, lo cual da indicios de que mantienen una lipofilia. Además, los valores de logD el cual es el descriptor apropiado para compuestos ionizables ya que es una medida de la solubilidad diferencial dependiente del pH de todas las especies en el sistema octanol / agua.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de todos los compuestos.

Compuesto	logP	logD
GABA	-1.37	-2.89
Vigabatrina	-1.17	-2.09
8a	2.94	1.13
8b	2.72	1.24
8c	2.25	-0.10
8d	2.27	0.24
9a	2.83	1.39
9b	2.46	1.07
9c	1.91	0.14
9d	2.33	0.47

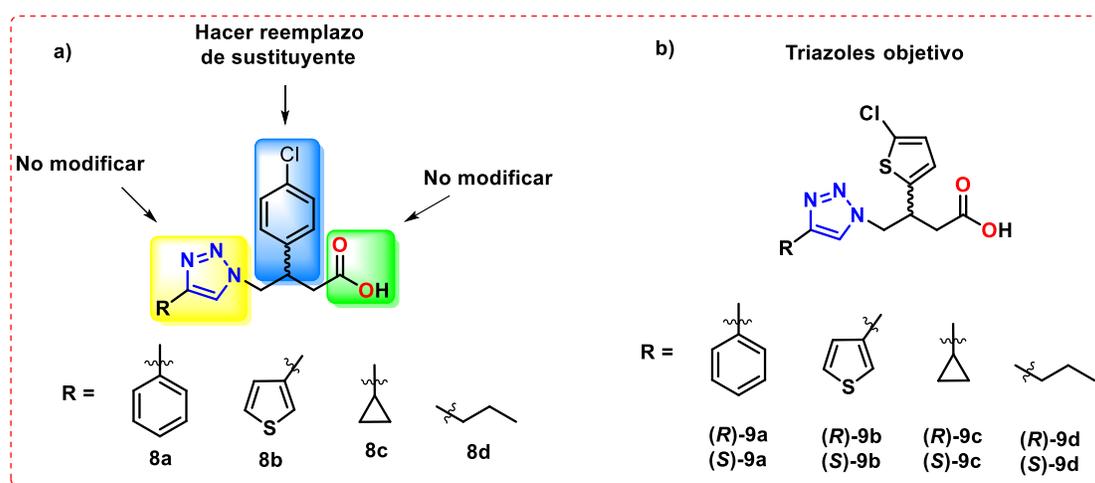


Figura 18. a) Triazoles de referencia; b) Triazoles objetivo.

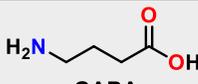
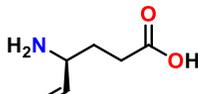
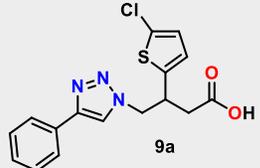
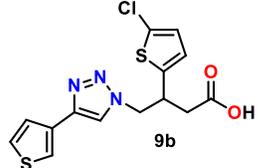
6.1. Propiedades moleculares de los análogos de GABA

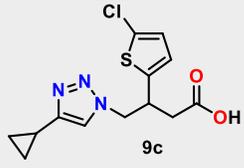
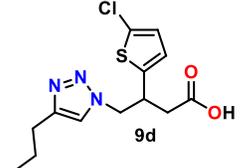
Mediante estudios experimentales y computacionales llevados a cabo por Lipinski⁴⁶ y colaboradores, se ha podido determinar que para que un fármaco sea permeable a las membranas, tenga mayor absorción en el cuerpo, y tenga altas probabilidades de llegar a ser un fármaco comercial, debe de cumplir con ciertas características:

- Un peso molecular menor a 500 u.m.a.
- Un ClogP (solubilidad en lípidos) menor de 5.
- Menos de 5 donadores de puente de hidrógeno (expresado como la suma de OH y NH).
- Menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (expresado como la suma de O y N).

Hoy en día, existe la posibilidad de predecir las propiedades moleculares de un compuesto con base en su estructura y mediante servidores gratuitos disponibles en la red. Los análogos de GABA propuestos en este proyecto fueron evaluados mediante el servidor *Molinspiration*, el cual permite predecir sus propiedades moleculares; pudiendo observar en la **Tabla 5** que cumplen con los parámetros que hacen referencia a las reglas de Lipinski; cumpliendo con presentar un peso molecular menor a 500 u.m.a., un ClogP dentro del valor recomendable y en el rango de grupos, tanto donadores como aceptores de H.

Tabla 5. Propiedades moleculares de los análogos de GABA.

Molécula	ClogP	logD	Donadores de H	Aceptores de H	Peso molecular (g/mol)
 GABA	-1.37	-2.89	2	3	103.12
 Vigabatrina	-1.17	-2.09	2	3	129.16
 9a	2.83	1.39	1	5	347.83
 9b	2.46	1.07	1	5	353.86

 <p>9c</p>	1.91	0.14	1	5	311.79
 <p>9d</p>	2.33	0.47	1	5	313.81

Cabe mencionar que la absorción de fármacos es un tema de gran interés en su diseño, ya que estos tienen que atravesar una serie de barreras en el organismo, ya sea mediante una difusión pasiva o una captación mediada por un portador. El coeficiente de partición 1-octanol/-agua, logP, se acepta como uno de los principales parámetros para evaluar la lipofiliidad de los compuestos de interés farmacéutico, este permite determinar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos.

El ClogP es utilizado como una propiedad estándar determinada para posibles moléculas con actividad biológica en la "regla de 5" de Lipinski. Esta propiedad describe la partición de la forma neutra únicamente. Si una molécula contiene grupos básicos o ácidos, puede ionizarse y su distribución en la mezcla de 1-octanol/-agua se vuelve dependiente del pH.⁴⁷

6.2. Modelos de homología de GABA-AT

Previamente, en el grupo de investigación se realizaron modelos estructurales de homología, considerando que la estructura cristalina (3D) de la GABA aminotransferasa (GABA-AT) de *Pseudomonas fluorescens* y de humano no se encuentran disponibles, se generaron modelos estructurales de homología (con el programa MODELLER 9.18), empleando estructuras de GABA-AT disponibles en el servidor de banco de datos de proteínas (PDB) como plantillas estructurales. De acuerdo con la alineación de secuencias de las GABA-AT (**Tabla 6**), las de bacterias son similares entre ellas y lo mismo sucede para las GABA-AT de animales (jabalíes).

Tabla 6. Estructuras cristalinas de GABA-AT disponibles en el servidor PDB.

PDB	Resolución (Å)	Organismo	% de Identidad con respecto a la de humano	% de Identidad con respecto a <i>P. fluorescens</i>
4zsw	1.70	Jabalí	95.46	27.52
4y0h	1.63	Jabalí	95.46	27.52
4y0i	1.66	Jabalí	95.46	27.52
1ohv	2.30	Jabalí	95.46	27.52
1ohw	2.30	Jabalí	95.46	27.52
1sf2	2.40	<i>E. coli</i>	26.35	73.82
4ffc	1.80	<i>M. abscessus</i>	27.99	42.79

Para el modelo GABA-AT de *P. fluorescens*, se hizo uso de la estructura cristalográfica 1sf2 de *E. coli*. Se utilizó esta estructura, debido a una mejor identidad con respecto a la aminotransferasa de *M. abscessus* (73%). Nuevamente, se usaron las cadenas A y B para construir los monómeros y el dímero se ensambló de acuerdo con la estructura 1sf2.²⁴

Para el modelo de GABA-AT de humano se utilizó la estructura cristalográfica 4y0h de jabalí, la cual mostró una resolución de 1,63 Å y una mayor identidad de secuencia (95%) a la enzima humana. Las cadenas A y B se utilizaron para construir los monómeros. Posteriormente, se ensambló el dímero en base a la misma estructura de 4y0h.

Para incorporar el grupo protésico (PLP) en los modelos de homología anteriores, se realizó una alineación empleando una estructura cristalina que poseía el PLP (3r4t y 1ohw para los modelos *Pseudomonas* y humanos respectivamente). Finalmente, para optimizar las estructuras completas de los modelos GABA-AT, se usó el campo de fuerza CHARMM36 dentro de CHARMM38b1, para agregar átomos de hidrógeno y llevar a cabo una minimización decente, fijando todos los átomos pesados, seguida de una minimización de gradiente conjugado de la estructura para eliminar malos contactos y choques.²⁴ Estas últimas estructuras proteicas obtenidas se utilizaron para realizar los cálculos de acoplamiento molecular a todos los análogos sintetizados en el grupo de investigación.

6.3. Estudio de acoplamiento molecular

En el grupo de investigación se han diseñado y sintetizado diversas series de compuestos como análogos de GABA, los cuales han sido evaluados biológicamente *in vitro* sobre la GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens* mediante una prueba preliminar de potencial inhibitorio. Algunos de estos compuestos presentaron actividad inhibitoria sobre la misma, los resultados obtenidos de estos estudios han sido reportados en la literatura.^{24,25,26} Con base en esto, para este proyecto se decidió continuar con este modelo proteico, el cual permitirá predecir de manera *in silico* la interacción ligando-enzima.

El acoplamiento molecular nos permitió predecir los modos de unión entre nuestras moléculas de interés y el blanco biológico, determinando la orientación y conformación óptima de unión entre éstos, además, nos permitió estimar la estabilidad del complejo. Esto nos permitió predecir si actúan como posibles inhibidores de la enzima GABA-AT. A su vez, nos permitió determinar qué interacciones permanecen y cuáles se modifican al unirse con la GABA-AT de *P. fluorescens* y de humano.

6.4. Modelos de homología GABA-AT de *P. fluorescens* y humano

Antes de llevar a cabo el estudio de acoplamiento molecular, se lograron determinar algunas de las diferencias que existen entre estos dos modelos de homología que se utilizaran para llevar a cabo el estudio. En la **Figura 19a** se observa el modelo de homología de la GABA-AT de *P. fluorescens*, en la cual se puede observar la forma de la cavidad (morado) y el grupo prostético piridoxal fosfato (PLP) como esferas de Van der Waals (roja, azul, gris); en la parte izquierda de la figura se encuentran residuos de Tyr300, Thr299, Gln81, Gly298, Gly297 y Gly294, zona hidrófoba; mientras que en la parte derecha de la figura se encuentran los residuos de Ser391, Tyr157, Arg143, Arg400, Lys153, haciendo que esta zona sea hidrofílica, es decir, más cercana al solvente. Residuos a 6 Å de la cavidad.

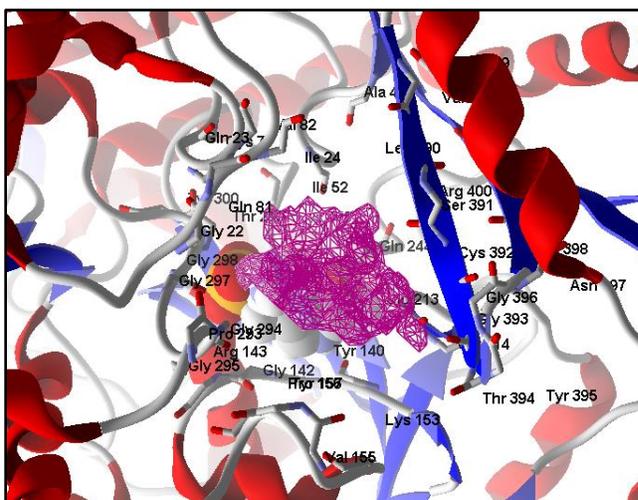


Tabla 7a. Descriptores de la cavidad

Drug score	0.81
Superficie	1015.28 Å ²
Volumen	1337.78 Å ³
Profundidad	25.08 Å
Hidrofobicidad	0.13

Figura 19a. Modelo GABA-AT de *P. fluorescens*.

En la **Tabla 7a** se pueden observar características de la cavidad en la cual se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento molecular de los compuestos de interés. Cabe mencionar que la cavidad de este modelo se encuentra presente en medio del dímero de la proteína, razón por la cual se emplea la proteína completa en el acoplamiento molecular. Los cálculos se realizaron sobre el sitio catalítico con un volumen de cavidad de 1337.78 Å³

En la **Figura 19b**, se observa el modelo de homología de la GABA-AT de Humano, en la cual se observa la forma de la cavidad (morado) y el grupo prostético piridoxal fosfato (PLP) como esferas de Van der Waals (roja, azul, gris); en la parte izquierda de la imagen se pueden observar residuos de Ala92, Trp344, Ile95, Thr343, Asn342, Phe341, Tyr338 y Pro337, parte hidrófoba; mientras que en la parte derecha de la imagen se encuentran residuos de Glu260, Arg182, Tyr59, Gly430, Lys193, Arg435. Residuos, a 6 Å de la cavidad.

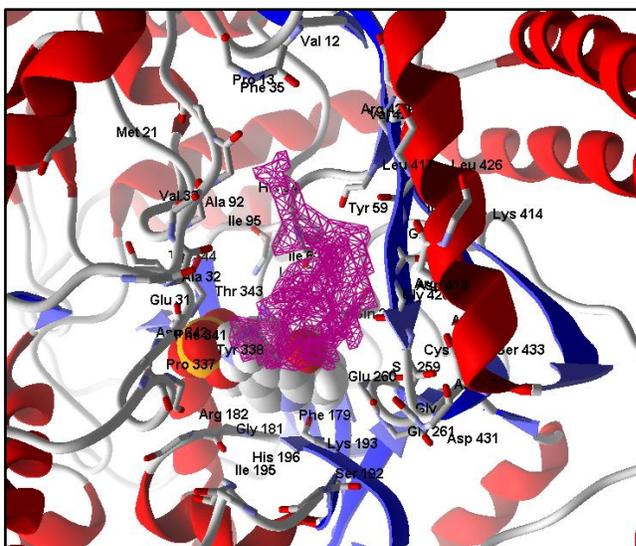


Tabla 7b. Descriptores de la cavidad.

Drug score	0.8
Superficie	2291.31 Å ²
Volumen	2462.03 Å ³
Profundidad	35.74 Å
Hidrofobicidad	0.24

Figura 19b. Modelo GABA-AT de humano.

En la **Tabla 7b** se pueden observar características de la cavidad en la cual se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento molecular de los compuestos de interés.

Como en el modelo anterior, la cavidad se encuentra presente en medio del dímero de la proteína, razón por la cual se emplea la proteína completa en el acoplamiento molecular. De igual manera, con base a estos datos se puede determinar que este modelo proteico presenta una cavidad de mayor tamaño y forma con respecto al modelo proteico de *P. fluorescens*. Aquí se logró observar que, las moléculas se anclaron de mejor manera en este modelo, debido a que la cavidad era más grande, permitiendo el acomodo de las moléculas mejor que en modelo de *P. fluorescens*. Además, se observó un aumento en el número de interacciones con diferentes residuos de aminoácidos.

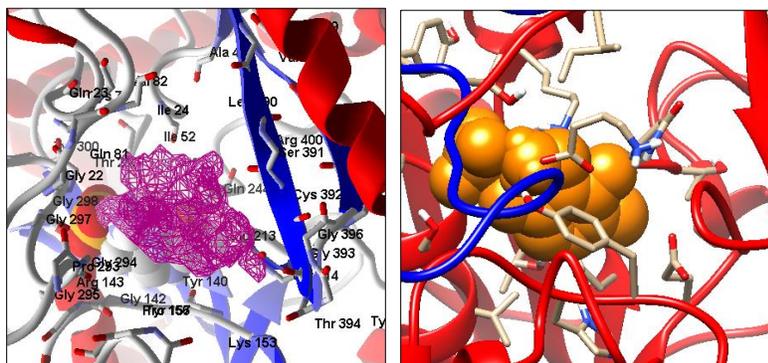
El Drug score es un algoritmo completamente automático para la predicción de la capacidad de administración de fármacos⁴⁸, es decir, permite realizar una predicción de la farmacibilidad en una proteína. Está dada por las propiedades globales de la cavidad, teniendo como objetivo enfermedades, lo cual permite el desarrollo de fármacos siendo, de gran relevancia en la investigación farmacéutica.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del acoplamiento molecular, efectuados en los modelos antes mencionados. Empleando las estructuras de **GABA** y **vigabatrina**. También se emplearon las moléculas **8a-d** como andamios de referencia para este proyecto. Así mismo, se muestran resultados de docking de los triazoles objetivo (**9a-d**).

6.5. Acoplamiento molecular sobre el modelo proteico de *P. fluorescens*

6.6. Acoplamiento molecular de los compuestos GABA y vigabatrina

En la **Figura 20** se puede observar el modo de unión de **GABA** en el sitio catalítico del modelo proteico antes mencionado. Se observa que la molécula presenta seis interacciones con cuatro aminoácidos, tres de estas mediante de puente de hidrógeno, una con la $^+NH_3$ de la Arg143 y el oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.65 Å y las otras dos interacciones con los hidrógenos de la Tyr140 a 2.90 Å y Tyr157 a 2.08 Å y el oxígeno del carbonilo (verde). Así mismo, presenta dos interacciones de puente salino, iónicas, incluso electrostáticas, entre la $^+NH_3$ de la molécula y los oxígenos de la Glu213 a 2.37 Å y 2.80 Å, respectivamente (amarillo). $\Delta G = -3.6$ (kcal/mol).



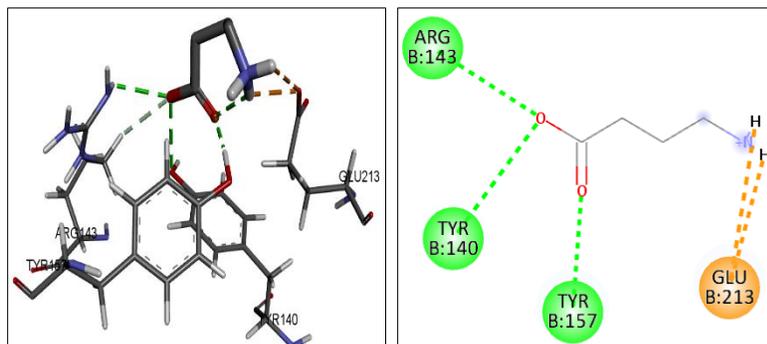


Figura 20. Interacciones de la molécula de GABA en el sitio catalítico.

La molécula de (*S*)-vigabatrina, interacciona con seis aminoácidos del sitio de unión (**Figura 21**). Presenta interacciones de puente de hidrógeno con los H de Thr299 y el oxígeno del carbonilo a 2.73 Å, una misma interacción entre el H de la Tyr140 con el oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.64 Å (verde), por otra parte, una interacción más de puente de hidrógeno entre el H de la Gly298 y el oxígeno del carbonilo a 2.90 Å (verde). Además, presenta una interacción de puente salino entre el oxígeno del carbonilo de Glu213 a 2.33 Å con la ⁺NH₃ de vigabatrina (amarillo). Por otra parte, presenta interacciones desfavorables (donadores de hidrógeno) con los residuos de aminoácidos de Tyr157 y Arg143 con la ⁺NH₃ de la molécula a 2.64 y 4.98 Å (rojo). $\Delta G = -4.4$ (kcal/mol).

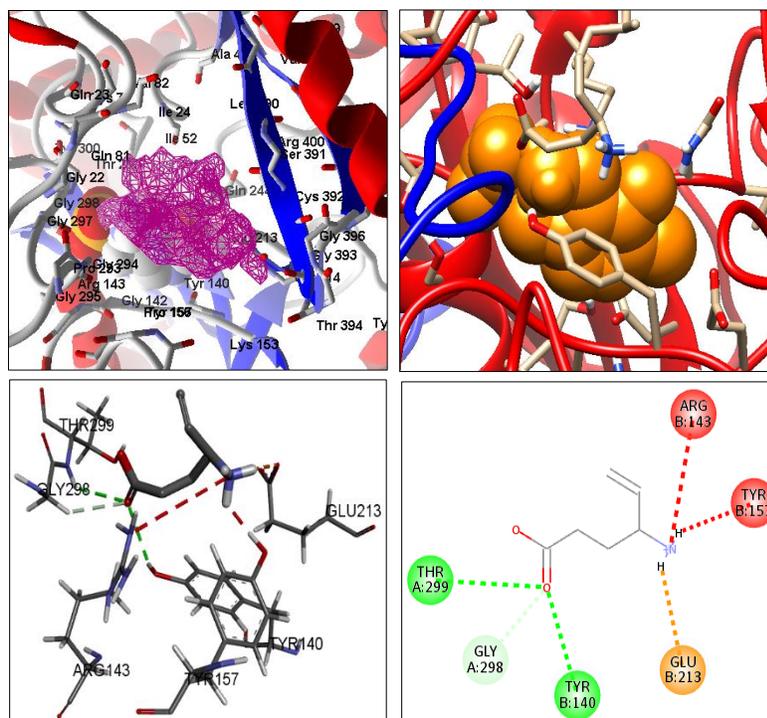


Figura 21. Interacciones de (*S*)-vigabatrina en el sitio catalítico.

6.7. Acoplamiento molecular de los compuestos de referencia (8a-8b)

Cabe mencionar que debido a que los compuestos **8a-8b** se presentan en forma racémica, su acoplamiento molecular se realizó en su forma enantioméricamente pura, dentro del sitio activo del modelo proteico. Las interacciones de los compuestos de referencia faltantes se encuentran en la parte de Anexos, debido a que estos presentaron menor energía, mostrando en la parte de resultados los compuestos que más favorecieron en el estudio de acoplamiento molecular.

El compuesto (*R*)-**8a** presenta interacción con seis aminoácidos, como se muestra en la **Figura 22**, en esta se observan tres interacciones de enlace de hidrógeno, dos con los residuos de Glu213 y Gly393, con el oxígeno del carbonilo de la molécula y los H de los residuos a 3.29 y 3.32 Å; la tercera interacción se presenta entre el átomo de N del anillo de triazol y la Arg400 a 3.00 Å (verde); además presenta una interacción π -alquilo con los -CH₃ de la Ile52 y los electrones π del anillo de fenilo a 4.72 Å (rosa), con el mismo fenilo presenta interacciones π -azufre con el residuo de Cys79 a 5.44 Å (amarillo); así mismo, presenta interacciones de tipo π -catión con los electrones π del sustituyente cloro-fenilo y la +NH₃ de la Lys153 a 3.50 Å (naranja). $\Delta G = -7.5$ (kcal/mol).

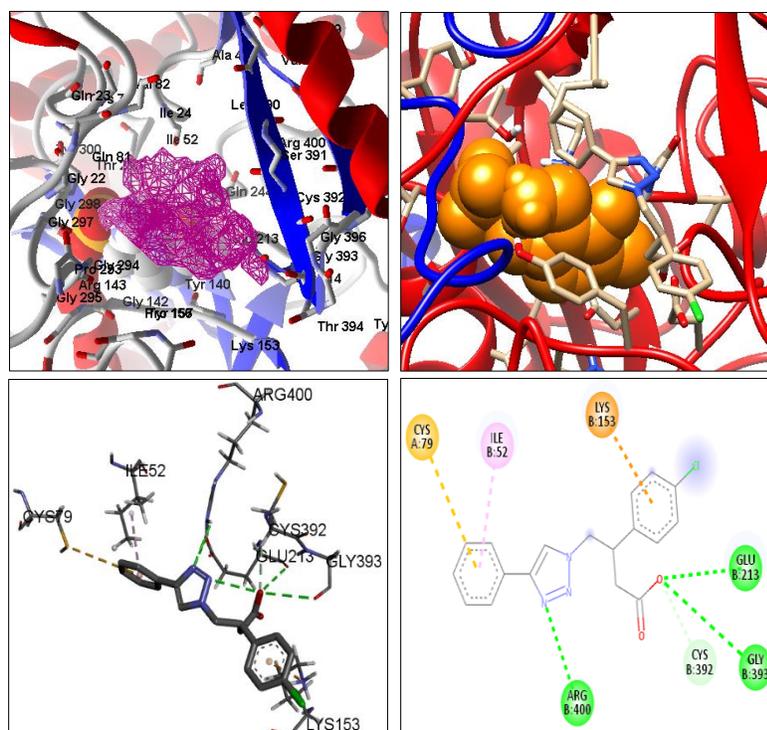


Figura 22. Interacciones de (*R*)-**8a** en el sitio catalítico.

En la **Figura 23** se puede observar que para el compuesto (*S*)-**8a** se presentan cuatro interacciones de tipo puente de hidrógeno entre el hidrógeno del -OH terminal de la Ser391 y el oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.14 Å (verde), así mismo con el hidrógeno del -OH de la Tyr157 y el átomo de N del anillo de triazol a 2.52 Å, de igual manera con los hidrógenos -CH₂ de la Cys392 y el oxígeno del carbonilo de la molécula a

2.82 Å y finalmente con los hidrógenos $-CH_2$ de la Gly396 y el oxígeno del carbonilo a 2.98 Å (gris). Esta misma molécula presenta interacciones de tipo π -azufre y π -anión, entre el azufre de la Cys79 (amarillo) y el oxígeno del carbonilo de la Glu213 (naranja) con los electrones π del sustituyente aromático del anillo de triazol a 5.31 y 4.78 Å, respectivamente. Así mismo presenta interacciones π -alquilo con los electrones π de los fenilos y los residuos de Pro156 e Ile52 a 3.95 y 4.71 Å, respectivamente (rosa); mientras tanto con el $-CH_3$ la Val155 presenta interacciones hidrofóbicas con el átomo de Cl de la molécula a 5.02 Å (rosa). $\Delta G = -7.2$ (kcal/mol).

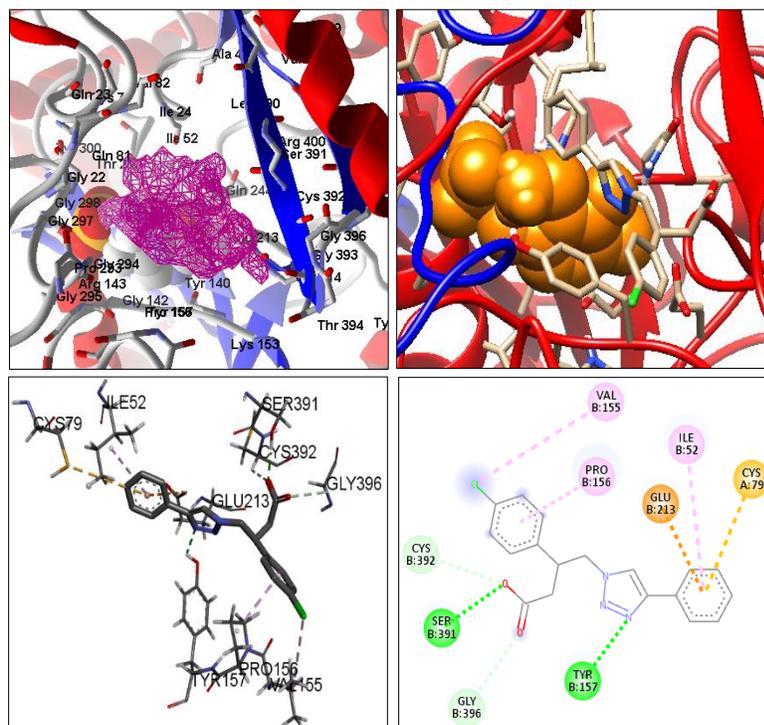


Figura 23. Interacciones de (S)-8a en el sitio catalítico.

En el caso del compuesto (R)-8b este presenta dos interacciones de enlace de hidrógeno con la Gly393 (verde) y con la Cys392 (gris) ambas con el oxígeno del carbonilo de la molécula a 3.39 y 2.67 Å, respectivamente, como se observa en la **Figura 24**; esta misma presenta interacciones de π -azufre, mediante los electrones π del anillo de tiofeno y el azufre de la Cys79 a 5.75 Å (amarillo); por otra parte, presenta interacciones de tipo π -catión con la Lys153 y el anillo de cloro-fenilo, y con Arg400 y el anillo de tiofeno a 3.47 y 4.97 Å, respectivamente, así como interacciones de tipo π -anión con los electrones del anillo de triazol y el oxígeno del carbonilo de la Glu213 a 4.70 Å (naranja). Finalmente presenta interacciones de tipo π -alquilo con los electrones del anillo de tiofeno y el grupo $-CH_3$ de la Ile52 a 4.97 Å (lila). $\Delta G = -7.7$ (kcal/mol).

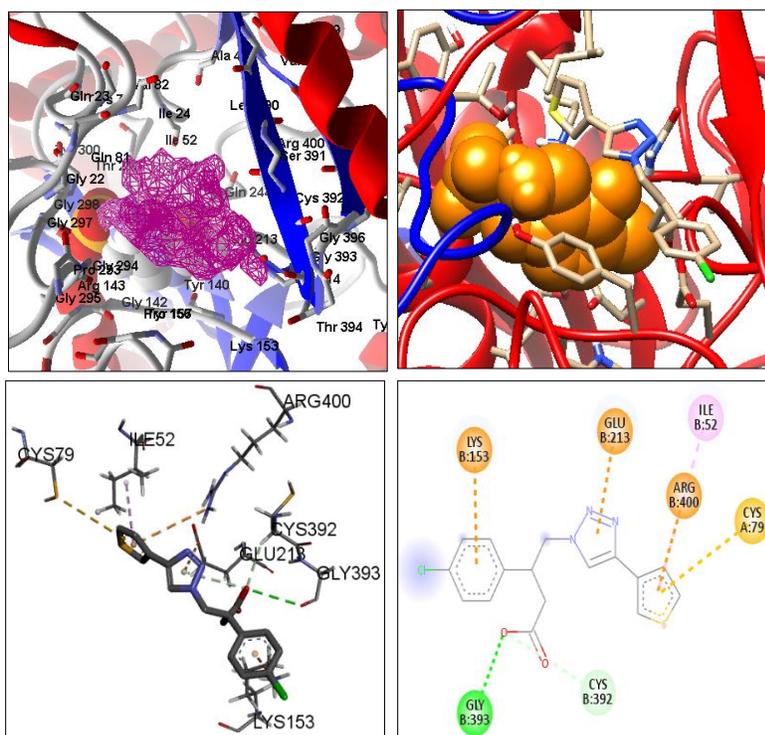


Figura 24. Interacciones de (*R*)-**8b** en el sitio catalítico.

Para el caso del compuesto (*S*)-**8b**, **Figura 25**, este presenta diferentes tipos de interacciones, entre las que destacan las de puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de la molécula y los hidrógenos de los residuos de Cys392 y Lys153 a 2.51 y 2.94 Å, respectivamente (gris), así mismo, entre los oxígenos de la Glu213 y el H del anillo de triazol a 3.70 Å (gris), otra interacción de puente de hidrógeno mediante el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula y la Tyr157 a 2.97 Å (verde). Así mismo, se observan interacciones de tipo π -catión entre los electrones del anillo de tiofeno y del triazol con la $^+NH_3$ de la Arg143 y Arg400 a 4.14 y 4.92 Å, respectivamente (naranja); interacciones π -azufre entre los electrones del anillo de tiofeno y el átomo de azufre de la Cys79 a 5.80 Å (amarillo); además de interacciones π -alquilo entre los electrones el anillo de tiofeno y el -CH₃ de la Ile52, de igual manera entre los electrones del anillo de cloro-fenilo y la Pro156 a 5.01 y 4.08 Å, respectivamente (lila). $\Delta G = -7.3$ (kcal/mol).

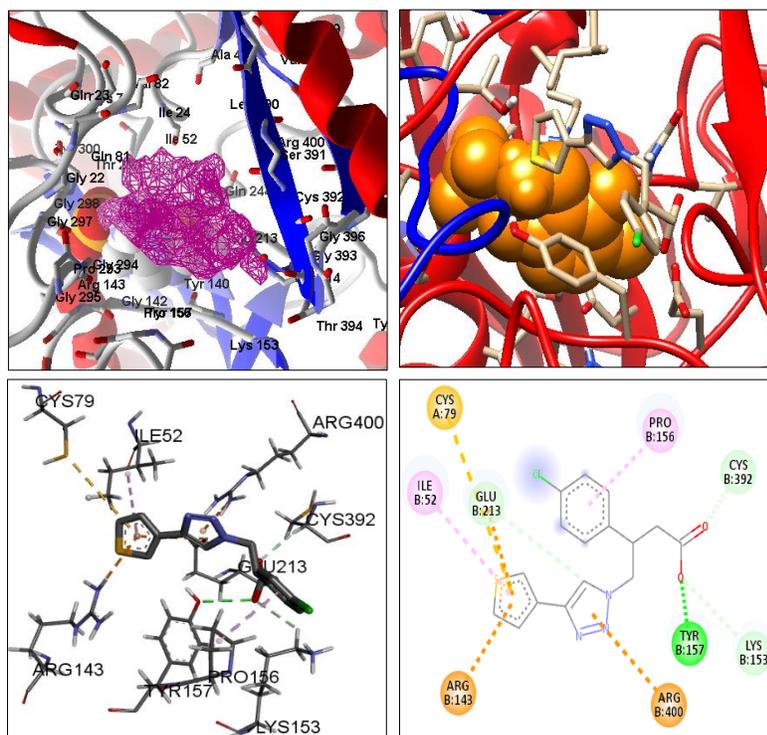


Figura 25. Interacciones de (*S*)-**8b** en el sitio catalítico.

6.8. Acoplamiento molecular de los análogos de interés (9a-9b)

De la misma manera que en los casos anteriores, los compuestos **9a-9b** se presentan en forma racémica, por lo que el acoplamiento molecular de cada uno de ellos se realizó en su forma enantioméricamente pura, dentro del sitio activo del modelo proteico. Además del análisis de los resultados de interacción asistida por computadora, también se obtuvo la energía libre de Gibbs (kcal/mol) de la unión ligando-enzima, la cual se considera como una constante de afinidad en el sitio catalítico de la proteína. Así mismo, cabe mencionar que todos los compuestos tanto de referencia como de objetivos se orientaron de manera similar en el sitio activo (el anillo de triazol y su sustituyente se orientaron hacia el grupo prostético PLP), mientras que el resto (carboxilato y el sustituyente en posición β) se orientaron hacia la parte externa de la proteína. Las interacciones de los compuestos objetivo faltantes se encuentran en la parte de Anexos, debido a que estos presentaron menor energía, mostrando en la parte de resultados los compuestos que más favorecieron en el estudio de acoplamiento molecular.

En el caso del compuesto (*R*)-**9a** este presenta interacción con seis aminoácidos: mediante enlace de hidrógeno entre el átomo de N del triazol con el H del-OH de la Tyr157 a 2.62 Å; así mismo se observa una interacción entre el átomo de O del carbonilo de la molécula y el oxígeno del -OH de la Tyr157 a 3.09 Å (verde). Por otra parte, presenta estas mismas interacciones con los oxígenos del carbonilo de la molécula con los residuos de Lys153 a 2.97 Å y con Cys392 a 2.42 Å (gris). Una interacción de tipo π -catión entre los electrones del sustituyente cloro-tiéfeno y la $^+NH_3$ de la Lys153 a 3.50 Å, y otra interacción de tipo π -anión entre los electrones del anillo de triazol y el sustituyente fenilo con la Glu213 a 4.56 y 4.79 Å, respectivamente (anaranjado). En el complejo se observa una interacción

de tipo π -azufre mediante los electrones del anillo de fenilo y el átomo de azufre del residuo de Cys79 a 5.46 Å (amarillo). Finalmente, se observa una interacción de tipo π -alquilo entre los electrones del fenilo y los -CH₃ de la Ile52 a 4.85 Å (lila); todo esto se observa en la **Figura 26**. $\Delta G = -7.3$ (kcal/mol).

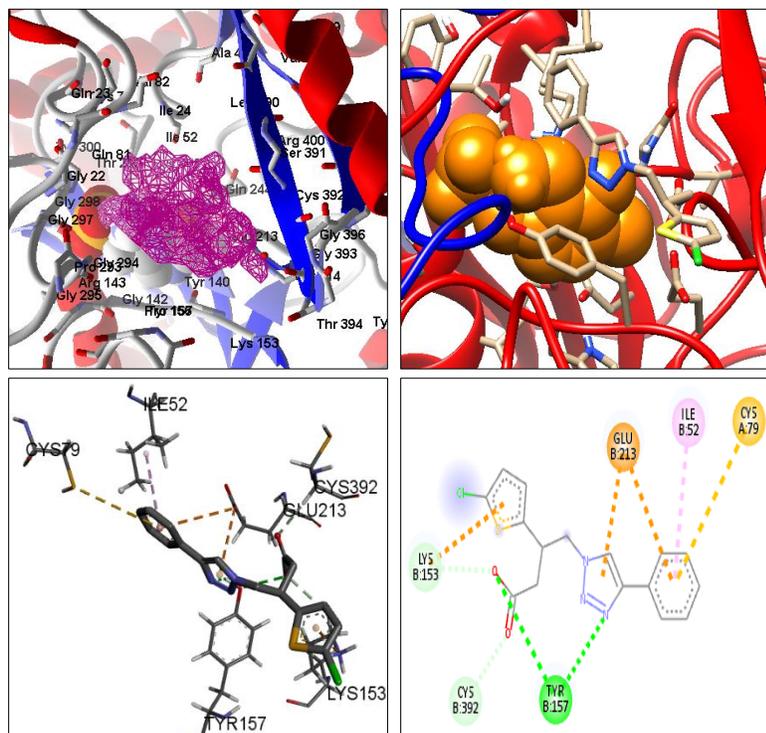


Figura 26. Interacciones de (*R*)-**9a** en el sitio catalítico.

Para el compuesto (*S*)-**9a** el número de interacciones aumentó (**Figura 27**), es decir, se tiene interacción con ocho residuos de aminoácidos: de enlace de hidrógeno entre el átomo de N del triazol y el H del -OH de la Tyr157 a 2.39 Å y el oxígeno del carbonilo de la molécula y la ⁺NH₃ de la Lys153 a 2.01 Å (verde); de enlace de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo y los hidrógenos de la Pro156 a 2.64 Å (gris). Se muestran interacciones π -anión entre los electrones del sustituyente fenilo y los átomos de oxígeno de la Glu213 a 4.68 Å (anaranjado). Se describe también una interacción de tipo π -azufre entre el anillo de fenilo y el átomo de azufre de la Cys79 a 5.37 Å (amarillo). También se muestran 2 interacciones hidrofóbicas, una entre el átomo de cloro y los -CH₃ de la Leu390 a 4.87 Å y la otra entre el mismo átomo de cloro y los -CH₃ de la Ile24 a 3.85 Å (lila); así mismo, se observan interacciones de tipo π -alquilo entre los electrones del fenilo y los -CH₃ de la Ile52 a 4.73 Å, y finalmente, otra entre los electrones del grupo cloro-tiofeno y los -CH₃ de la Ile24 a 5.44 Å (lila). $\Delta G = -6.5$ (kcal/mol).

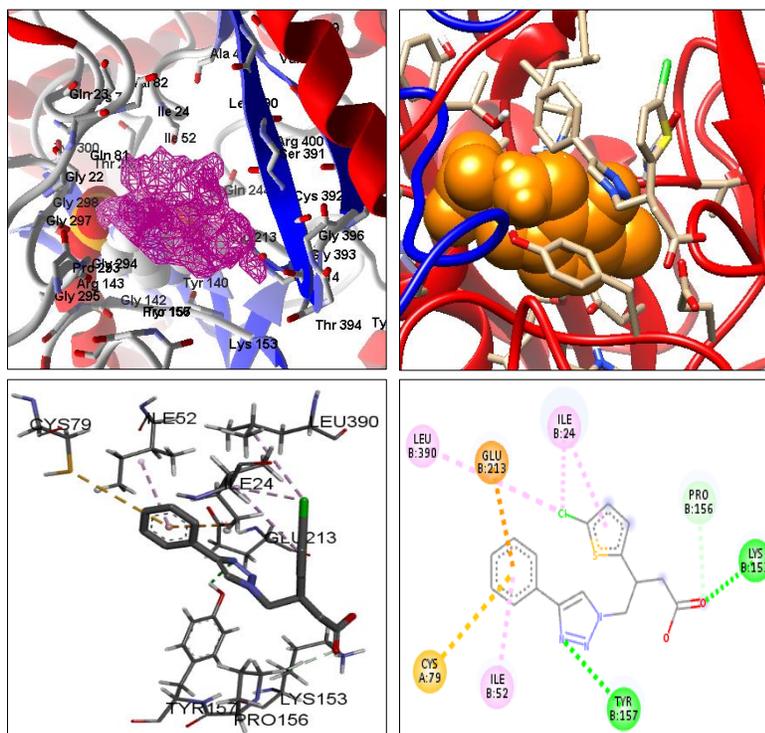


Figura 27. Interacciones de (S)-9a en el sitio catalítico.

En la **Figura 28** se observan las interacciones que presentó el compuesto (*R*)-9b: de enlace de hidrógeno entre los oxígenos del carbonilo y los H de las aminas de los residuos de Arg400 y Ser391 a 2.72 y 2.08 Å, respectivamente (verde); y entre el oxígeno del carbonilo y la Leu390 a 2.83 Å (gris). Se mantienen interacciones de tipo π -catión, entre los electrones del anillo de tiofeno y la amina ($^+NH^3$) de la Arg143 a 4.37 Å, e interacciones de tipo π -anión entre el anillo de triazol y los átomos de oxígeno de la Glu213 a 4.46 Å (anaranjado). Finalmente presenta interacciones de tipo π -alquilo mediante los electrones del tiofeno y los $-CH_3$ de la Ile52 a 4.62 Å (lila). $\Delta G = -6.6$ (kcal/mol).

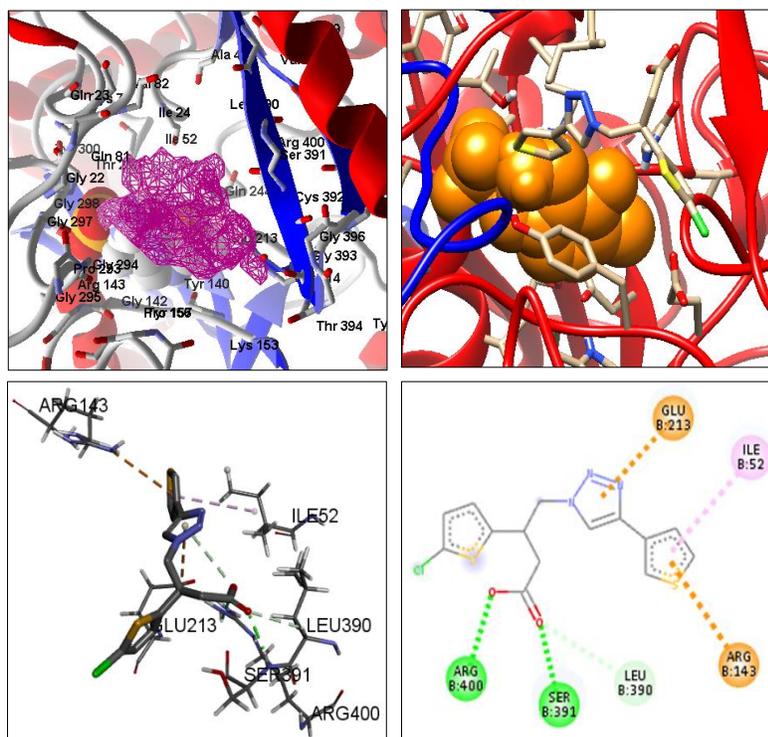


Figura 28. Interacciones de (*R*)-**9b** en el sitio catalítico.

Para el compuesto (*S*)-**9b** se tienen interacciones de enlace de hidrógeno (**Figura 29**) entre el átomo de oxígeno del carbonilo y los residuos de aminoácidos Gly393 y Glu213 a 3.32 y 3.37 Å, respectivamente (verde); así mismo, el átomo de oxígeno del carbonilo y el hidrógeno de la Cys392 a 2.64 Å (gris). Por otra parte, se mantienen interacciones de tipo π -catión entre los electrones del sustituyente cloro-tiéfeno y la $^+NH_3$ de la Lys153 a 3.76 Å (anaranjado), e interacciones π -azufre mediante los electrones del anillo de tiéfeno y el átomo de azufre de la Cys79 a 5.36 Å (amarillo). Se muestran dos interacciones de tipo π -alquilo entre los electrones del sustituyente cloro-tiéfeno y los $-CH_2-$ de la Pro156 a 5.46 Å y los electrones del anillo de tiéfeno y los $-CH_3$ de la Ile52 a 4.66 Å (lila). $\Delta G = -6.1$ (kcal/mol).

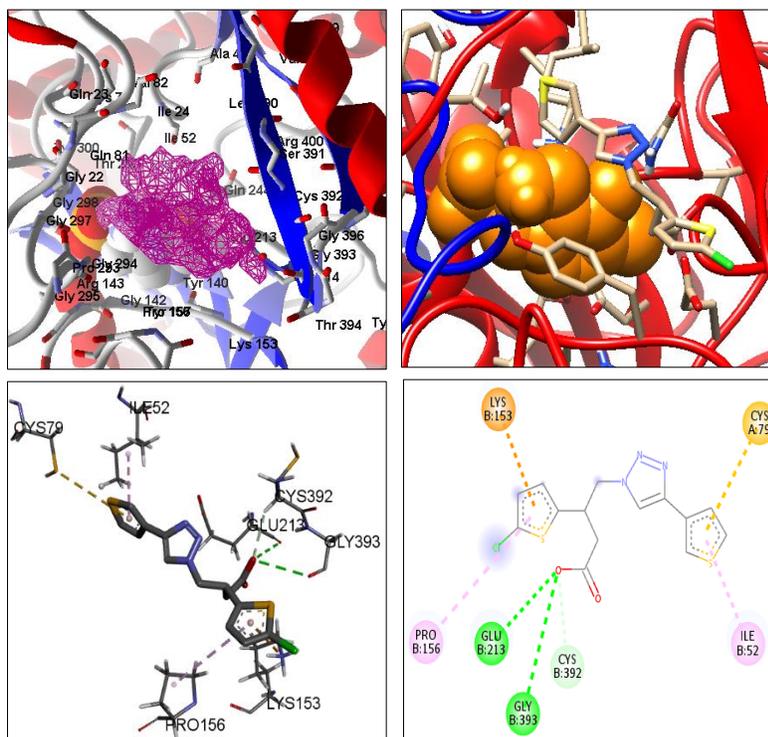


Figura 29. Interacciones de (S)-9b en el sitio catalítico.

Nuestros resultados computacionales sugieren que los compuestos (R)-9a, (S)-9a, (R)-9b y (S)-9b pueden ser buenos candidatos para futuras pruebas biológicas, con el fin de confirmar su actividad biológica inhibitoria sobre la enzima GABA-AT de *P. fluorescens*. En la **Tabla 8** se logra observar que nuestras moléculas objetivo mantuvieron interacciones similares con respecto a los andamos de referencia, interacciones con residuos de aminoácidos como la Tyr157, Cys392, Cys79, Ile52, Glu213 y Lys153; así como también algunas otras interacciones en menor número como por ejemplo con residuos de aminoácidos como Arg400, Arg143, Gly393, Ser391, Leu390 y Pro156, lo que pudiera dar indicios de que nuestras moléculas de interés interaccionan de una manera similar que los andamos de referencia, dentro del sitio de unión. De igual manera, en esa tabla se logran observar los valores de energía de unión, estos nos proporcionan una idea sobre la afinidad de nuestros análogos con respecto a los análogos de referencia en el sitio activo de la enzima. Los valores de energía de los compuestos objetivo son ligeramente menores a los de referencia, sin embargo, podemos deducir que mediante a las interacciones que se mantienen y al acomodo (orientación) similar en el sitio activo estos podrían actuar como inhibidores de la GABA-AT.

Estos resultados abren la posibilidad de explorar nuevas series de análogos de GABA como inhibidores reversibles de GABA-AT, con una mayor diversidad de andamos heterocíclicos. De lo descrito anteriormente podemos sugerir que los análogos de GABA con el sustituyente en β (cloro-tiofeno) y del anillo de triazol (aromático), pueden ser útiles en el diseño de inhibidores potenciales basados en el anclaje de la molécula en el sitio activo de la enzima, debido al tipo de interacciones π - π que presentan algunos complejos, ya que estabilizan a la molécula en el sitio activo, además, de tener fuertes interacciones de puente de hidrógeno con los átomos de N del anillo de triazol.

Tabla 8. Interacciones de todos los compuestos de interés con los aminoácidos.

Compuesto	Energía de unión (Kcal/mol)	Residuos de aminoácidos													
		Arg 400	Arg 143	Tyr 140	Tyr 157	Gly 393	Cys 392	Cys 79	Ile 52	Glu 213	Lys 153	Ser 391	Leu 390	Pro 156	
GABA	-3.6		X	X	X					X					
(S)-vigabatrina	-4.4		X	X	X					X					
(R)-8a	-7.5	X				X		X	X	X	X				
(S)-8a	-7.2				X		X	X	X	X		X		X	
(R)-8b	-7.7	X				X	X	X	X	X					
(S)-8b	-7.3	X	X		X		X	X	X	X	X			X	
(R)-9a	-7.3				X		X	X	X	X	X				
(S)-9a	-6.5				X		X	X	X	X			X	X	
(R)-9b	-6.6	X	X						X	X		X	X		
(S)-9b	-6.1					X	X	X	X	X	X			X	

6.9. Acoplamiento molecular en modos normales (NMA)

Esta técnica es utilizada en el acoplamiento molecular, ya que nos permite identificar los posibles cambios conformacionales de la proteína con base en su cadena principal, es decir, permite realizar el análisis del movimiento estructural del sistema de interés. Además, permite observar si existe un cambio en los residuos de aminoácidos presentes en el sitio catalítico de la proteína. Este tipo de estudio se decidió realizar a los compuestos más prometedores [(R)-9a y (R)-9b] según con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular con el modelo de homología de *P. fluorescens* (de acuerdo a la energía de unión y a las interacciones favorables en el sitio de unión), debido a que son compuestos de interés en este proyecto, para una futura síntesis y evaluación enzimática.

En la **Figura 30** se observan los cambios conformacionales de la proteína de GABA-AT de *P. fluorescens*. Cabe mencionar, que la proteína del inciso c) resulto la más favorable, debido a que esta presento un mayor volumen de cavidad, además, fue la que resulto con menos impedimentos estéricos debido a su movimiento conformacional.

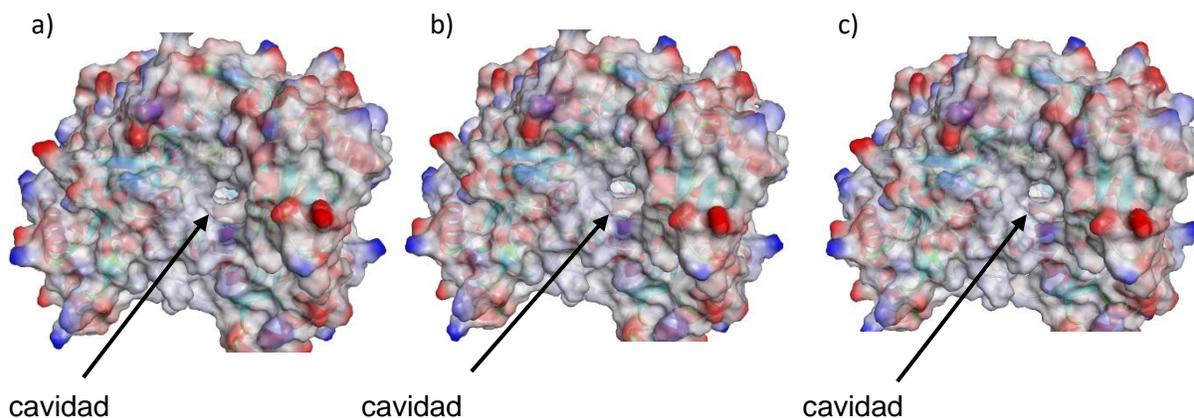


Figura 30. Cambio conformacional del modelo de *P. fluorescens*; a) modo 7, b) modo 8, c) modo 9.

En la **Figura 31** se puede observar el modo de unión entre la molécula (*R*)-**9a** y el modelo de *P. fluorescens*. En la **Tabla 9** se muestran los resultados de energía de unión obtenidos del acoplamiento, en la cual se puede observar que el modo 9 es el que resulto más favorable, esto debido a que la proteína presento una cavidad ligeramente mayor y de menor impedimento estérico, lo que hace que la molécula se acomode de mejor manera y el complejo proteína-ligando sea más estable, a diferencia de los modos 7 y 8, en donde presentaron una cavidad ligeramente menor, respectivamente.

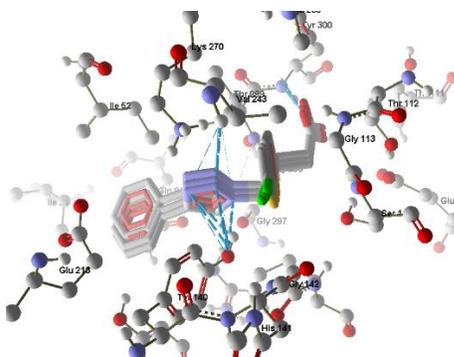


Tabla 9.- Resultados de energía de unión.

MODO	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)
7	-5.4	-5.5	-6.0
8	-5.4	-5.6	-4.8
9	-6.0	-5.7	-5.5

Figura 31.- Acoplamiento molecular de (*R*)-**9a** empleando modos normales.

En la figura anterior se pueden observar los puentes de hidrógeno entre la molécula (*R*)-**9a** con el modo 9 de la proteína, generando fuertes puentes de hidrógeno con los átomos de N del anillo de triazol y los residuos de los aminoácidos como Thr299 y Tyr140; así mismo, el grupo carboxilato presentó este tipo de interacción con el residuo de Tyr300, generando más interacciones que en los modos 7 y 8 de la proteína.

En la **Figura 32** se puede observar el modo de unión entre la molécula (*R*)-**9b** y el modelo de *P. fluorescens*. En la **Tabla 10** se muestran los resultados de energía de unión obtenidos del acoplamiento, en la cual se puede observar que el modo 9 es el que resulto más favorable, como en el caso anterior.

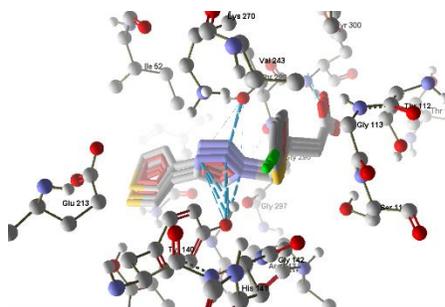


Tabla 10.- Resultados de energía de unión.

MODO	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)
7	-4.8	-5.0	-5.5
8	-4.9	-5.1	-4.4
9	-5.5	-5.2	-4.8

Figura 32.- Acoplamiento molecular de (*R*)-**9b** empleando modos normales.

Así mismo, para esta molécula se registró el mismo tipo de interacciones de enlaces de hidrógeno, como se observa en la figura anterior, donde los enlaces de hidrógeno entre la molécula (*R*)-**9b** y el modo 9 de la proteína, generados mediante el anillo de triazol y los residuos de aminoácidos como Thr299 y Tyr140; así mismo, el grupo carboxilato presentó este tipo de interacción con residuos de Tyr300, generando más interacciones que en los modos 7 y 8 de la proteína.

Con base en nuestros resultados computacionales podemos sugerir que los compuestos (*R*)-**9a** y (*R*)-**9b** presentan una probabilidad de poder actuar como inhibidores de la GABA-AT. Debido a que, no sólo en los estudios de acoplamiento en *P. fluorescens* y de humano mostraron resultados favorables, sino también en el análisis de modos normales, como se observó anteriormente, su orientación fue favorable en el modo de conformación 9 ya que en ésta, existe un mayor volumen de la cavidad, así como también, en esta conformación no existen tantos choques estéricos mediante el movimiento de la proteína, generando que las moléculas puedan anclarse de la mejor manera en el sitio activo, mostrando una estabilidad mediante las interacciones que se observaron anteriormente.

6.10. Acoplamiento molecular sobre el modelo proteico de humano

Dado que uno de los principales objetivos de este trabajo es la identificación de compuestos que puedan desarrollarse como fármacos para uso clínico, se realizaron cálculos de acoplamiento molecular sobre un modelo de homología de GABA-AT de humano de todos los análogos de GABA para estudiar su interacción con la enzima.

6.11. Acoplamiento molecular de los compuestos GABA y vigabatrina

En la **Figura 33** se puede observar las interacciones que presentó la molécula de **GABA** en el sitio catalítico del modelo proteico antes mencionado. Se observa que la molécula interacciona con cinco residuos de aminoácidos, con tres de los cuales interacciona mediante puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de la molécula y los hidrógenos de las aminas de la Arg182 y con los hidrógenos de la Thr343 a 2.08 y 2.59 Å, respectivamente (verde); también lo hace con el oxígeno del carbonilo y con la Asn342 a 2.88 Å (gris). Muestra interacciones de tipo π -catión mediante los electrones de la Phe179 a 4.91 Å (amarillo) e interacciones electrostáticas entre la $^+NH_3$ de la molécula y los oxígenos con carga negativa de la Glu260 a 3.25 Å (amarillo). $\Delta G = -4.0$ (kcal/mol).

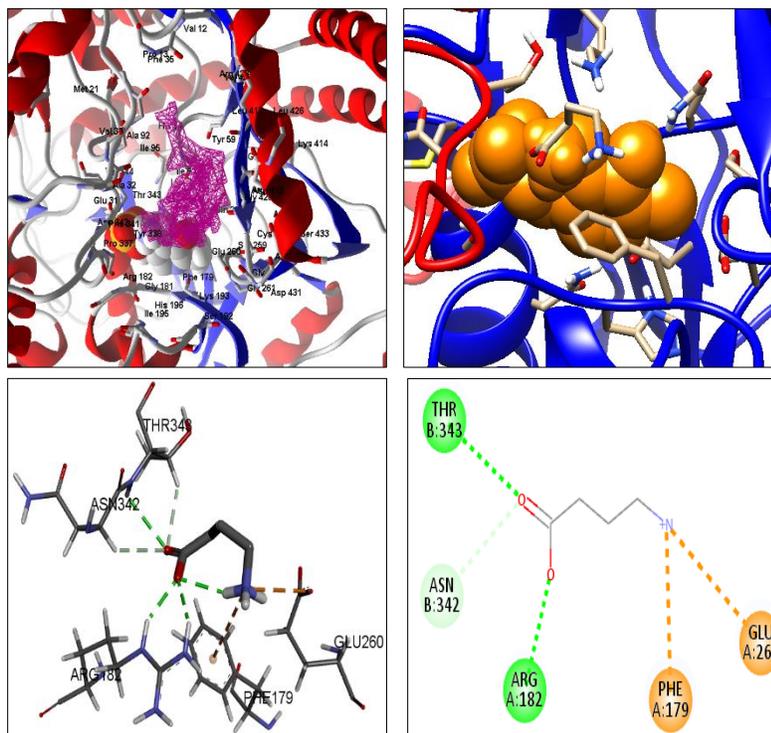


Figura 33. Interacciones de **GABA** en el sitio catalítico.

Para la molécula de vigabatrina, ésta interacciona con ocho aminoácidos del sitio de unión (**Figura 34**), se logra observar que interacciona mediante enlaces de hidrógeno entre los átomos de oxígeno del carbonilo de la molécula con los hidrógenos de la amina de la Arg182 a 5.60 Å y con los hidrógenos de la Thr343 a 2.93 Å (verde); también muestra una interacción de tipo puente salino entre la $^+NH_3$ de la molécula y los átomos de oxígeno de la Glu260 a 2.38 Å (anaranjado). Se muestran dos interacciones hidrofóbicas entre los carbonos del doble enlace de la molécula con los $-CH_3$ de la Ile95 e Ile62 a 4.63 y 4.53 Å, respectivamente (lila); también se pueden observar dos interacciones de tipo π -alquilo; entre los carbonos del doble enlace y los electrones de los anillos aromáticos de Tyr338 a 5.03 Å y Phe341 a 4.68 Å, (lila). Esta molécula presenta una interacción desfavorable (positivo-positivo) entre la $^+NH_3$ de la molécula y la $^+NH_3$ de la Arg182 a 2.25 Å (rojo). $\Delta G = -5.0$ (kcal/mol).

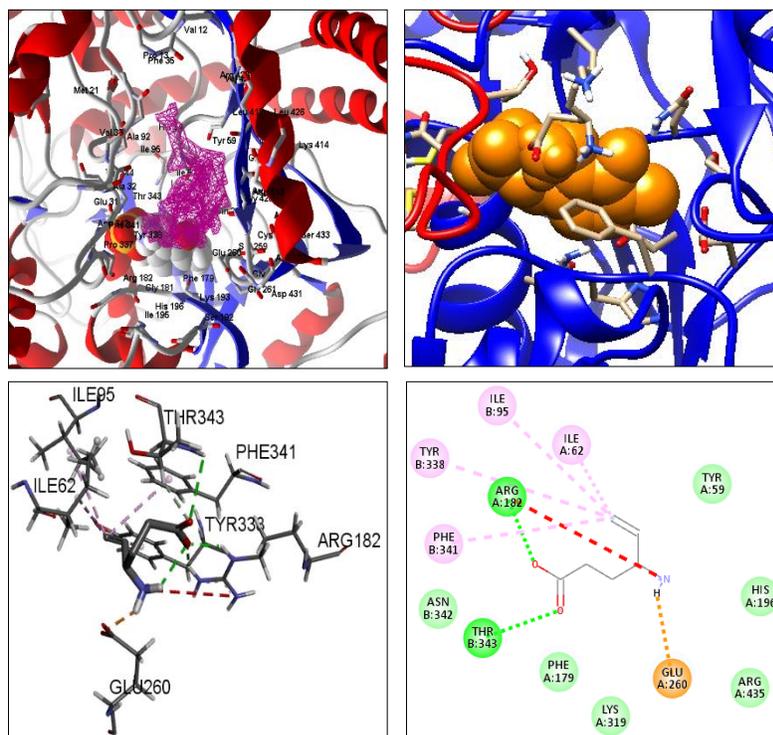


Figura 34. Interacciones de vigabatrina en el sitio catalítico.

6.12. Acoplamiento molecular de los compuestos de referencia (8a-8c)

Cabe mencionar que debido a que los compuestos **8a-8c** se presentan en forma racémica, el acoplamiento molecular de cada uno de ellos se realizó en su forma enantiomérica, dentro del sitio activo del modelo proteico. Las interacciones de los compuestos faltantes de referencia se encuentran en la parte de Anexos, debido a que estos presentaron menor energía, mostrando en la parte de resultados los compuestos que más favorecieron en el estudio de acoplamiento molecular.

El compuesto (*R*)-**8a** presenta interacción con cinco aminoácidos; se muestra la interacción de puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo de la molécula y el anillo de la His34 a 3.38 Å (verde). También presenta interacciones de tipo π -catión, esto mediante los electrones del anillo de fenilo y la amina de la Arg182 a 4.26 Å (anaranjado); así mismo, presenta interacciones π -anión entre los electrones del anillo de triazol y del sustituyente fenilo con los oxígenos de la Glu260 a 4.76 Å (anaranjado). Por otra parte, presenta interacciones π - π apilado entre los electrones del sustituyente cloro-fenilo y el anillo de triazol con los electrones del anillo de la Tyr338 a 4.61 y 4.45 Å, respectivamente (rosa). Finalmente presenta interacciones π -alquilo, mediante los electrones pi del fenilo y los -CH₃ de la Ile62 a 4.34 Å (lila), observando esto en la **Figura 35**. $\Delta G = -7.8$ (kcal/mol).

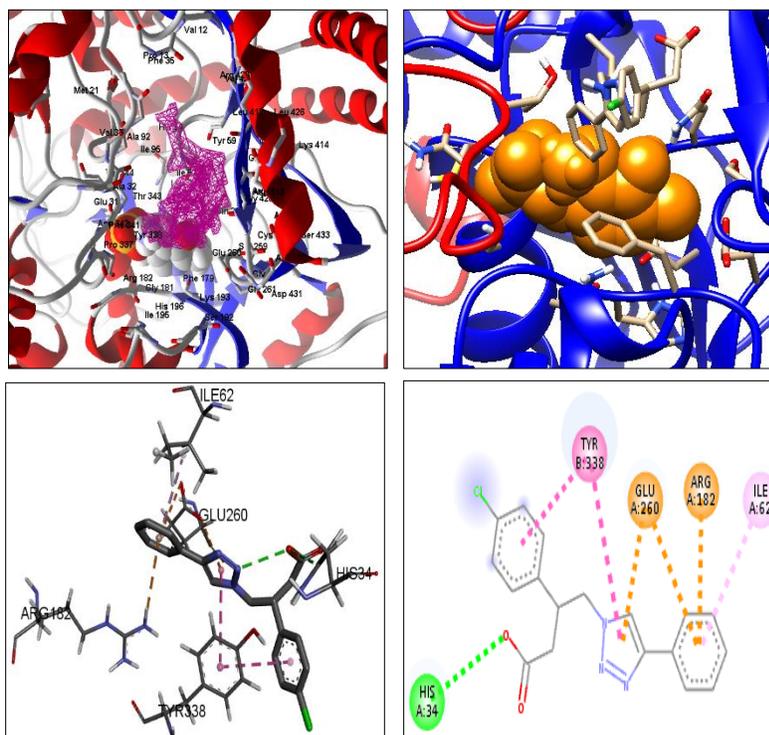


Figura 35. Interacciones de (*R*)-**8a** en el sitio catalítico.

Para el caso del compuesto (*S*)-**8a** se observa interacción con nueve residuos de aminoácidos (**Figura 36**). Entre las interacciones que muestra están las de puente de hidrógeno entre los oxígenos del carbonilo de la molécula con los hidrógenos de la Gly428 a 2.98 y 2.17 Å, respectivamente (verde); así como entre los oxígenos del carbonilo con los hidrógenos de la Lys193 a 2.54 y 3.03 Å, respectivamente (verde); una última interacción de enlace de hidrógeno se da entre en átomo de N del anillo de triazol con los hidrógenos de la Lys193 a 2.40 Å (verde). Se observan las mismas interacciones π -catión y π -anión entre los electrones pi del anillo de fenilo con los oxígenos de la Glu260 a 3.77 Å y con la amina de la Arg182 a 3.85 Å, respectivamente (anaranjado). Por otra parte, se muestran interacciones de tipo π - π de apilamiento entre los electrones del anillo de triazol y el anillo aromático de la Tyr338 a 3.86 Å (rosa), y también en forma T entre los electrones del anillo de fenilo con los electrones del anillo aromático de la Phe179 a 5.71 Å (rosa). Finalmente, se muestra una interacción hidrofóbica entre el átomo de cloro de la molécula con el anillo de la Pro337 a 4.76 Å (lila) y una interacción de tipo π -alquilo entre los electrones del anillo de fenilo con los -CH₃ de la Ile62 a 4.96 Å (lila). $\Delta G = -7.6$ (kcal/mol).

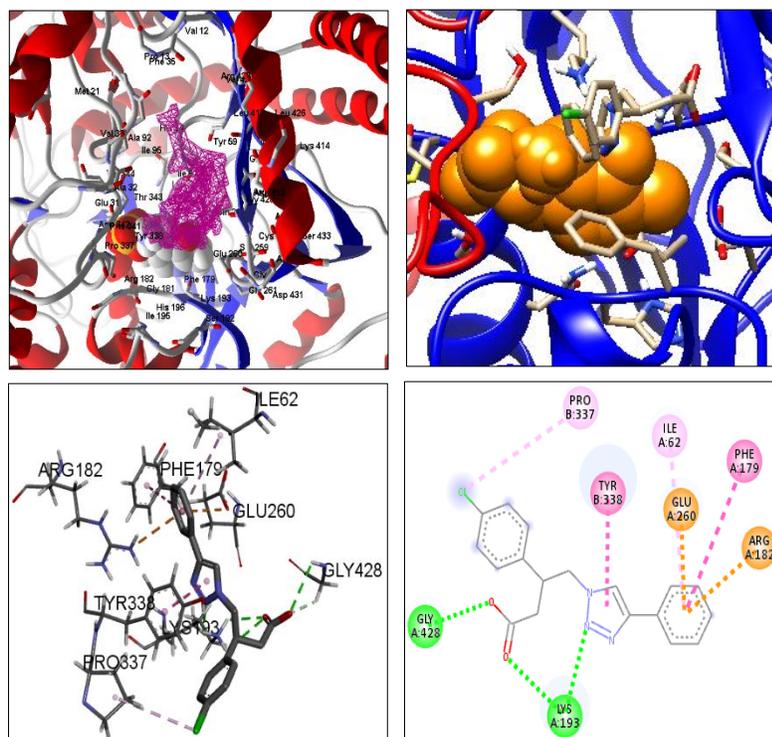


Figura 36. Interacciones de (*S*)-**8a** en el sitio catalítico.

El compuesto (*R*)-**8b** presenta mayor número de interacciones con respecto al enantiómero (*S*), teniendo nueve en el sitio catalítico (**Figura 37**). Interacción mediante puente de hidrógeno con los oxígenos del carbonilo de la molécula y los hidrógenos de la amina de la Arg435 a 2.76 Å; así como también entre el átomo de N del triazol y los hidrógenos de la amina de la Arg182 a 2.29 Å (verde); siguiendo con las interacciones de enlace de hidrógeno se observan entre los oxígenos del carbonilo con los residuos de His196, Cys429 y con la Glu260 a 2.63, 2.27 y 4.06 Å, respectivamente (gris). Por otra parte, con el residuo de Glu260 presenta otra interacción de tipo π -anión mediante los electrones del anillo de triazol y los oxígenos de la Glu260 a 2.98 Å (anaranjado). Se observa una interacción de tipo π - π entre los electrones del sustituyente de tiofeno y los electrones del anillo aromático de la Phe179 a 4.85 Å (lila). Hay una interacción hidrofóbica entre el átomo de cloro y los -CH₃ de la Ile416 a 3.88 Å (rosa); así mismo se observa una interacción π -alquilo mediante los electrones del anillo de tiofeno y los -CH₃ de la Ile62 a 4.45 Å (rosa). $\Delta G = -8.0$ (kcal/mol).

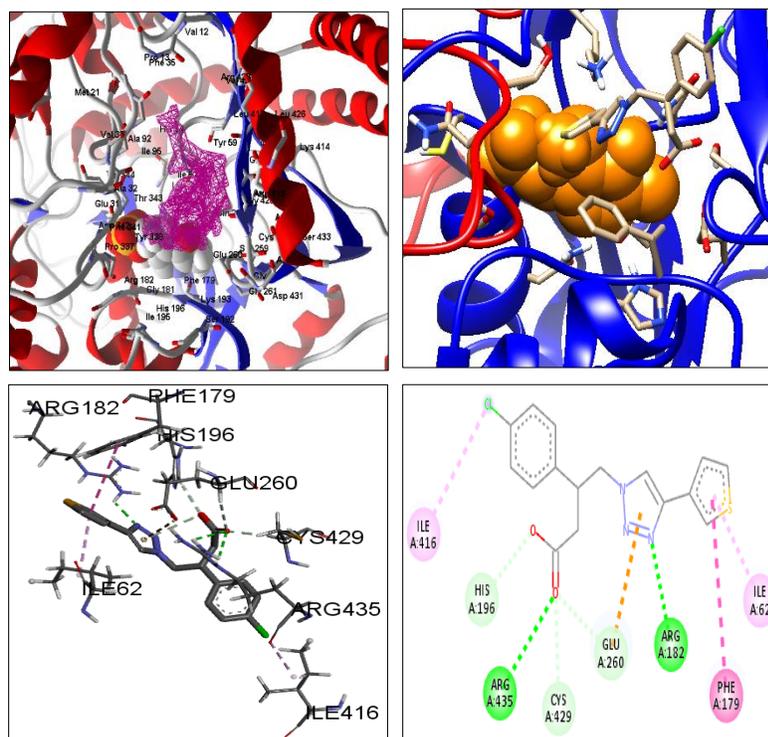


Figura 37. Interacciones de (*R*)-**8b** en el sitio catalítico.

El compuesto (*S*)-**8b** presenta menor número de interacciones con respecto al enantiómero anterior; en la **Figura 38** se observan siete de ellas en el sitio catalítico. Una interacción de puente de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de la molécula con los hidrógenos de la amina de la Lys193 a 2.99 y 2.59 Å, respectivamente (verde). Se observa que se mantienen interacciones como las de π -catión entre los electrones del anillo de triazol y el grupo tefeno con la $^+NH_3$ de la Arg435 a 4.99 Å y con Arg182 a 4.23 Å, respectivamente (anaranjado), y las de π -anión entre los electrones del anillo de tefeno con los oxígenos de la Glu260 a 4.70 Å (anaranjado). Se observa una interacción de tipo π -azufre entre los electrones del anillo aromático de la Phe341 con el átomo de azufre del anillo de tefeno a 5.31 Å (amarillo). Finalmente se observan interacciones π - π mediante los electrones del anillo de cloro-fenilo con los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 4.47 Å (rosa), e interacciones π -alquilo entre los electrones del anillo de tefeno y los $-CH_3$ de la Ile62 a 4.40 Å (lila). $\Delta G = -7.8$ (kcal/mol).

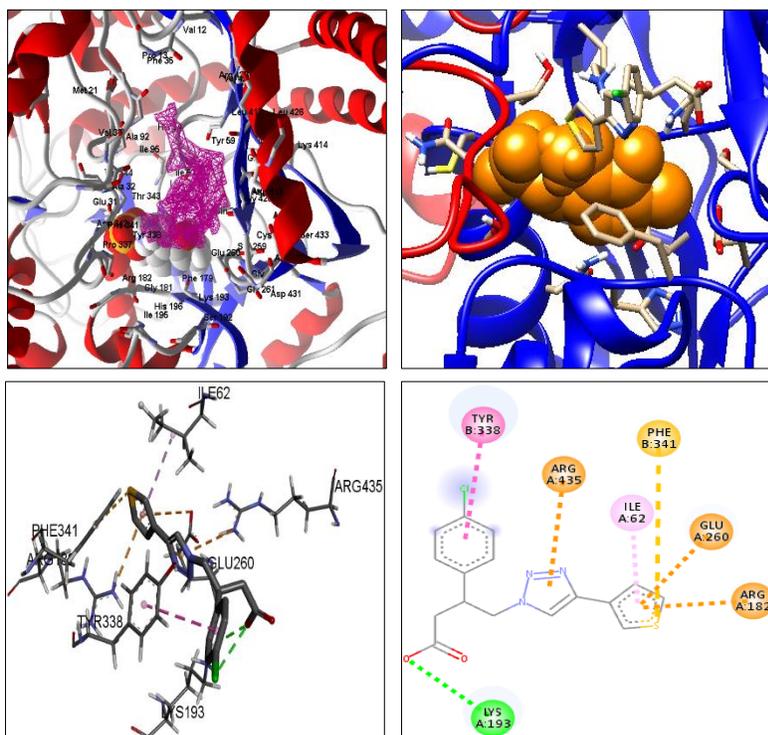


Figura 38. Interacciones de (*S*)-**8b** en el sitio catalítico.

El compuesto (*R*)-**8c** presenta menos interacciones en el sitio catalítico que los anteriores (**Figura 39**). En este caso se observó que hubo interacciones hidrofóbicas y una interacción de puente de hidrógeno, para esta última mediante el átomo de oxígeno del carbonilo con los hidrógenos de la amina de la Lys193 a 2.79 y 2.35 Å (verde). Sólo se mantuvo una interacción de tipo π -anión entre los electrones del anillo de triazol con el oxígeno de la Glu260 a 4.40 Å (anaranjado). Se observa una interacción doble de tipo π - π entre los electrones del anillo de cloro-fenilo con la Tyr338 a 4.41 Å y los electrones del anillo de triazol con la misma Tyr338 a 4.70 Å (rosa). Finalmente se observan interacciones de tipo hidrofóbica y π -alquilo entre el sustituyente ciclopropilo con la Ile62 a 4.18 Å y el mismo ciclopropilo con los electrones π del anillo aromático de la Phe341 a 5.07 Å, respectivamente (lila). $\Delta G = -7.5$ (kcal/mol).

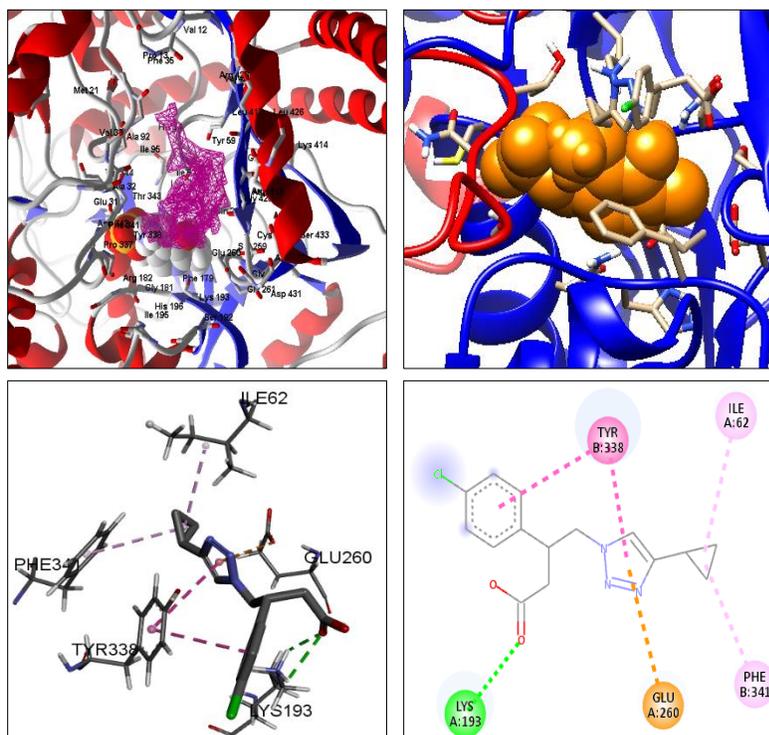


Figura 39. Interacciones de (*R*)-**8c** en el sitio catalítico.

En el caso del compuesto (*S*)-**8c** se observan dos interacciones de puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula y los hidrógenos de la amina de la Lys193 a 2.83 y 2.44 Å, respectivamente (verde). Por otra parte, se observan interacciones hidrofóbicas entre el átomo de cloro y los residuos de Ile416 y Leu417 a 3.91 y 3.99 Å, respectivamente (lila); así mismo hay una interacción hidrofóbica entre el sustituyente de ciclopropilo y los -CH₃ de la Ile62 a 4.47 Å (lila). En esta misma, se observan interacciones de tipo π -alquilo entre la Phe341 y el ciclopropilo a 4.83 Å, así como el anillo de triazol y los -CH₃ de la Ile95 a 5.37 Å, y por último entre el cloro-fenilo con el residuo de Ile416 a 5.25 Å (lila). Además, existen dos interacciones de tipo π - π entre el anillo de triazol y la Tyr59 a 5.82 Å, y entre el cloro-fenilo con la His34 a 4.67 Å (rosa) (**Figura 40**). $\Delta G = -7.1$ (kcal/mol).

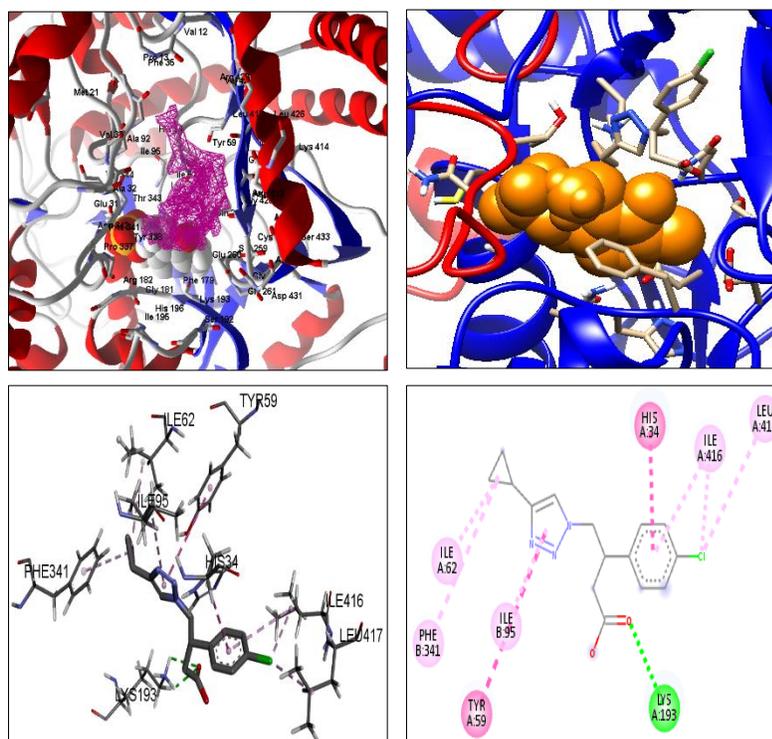


Figura 40. Interacciones de (S)-8c en el sitio catalítico.

6.13. Acoplamiento molecular de los análogos de interés (9a-9c)

Al igual que en los casos anteriores, los compuestos **9a-9c** se presentan en forma racémica, es por ello que el acoplamiento molecular de cada uno de ellos se realizó en su forma enantiomérica, dentro del sitio activo del modelo proteico. Además del análisis de los resultados de interacción asistida por computadora, también se obtuvo la energía libre de Gibbs (kcal/mol) de la unión ligando-enzima, la cual se considera como una constante de afinidad en el sitio catalítico de la proteína. Así mismo, cabe mencionar que todos los compuestos tanto de referencia como de objetivos se orientaron de manera similar en el sitio activo (el anillo de triazol y su sustituyente se orientaron hacia el grupo protético PLP), mientras que el resto (carboxilato y el sustituyente en posición β) se orientaron hacia la parte externa de la proteína. Las interacciones de los compuestos objetivo faltantes se encuentran en la parte de Anexos, debido a que estos presentaron menor energía, mostrando en la parte de resultados los compuestos que más favorecieron en el estudio de acoplamiento molecular.

El compuesto (*R*)-**9a** presenta nueve interacciones en el sitio catalítico (**Figura 41**). Se observan interacciones de puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula con el hidrógeno de la amina de la Lys193 a 1.96 Å (verde); así mismo entre el oxígeno del carbonilo y la Cys429 a 2.42 Å (gris). Se puede observar que se siguen manteniendo interacciones de tipo π -catión y de π -anión; para las primeras se da entre los electrones de fenilo y la amina de la Arg182 a 4.29 Å, y para las segundas mediante los electrones del anillo de fenilo y la Glu260 a 4.78 Å, y también entre los electrones del anillo de triazol con la Glu260 a 4.66 Å (anaranjado). También se logran observar interacciones

de tipo π -azufre mediante los electrones del anillo de la His34 y el átomo de azufre del anillo de tiofeno a 5.23 Å (amarillo). Se muestran dos interacciones de tipo π - π entre el anillo de triazol y los residuos de Phe341 y Tyr338 a 5.39 y 4.58 Å, respectivamente (rosa). Una interacción hidrofóbica entre el átomo de cloro y la Ile416 a 3.89 Å (lila); así como dos interacciones de tipo π -alquilo, una entre los electrones del anillo de fenilo con la Ile62 a 4.38 Å, y la otra entre el átomo de cloro con los electrones del anillo de la His34 a 4.78 Å (lila). $\Delta G = -7.7$ (kcal/mol).

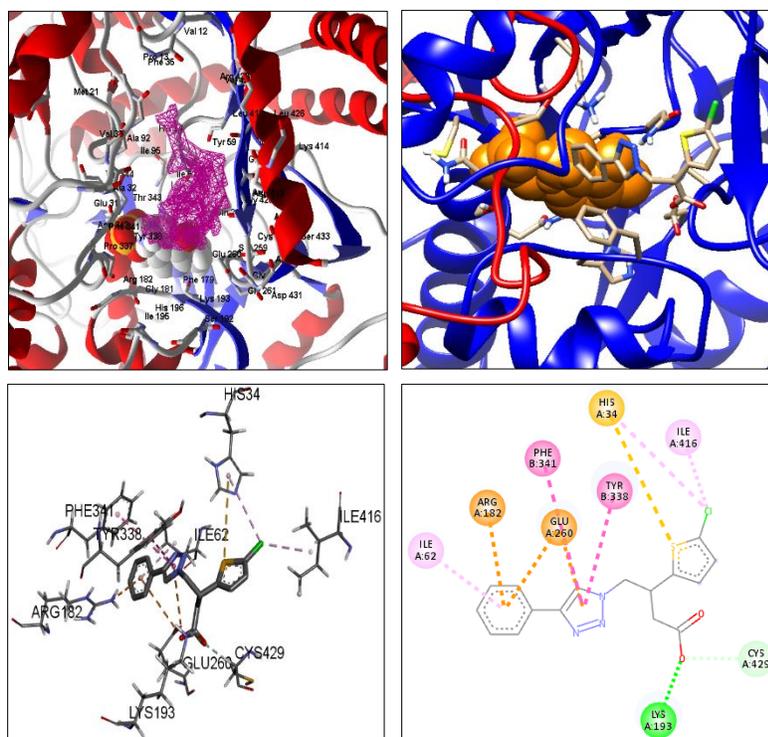


Figura 41. Interacciones de (*R*)-**9a** en el sitio catalítico.

El compuesto (*S*)-**9a** presenta menos interacciones que el caso anterior (**Figura 42**). Se observan interacciones de puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del carbonilo con la His34 a 3.22 Å (verde); y otra entre el oxígeno del carbonilo y la Gly427 a 2.91 Å (gris). Se observa que se siguen manteniendo las interacciones de tipo π -catión y π -anión; las primeras se dan entre los electrones del anillo de fenilo con la amina de la Arg182 a 4.18 Å, y las segundas entre los mismos electrones del fenilo con el átomo de oxígeno del carbonilo de la Glu260 a 4.76 Å, respectivamente (anaranjado). También se observan interacciones de tipo π -alquilo entre el átomo de cloro y los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 5.12 Å, y entre los electrones del fenilo con la Ile62 a 4.42 Å (lila). Por último, presenta interacciones de tipo π - π entre los electrones del sustituyente cloro-tiofeno y los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 4.36 Å (rosa). $\Delta G = -8.0$ (kcal/mol).

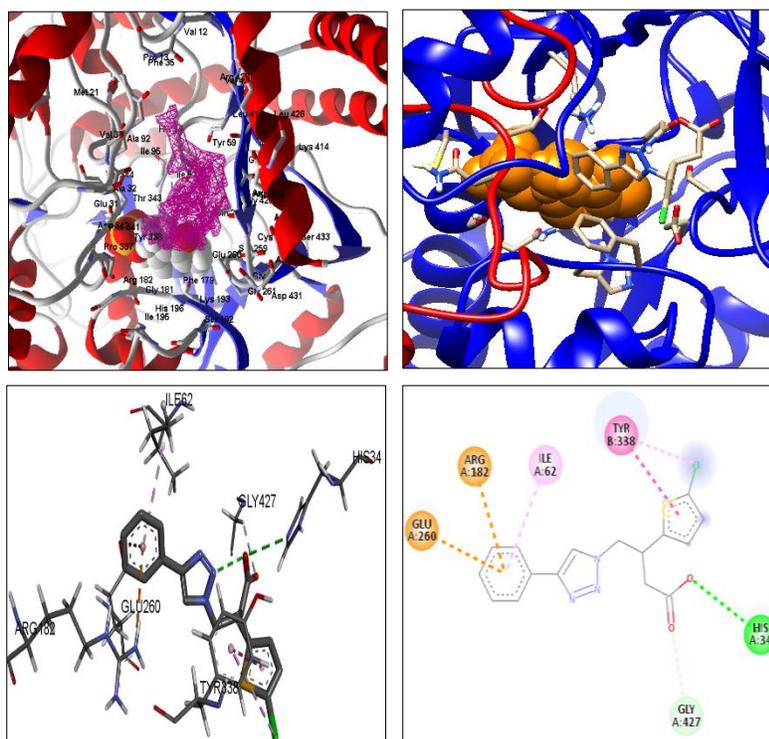


Figura 42. Interacciones de (S)-9a en el sitio catalítico.

Para el caso del compuesto (*R*)-9b se observan ocho interacciones con residuos de aminoácidos (**Figura 43**). Se observan cuatro interacciones de puente de hidrógeno, la primera entre el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula con los hidrógenos de la amina de la Lys193 a 2.08 Å; la segunda entre el átomo de N del triazol y los hidrógenos de la amina de la Arg182 a 2.44 Å; la tercera entre el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula con la Glu260 a 4.26Å, (verde); y la cuarta entre el mismo átomo de oxígeno del carbonilo con la Cys429 a 2.38 Å (gris). En esta molécula se mantiene una interacción con respecto a las anteriores de tipo π -anión entre los electrones del anillo de triazol y los oxígenos de la Glu260 a 2.62 Å (anaranjado); hay una interacción de tipo π -azufre entre los electrones del anillo de la His34 y el átomo de azufre del sustituyente cloro-tiofeno a 4.76 Å (amarillo). Se observan interacciones de tipo π - π entre los electrones del anillo de triazol y los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 4.64 Å (rosa); así como una interacción hidrofóbica entre el átomo de cloro con los -CH₃ de la Ile416 a 3.90 Å (lila); y, por último, dos interacciones π -alquilo, una entre los electrones del sustituyente de tiofeno con los -CH₃ de la Ile62 a 4.12 Å, y la segunda entre los electrones del anillo de la His34 con el átomo de cloro de la molécula a 4.76 Å (lila). $\Delta G = -6.7$ (kcal/mol).

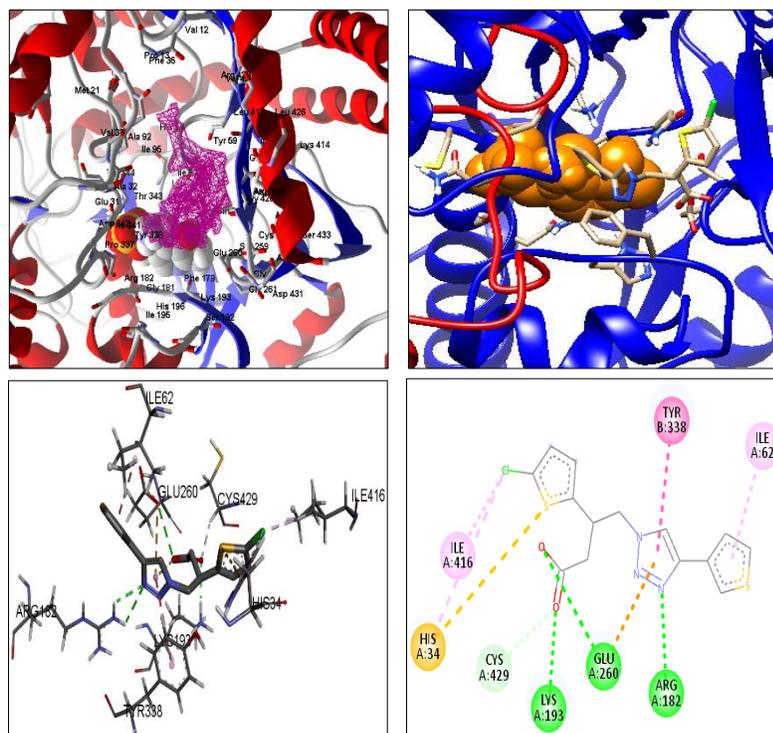


Figura 43. Interacciones de (*R*)-**9b** en el sitio catalítico.

En este compuesto (*S*)-**9b** se observa una interacción menos con respecto al enantiómero (*R*); teniendo ocho de ellas en el sitio catalítico de la proteína (**Figura 44**). Se observan tres interacciones de puente de hidrógeno, la primera entre el átomo de oxígeno del carbonilo y los hidrógenos de la amina de la Lys193 a 1.97 Å; la segunda y tercera entre el átomo de N del anillo de triazol con el hidrógeno de la amina de la Lys193 a 2.36 y 2.57 Å, respectivamente (verde). Se observa que se repiten algunas interacciones como las de π -catión y π -anión; las primeras se dan entre los electrones del sustituyente del tiofeno y la amina de la Arg182 a 3.97 Å, y la segunda entre los mismos electrones del tiofeno, pero ahora con el átomo de oxígeno del carbonilo de la Glu260 a 3.75 Å (anaranjado). Una interacción π - π entre los electrones del sustituyente cloro-tiofeno con los electrones del anillo aromático de la His34 a 4.29 Å (rosa). En esta molécula se observan cuatro interacciones de tipo π -alquilo, la primera entre el anillo de cloro-tiofeno con los -CH₃ de la Ile416 a 5.04 Å; la segunda entre el anillo de la His34 y el átomo de cloro de la molécula a 4.57 Å; la tercera entre el cloro y el anillo aromático de la Tyr59 a 3.59 Å; y finalmente, la cuarta entre los electrones del anillo de tiofeno y los -CH₃ de la Ile62 a 5.01 Å, respectivamente (lila). $\Delta G = -6.1$ (kcal/mol).

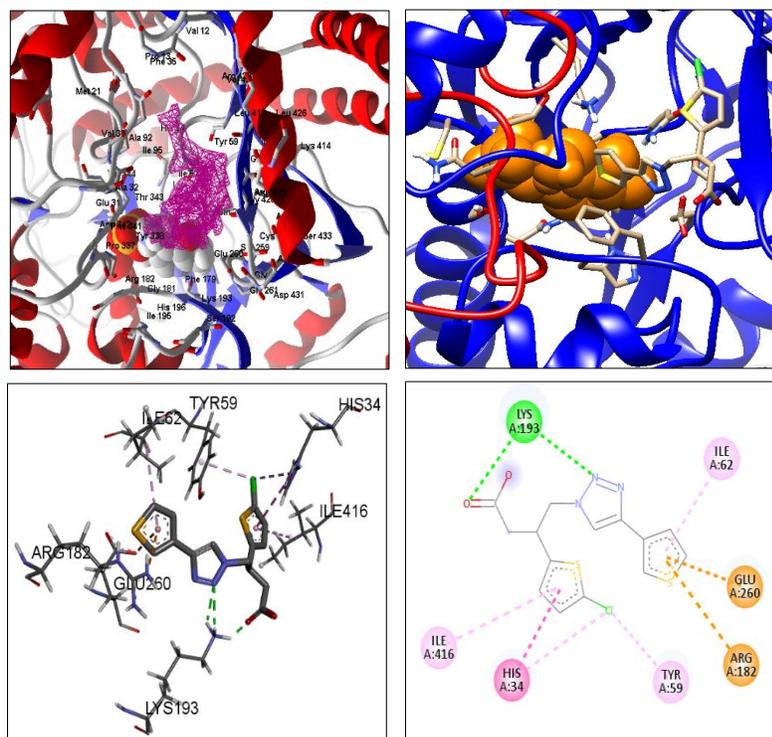


Figura 44. Interacciones de (S)-9b en el sitio catalítico.

En la **Figura 45** se observa que el compuesto (*R*)-9c interactúa con siete residuos de aminoácidos. Presenta interacciones de puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo con los hidrógenos de la Gly427 a 2.82 Å (verde); así como entre el oxígeno del carbonilo con el hidrógeno de la Gly428 a 2.93 Å (gris). También presentó una interacción electrostática mediante el oxígeno del carbonilo con el $^+NH_3$ de la Arg435 a 4.93 Å (anaranjado). Se mantuvo una interacción de tipo π -catión entre los electrones del grupo cloro-tiofeno y la $^+NH_3$ de la Lys193 a 3.45 Å (anaranjada). También se observa una interacción π - π entre los electrones del grupo cloro-tiofeno y los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 3.17 Å (rosa). Presenta una interacción hidrofóbica entre el sustituyente ciclopropilo con los $-CH_3$ de la Ile62 a 4.41 Å (lila); así como tres interacciones π -alquilo, la primera entre el ciclopropilo y la Phe179 a 5.31 Å, la segunda entre los electrones del anillo de triazol y los $-CH_3$ de la Ile62 a 5.03 Å, y la tercera entre el átomo de cloro con los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 3.75 Å (lila). $\Delta G = -5.9$ (kcal/mol).

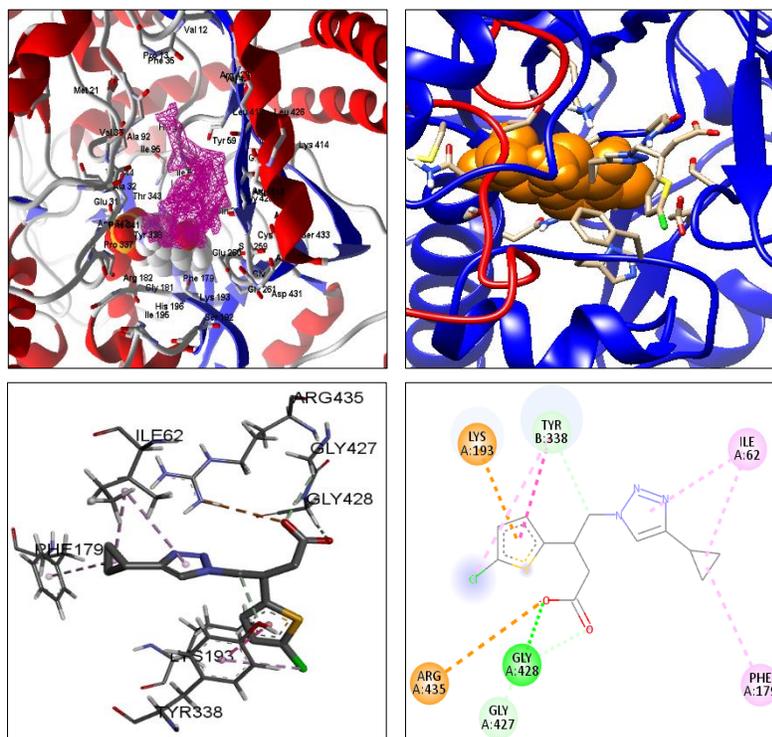


Figura 45. Interacciones de (*R*)-**9c** en el sitio catalítico.

En la **Figura 46** se observan las interacciones que presentó el compuesto (*S*)-**9c** en el sitio catalítico, donde se observa una interacción de puente salino entre el oxígeno del carbonilo con el $^+NH_3$ de la Lys193 a 2.74 Å (anaranjado); así como interacciones π -catión y π -anión, las primeras entre los electrones del anillo de triazol y la amina de la Arg435 a 4.79, y las segundas entre el oxígeno del carbonilo con los electrones del anillo aromático de la Tyr338 a 3.94 Å, y entre el anillo de triazol y el átomo de oxígeno del carbonilo de la Glu260 a 3.34 Å (anaranjado). Por otra parte, se muestra una interacción de tipo π -azufre entre el anillo aromático de la His34 y el átomo de azufre del grupo clorotiofeno a 4.62 Å (amarillo). También se observan dos interacciones hidrofóbicas entre el átomo de cloro y los $-CH_3$ de la Ile416 a 3.94 Å, y entre el ciclopropilo con la Ile62 a 4.51 Å (lila). Finalmente se observan tres interacciones de tipo π -alquilo, la primera entre la Phe179 y el ciclopropilo a 5.34 Å; la segunda entre la Phe341y el ciclopropilo a 5.22 Å, y la tercera entre el anillo de la His34 y el átomo de cloro a 5.14 Å (lila). $\Delta G = -6.8$ (kcal/mol).

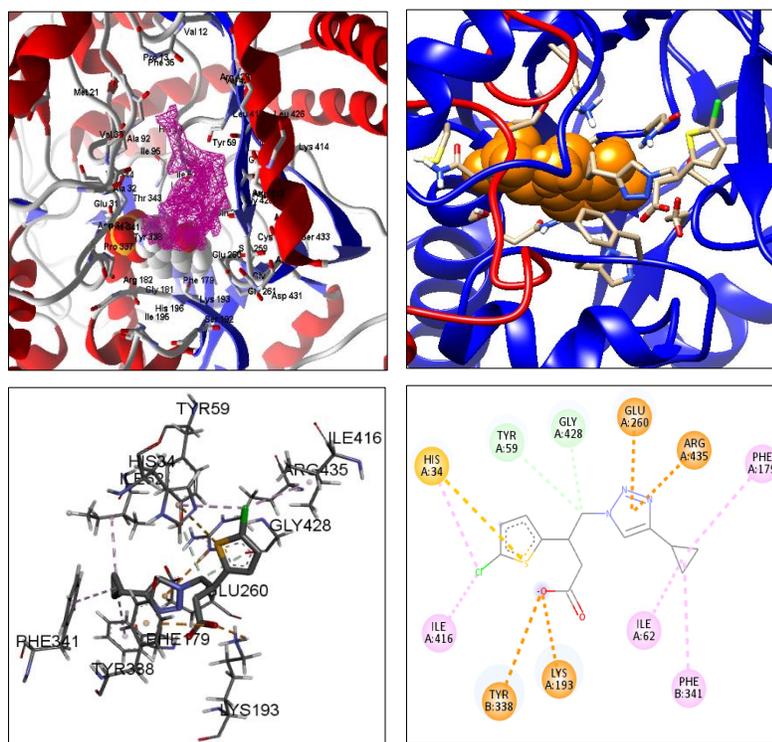


Figura 46. Interacciones de (S)-9c en el sitio catalítico.

Nuestros resultados computacionales sugieren que los compuestos (R)-9a, (S)-9a, (R)-9b y (S)-9b y (S)-9c pueden ser buenos candidatos para futuras pruebas biológicas, con el fin de confirmar su actividad biológica inhibidora sobre la enzima GABA-AT. En la **Tabla 11** se logra observar que nuestras moléculas objetivo mantuvieron interacciones similares con respecto a los andamos de referencia, interacciones con residuos de aminoácidos como la Arg182, Tyr338, Phe341, His34, Ile62, Ile416, Lys193 y Glu260; así como también algunas otras interacciones en menor número como por ejemplo con residuos de aminoácidos como Arg435, Tyr59, Gly428, Phe179, Thr343 y Cys429, lo que pudiera dar indicios de que nuestras moléculas de interés muestran una interacción de una manera similar que los andamios de referencia, dentro del sitio de unión del modelo de humano. Como se mencionó anteriormente, en este modelo se obtuvo un mayor número de interacciones con respecto al modelo de *P. fluorescens*, esto podría atribuirse al mayor volumen y tamaño en el sitio activo. De igual manera, en esa tabla se logran observar los valores de energía de unión, estos nos proporcionan una idea sobre la afinidad de nuestros análogos con respecto a los análogos de referencia en el sitio activo de la enzima. Los valores de energía de los compuestos objetivo son relativamente más cercanos a los de referencia, incluso los compuestos (R)-9a y (S)-9a mostraron un mayor valor de energía de unión que los mencionados anteriormente. Esto nos conduce a deducir que mediante a las interacciones que se mantienen, al acomodo (orientación) y valores de energía similar en el sitio activo estos podrían actuar como inhibidores de la GABA-AT.

Estos resultados abren la posibilidad de explorar nuevas series de análogos de GABA como inhibidores reversibles de GABA-AT, con una mayor diversidad de andamios heterocíclicos. De lo descrito anteriormente podemos sugerir que los análogos de GABA con el sustituyente en β (cloro-tiofeno) y del anillo de triazol (aromático), pueden ser útiles

en el diseño de inhibidores potenciales basados en el anclaje de la molécula en el sitio activo de la enzima, debido al tipo de interacciones π - π que presentan algunos complejos, ya que estabilizan a la molécula en el sitio activo, además, de tener fuertes interacciones de puente de hidrógeno con los átomos de N del anillo de triazol.

Tabla 11. Interacciones de todos los compuestos de interés con los aminoácidos.

Compuesto	Energía de unión (kcal/mol)	Residuos de aminoácidos													
		Arg 435	Arg 182	Tyr 338	Tyr 59	Gly 428	Phe 179	Phe 341	His 34	Ile 62	Ile 416	Thr 343	Lys 193	Cys 429	Glu 260
GABA	-4.0		X				X					X			X
(S)-vigabatrina	-5.0		X	X				X		X		X			X
(R)-8a	-7.8		X	X					X	X					X
(S)-8a	-7.6		X	X		X	X			X			X		X
(R)-8b	-8.0	X	X				X			X	X			X	X
(S)-8b	-7.8	X	X	X				X		X			X		X
(R)-8c	-7.5			X				X		X			X		X
(S)-8c	-7.1			X	X			X	X	X	X		X		
(R)-9a	-7.7		X					X	X	X	X		X	X	X
(S)-9a	-8.0		X	X				X	X						X
(R)-9b	-6.7		X	X				X	X	X			X	X	X
(S)-9b	-6.1		X		X			X	X	X			X		X
(R)-9c	-5.9	X		X		X	X			X			X		
(S)-9c	-6.8	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X

6.14. Acoplamiento molecular empleando modos normales (NMA)

Para el modelo de homología de humano, también, se hizo uso de la técnica de modos normales, la cual nos permitió identificar los cambios conformacionales de la proteína con base en su cadena principal, es decir, permitió realizar el análisis del movimiento estructural del sistema de interés. Además, permite observar si existe un cambio en los residuos de aminoácidos presentes en el sitio catalítico de la proteína. Como en el caso de *P. fluorescens*, se decidió llevar a cabo el mismo análisis a los compuestos más prometedores [(R)-9a y (R)-9b] según con los resultados obtenidos del acoplamiento molecular con el modelo de homología de humano (energía de unión más alta), debido a que son compuestos de interés en este proyecto, para una futura síntesis y evaluación enzimática.

En la **Figura 47** se observan los cambios conformacionales del modelo de GABA-AT de humano. Cabe mencionar, que como en el modelo de *P. fluorescens* la proteína del inciso c) resulto la más favorable, debido a que esta presento un mayor volumen de cavidad, además, fue la que resulto con menos impedimentos estéricos debido a su movimiento conformacional.

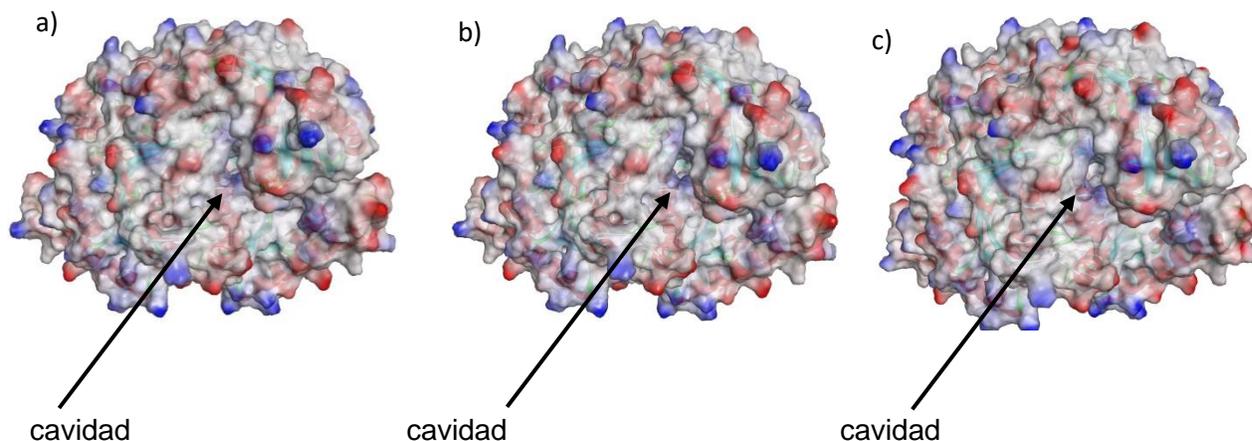


Figura 47.- Cambio conformacional del modelo de GABA-AT de humano; a) modo 7, b) modo 8, c) modo 9.

En la **Figura 48** se puede observar el modo de unión entre la molécula (*R*)-**9a** y el modelo de homología GABA-AT de humano. En la **Tabla 12** se muestran los resultados de energía de unión obtenidos del acoplamiento, cabe mencionar que sucedió lo mismo que en el modelo de *P. fluorescens*, en la cual se puede observar que el modo **9** es el que resultó más favorable, esto se debe a que, se obtuvo un mayor valor de energía en ese modo, debido a que la proteína presento una cavidad ligeramente mayor, lo que hace que la molécula se acomode de mejor manera y sea más estable el complejo proteína-ligando, a diferencia de los modos **7** y **8**, en donde presentaron una cavidad ligeramente menor.

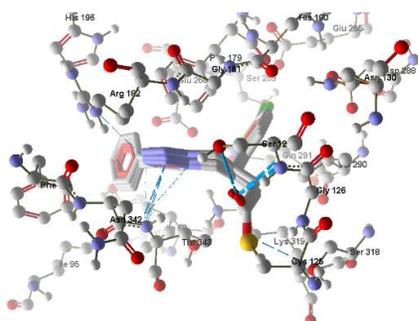


Tabla 12.- Resultados obtenidos del docking.

MODO	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)
7	-6.6	-6.6	-5.9
8	-6.7	-6.7	-5.7
9	-6.7	-6.6	-6.2

Figura 48. Acoplamiento molecular de (*R*)-**9a** empleando modos normales.

En la figura anterior se puede observar los puentes de hidrógeno que presentó la molécula (*R*)-**9a** con el modo **9** de la proteína de homología de humano, generando fuertes enlaces de hidrógeno con el anillo de triazol y los residuos de aminoácidos como Thr343 y

Arg182; así mismo, el residuo carboxilato presentó este tipo de interacción con residuos de Ser127 y Ser318, generando más interacciones que en los modos **7** y **8** de la proteína.

En la **Figura 49** se puede observar el modo de unión entre la molécula (*R*)-**9b** y el modelo de homología GABA-AT de humano. En la **Tabla 13** se muestran los resultados de score obtenidos del docking, en la cual se puede observar que el modo **9** es el que resultó más favorable, como en el caso anterior.

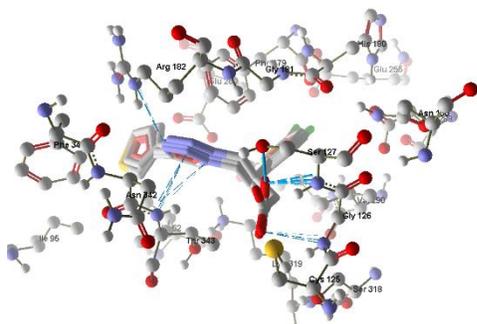


Tabla 13.- Resultados obtenidos del docking.

MODO	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)	Energía de unión (kcal/mol)
7	-6.1	-6.2	-5.8
8	-6.4	-6.2	-5.4
9	-6.3	-6.2	-6.2

Figura 49.- Acoplamiento molecular de (*R*)-**9b** empleando modos normales.

En la figura anterior se pudo observar los enlaces de hidrógeno que presentó la molécula (*R*)-**9b** con el modo **9** de la proteína de homología de humano, generando fuertes enlaces de hidrógeno con el anillo de triazol y los residuos de aminoácidos como Thr343 y Arg182; así mismo, el resto carboxilato presentó este tipo de interacción con residuos de Ser127 y Gly126, manteniendo algunas interacciones con respecto a la molécula (*R*)-**9a**; además, se observaron más interacciones que en los modos **7** y **8** de la proteína.

Con base en nuestros resultados computacionales podemos sugerir que los compuestos (*R*)-**9a** y (*R*)-**9b** presentan una probabilidad de poder actuar como inhibidores de la GABA-AT. Debido a que, no sólo en los estudios de acoplamiento en *P. fluorescens* y de humano mostraron resultados favorables, sino también en el análisis de modos normales, como se observó anteriormente, su orientación fue favorable en el modo de conformación **9** ya que en ésta, existe un mayor volumen de la cavidad, así como también, en esta conformación no existen tantos choques estéricos mediante el movimiento de la proteína, generando que las moléculas puedan anclarse de la mejor manera en el sitio activo, mostrando una estabilidad mediante las interacciones que se observaron anteriormente.

7. CONCLUSIONES

- Se logró determinar y caracterizar el sitio de unión de los modelos de homología de GABA-AT, en los cuales se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento.
- En los estudios de acoplamiento molecular se demostró la orientación y el tipo de interacciones que presentaron las moléculas de GABA y vigabatrina, las cuales mantuvieron interacciones con los residuos de los aminoácidos: Arg143, Arg182, Tyr140, Tyr157, Glu213, Thr343 y Glu260.
- Se logró determinar el modo de unión en el sitio activo de cada uno de los compuestos de referencia (**8a-d**), notando que mantienen el anillo de triazol y su sustituyente orientado hacia el PLP. Además, se determinaron sus interacciones ligando-enzima, observando que mantienen interacciones con aminoácidos como la Arg400, Arg182, Tyr157, Tyr338, Cys392, Cys79, Ile52, Ile62, Glu213, Glu260, Lys153 y Lys193.
- Se logró predecir la actividad inhibitoria de los análogos de interés (**9a-d**). Además, se demostró que su orientación, dentro del sitio de unión, es similar a la de los compuestos de referencia, donde el anillo de triazol y su sustituyente están orientados hacia el PLP. De igual manera, se determinó sus interacciones que estos presentaron, observando que mantienen interacciones similares en relación con los compuestos **8a-d**, interacciones con la Tyr157, Tyr338, Cys79, Ile52, Ile62, Glu213, Glu260, Lys153, Lys193, Arg182, dando indicios de que estos posiblemente presenten actividad inhibitoria sobre la GABA.AT.
- Mediante a los resultados obtenidos, se han identificado los compuestos [(*R*)-**9a**, (*S*)-**9a**, [(*R*)-**9b**], [(*S*)-**9b**] que se unen con buena afinidad (mejor perfil en actividad *in silico*), dando evidencia de que las moléculas pueden actuar como posibles inhibidores sobre las enzimas.
- Se estudiaron las interacciones con el modelo de homología de GABA-AT de humano; esto para analizar su posible aplicación como fármacos comerciales.
- El reemplazo estructural del sustituyente aromático en posición β proporcionó una mejora en el número de interacciones y en las propiedades moleculares de los análogos de interés.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar la síntesis de los triazoles que resultaron favorables de acuerdo a los resultados obtenidos. (metodología propuesta en anexos).
- ✓ Llevar a cabo pruebas de inhibición enzimática a los triazoles sintetizados y determinar su posible actividad inhibitoria sobre la enzima GABA-AT.

9. REFERENCIAS

- 1) Parmar, L.; Morgan, L. D.; Patel, B. A.; *Anal. Methods.*, **2011**, 3, 2770–2776.
- 2) Rodney, L. J.; Koerner, J. F.; *J. Med Chem*, **1988**, 31, 2066-2069.
- 3) Silverman, R. B. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 4037–4070.
- 4) El Idrissi, A.; Trenkner, E.; *Neurochem. Res.*, **2004**, 29, 189–197.
- 5) Juncosa, J. I.; Takaya, K.; Le, H. V.; Moschitto, M. J.; Weerawarna, P. M.; Mascarenhas, R.; Liu, D.; Dewey, S. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 2151–2164.
- 6) Patiño Restrepo, J. F. *Metabolismo, Nutrición y Shock*; Médica Panamericana, **2006**.
- 7) Le, H. V.; Hawker, D. D.; Wu, R.; Doud, E.; Widom, J.; Sanishvili, R.; Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4525–4533.
- 8) <https://www.pharmacologyeducation.org/pharmacology/receptors>
- 9) Purves, D.; Augustine, G.J.; Fitzpatrick, D.; et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Two Families of Postsynaptic Receptors.
- 10) Watanabe M.; Maernura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H., *Int. Rev. Cytol.*, **2002**, 213.
- 11) Bettler, B.; Kaupmann, K.; Mosbacher, J.; & Gassmann, M., *Physiol. Rev.* **2004**, 84, 835–867.
- 12) Hawker, D. D.; Silverman, R. B. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20 (19), 5763–5773.
- 13) Cobos Iglesias, J. A. síntesis y estudio estructural de nuevos gamma-péptidos ciclobutánicos, Universidad Autónoma de Barcelona, **2011**.
- 14) Baldaof, C.; Gunther, R.; Hofmann, H. J. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1200.
- 15) Lippert, B.; Metcalf, B. W.; Michel, J. J. U. N. G.; Casara, P.; *Eur. J. Biochem.*, **1977**, 74, 441-445.
- 16) Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B.; Sanishvili, R.; Widom, J.; Doud, E.; Wu, R.; Hawker, D. D.; Le, H. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4525–4533.
- 17) Ordoñez, M.; Cativiela, C. *Tetrahedron Asymmetry*. **2007**, 18, 3–99.
- 18) (a) Johnston, G. A. R.; Allan, R. D.; Kennedy, S. M. G.; Twitchin, B.; Krogsgaard-Larsen, P.; Scheel-Kruger, J.; Kofoed Copenhagen Munksgaard, 1978., H. GABANeurotransmitters: Pharmacochemical Biochemical and Pharmacological Aspects. (b) Song, S.; Zhu, S. F.; Pu, L. Y.; Zhou, Q. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 6072 –6075.
- 19) Le, H. V.; Hawker, D. D.; Wu, R.; Doud, E.; Widom, J.; Sanishvili, R.; Liu, D.; Kelleher, N. L.; Silverman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4525–4533.
- 20) Wanner, K. T.; Steffan, T.; Renukappa-Gutke, T.; Höfner, G, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1284–1306.

- 21) Andrews, P. R., Gulbis, J. M.; Iskander, M. N.; Mackay, M. F.; Di Paola, C.; Sadek, M., *Aust. J. Chem.* **1988**, 41, 493.
- 22) Deep, A.; Iftikhar, H.; Batool, S.; Narasimhan, B.; Sharma, P. C.; Malhotra, M., *Arab. J. Chem.* **2017**, 10, S1267
- 23) Taylor, R. D.; MacCoss, M.; Lawson, A. D. G., *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 5845-5859.
- 24) Tovar-Gudiño, E.; Guevara-Salazar, J. A.; Bahena-Herrera, J. R.; Trujillo-Ferrera, J. G.; Martínez-Campos, Z.; Razo-Hernández, R. S.; Santiago, A.; Pastor, N.; Fernández-Zertuche, M. "Novel-Substituted Heterocyclic GABA Analogues. Enzymatic Activity against the GABAAT Enzyme from *Pseudomonas fluorescens* and In Silico Molecular Modeling". *Molecules*. 2018, 23, 1128-1154.
- 25) Rodríguez-Lozada, J.; Tovar-Gudiño, E.; Guevara-Salazar, J. A.; Razo-Hernández, R. S.; Santiago, A.; Pastor, N.; Fernández-Zertuche, M. "QSAR and Molecular Docking Studies of the Inhibitory Activity of Novel Heterocyclic GABA Analogues over GABA-AT". *Molecules*. **2018**, 23, 2984.
- 26) Díaz-Peralta, L.; Razo-Hernández, R. S.; Santiago, A.; Pastor, N.; Guevara-Salazar, J. A.; Fernández-Zertuche, M. "1,4-Disubstituted-1,2,3-triazole GABA Analogues: Synthesis, In Vitro Evaluation, Quantum QSAR and Molecular Docking against *Pseudomonas fluorescens* GABA-AT". *ChemistrySelect*. **2020**, 5, 1071-1079.
- 27) Ayati, A.; Emami, S.; Foroumadi, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 109, 380–392.
- 28) a) Dalvie, D. K.; Kalgutkar, A. S.; Khojasteh-Bakht, S. C.; Obach, R. S.; O'Donnell, J. P. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 269–299; (b) Horne, W.S.; Yadav, M.K.; Stout, C.D.; Ghadiri, M.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15366–15367.
- 29) T. Mavromoustakos, S. Durdagi, C. Koukoulitsa, M. Simcic, M.G. Papadopoulos, M. Hodoscek; S. Golic Grdadolnik. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, 18, 2517-2530.
- 30) Tetko, I.; Gennadiy I. P., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5601-5604.
- 31) Medina-Franco, J. L., et al. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educación Química*, **2015**.
- 32) Medina-Franco, J. L.; López-Vallejo, F.; Castillo, R.; *Educación Química*, **2006**, 4, 452-457.
- 33) Clark, D. E.; *Expert Opin. Drug Discov.* **2006**, 1,103-110.
- 34) Dias, R.; Filgueira de Azevedo Jr., W.; *Curr. Drug Targets*, **2008**, 9, 1040-1047.
- 35) Delgadillo, C. A.; Minguillón-Llombar, C.; Joglar-Tamargo, J. *Introducción a la Química Terapéutica*, 2° ed, Ediciones Díaz de Santos, España, **2003**, 279-281.
- 36) Ferreira, G. L., Dos Santos, R., Glaucius, O., Andricopulo, A. D. *Molecules*, **2015**, 20, 13384-13421.

- 37) Meng, X.; Zhang, H.; Mezei, M.; Cui, M.; *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, **2011**, 7, 146-157
- 38) Roy, K.; Kar, S.; Das, R. N., “*Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*”; Academic Press. **2015**.
- 39) Fischer E. *Chem.Ges.* **1894**, 27, 2985–2993
- 40) Koshland DE Jr., *Science*, **1963**, 142, 1533–1541.
- 41) Tanos Celmar Costa França; Homology Modeling: an important tool for the drug discovery, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **2014**,
- 42) Krieger, E.; Nabuurs, S., B., Vriend, G.; *Structural Bioinformatics, homology modeling*, **2003**, 509-523.
- 43) Cavasotto, C. N., Phatak, S. S.; *Drug Discov. Today*, **2009**,14, 676-683.
- 44) Suhre, K.; Sanejouand, Y., *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, W610-W614.
- 45) Riley BT, Broendum SS, Reboul CF, Cowieson NP, Costa MGS, Kass I, et al. (2015) Dynamic Motion and Communication in the Streptococcal C1 Phage Lysin, PlyC. *PLoS ONE* 10 (10): e0140219. doi: 10.1371/journal.pone.0140219
- 46) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1997**, 23, 3-25.
- 47) Tetko, I. V., Bruneau, P.; *J. Pharm. Sci.*, **2004**, 93, 3103-3110.
- 48) Volkamer, A.; Kuhn, D.; Grombacher, T.; Rippmann, F.; Rarey M.; *J. Chem. Inf. Model*, 2012, 52, 360-372.

10. ANEXOS

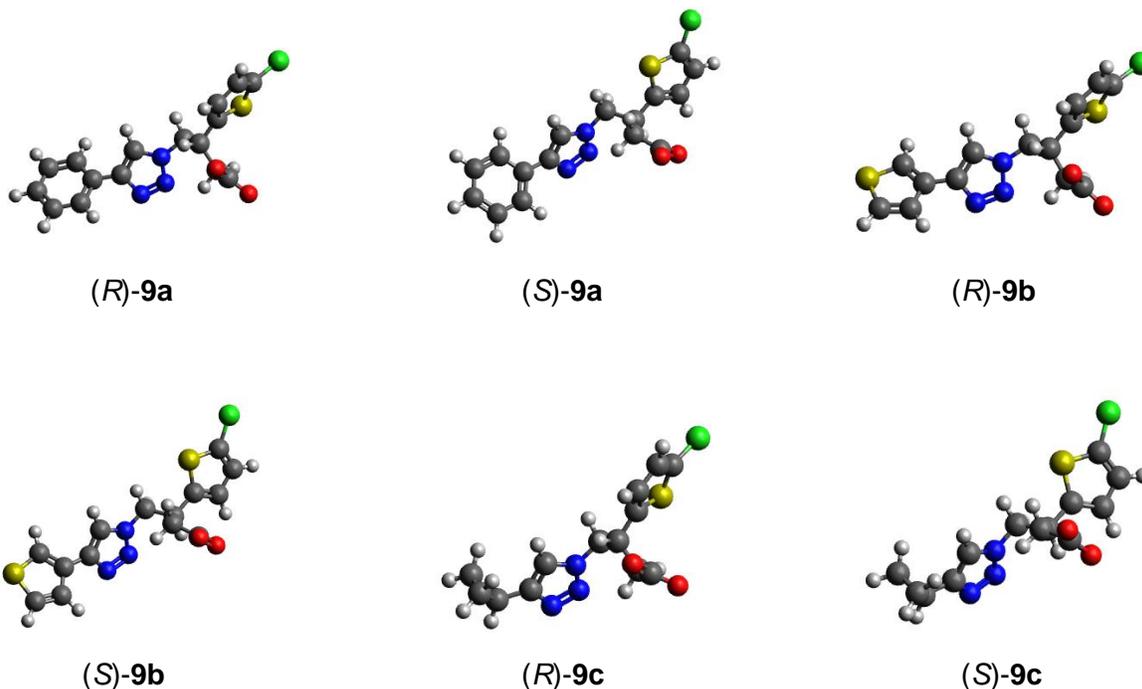
10.1 Cálculos de acoplamiento molecular

Los cálculos de acoplamiento molecular de todos los análogos de GABA sobre las estructuras de *P. fluorescens* y de humano, generados en el proceso de modelado de homología, se realizaron mediante el software vina el cual emplea la interfase chimera. Las cavidades se detectaron mediante el método de esfera expandida de Van der Waals, mediante el programa Protein plus, disponible en la red. Los cálculos se realizaron sobre el sitio catalítico de cada modelo proteico, cabe mencionar el cálculo se realizó tres veces para cada molécula.

Las figuras mostradas del acoplamiento molecular fueron obtenidas del programa Discovery Studio Visualizer (BIOVIA). Los valores de logP fueron obtenidos a partir del navegador en línea Virtual Computational Chemistry Laboratory.

10.2. Optimización estructural de los análogos de GABA.

La optimización de las estructuras tridimensionales de los análogos fue realizada mediante el software Avogadro, en su forma enantiomérica de cada una de ellas, además, se obtuvo el tipo de cargas parciales naturales de todos los compuestos en estudio, debido a que la actividad biológica de compuestos con grupos funcionales como ácidos carboxílicos y aminas está altamente relacionada con su capacidad de ionizarse a pH fisiológico. (Figura 50).



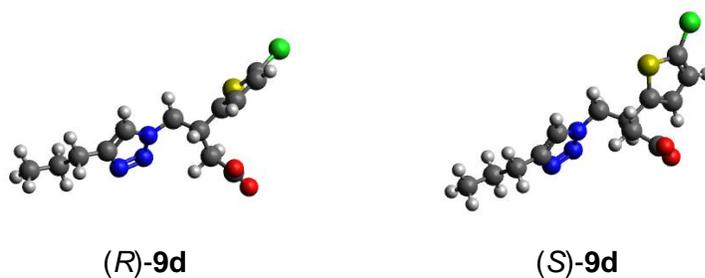


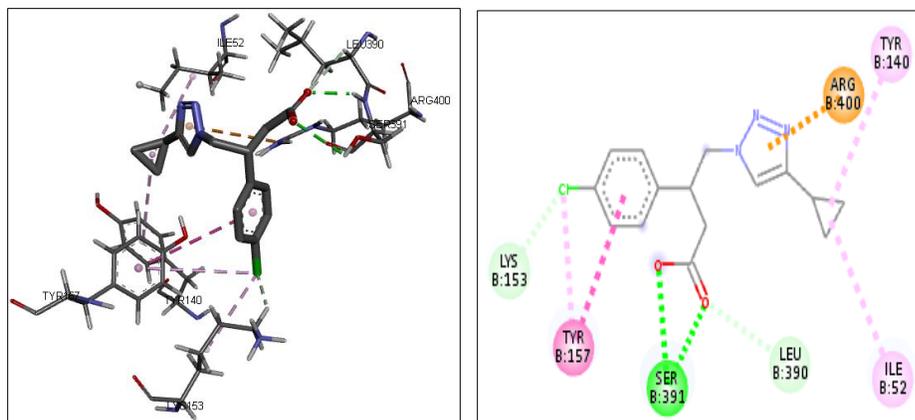
Figura 50. Geometría optimizada de todos los análogos de GABA en este estudio. Las esferas grises (carbono), blancas (hidrógeno), rojas (oxígeno), azules (nitrógeno), amarillas (azufre) y verdes (cloro).

10.3. Modelo GABA-AT de *Pseudomonas fluorescens*

10.3.1 Compuestos de referencia (8c-8d).

A partir de los resultados de acoplamiento, los compuestos (*R*)-8c y (*S*)-8c (**Figura 51**), mostraron una menor interacción con la proteína, en comparación con los compuestos mostrados en los resultados; en estos se favorecieron las interacciones hidrofóbicas y las de tipo π -alquilo con la Ile52 a 5.11 y 5.36 Å, respectivamente y con la Tyr140 a 4.76 y 4.59 Å, respectivamente (lila), debido al sustituyente (ciclopropilo) del anillo de triazol; además, ambos compuestos mantienen una interacción de enlace de hidrogeno entre la Ser391 y el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.77 y 3.17 Å (verde).

a)



b)

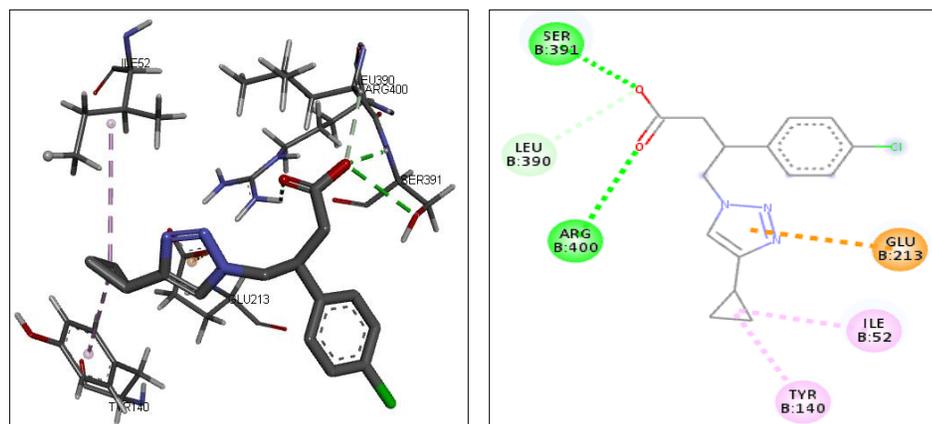
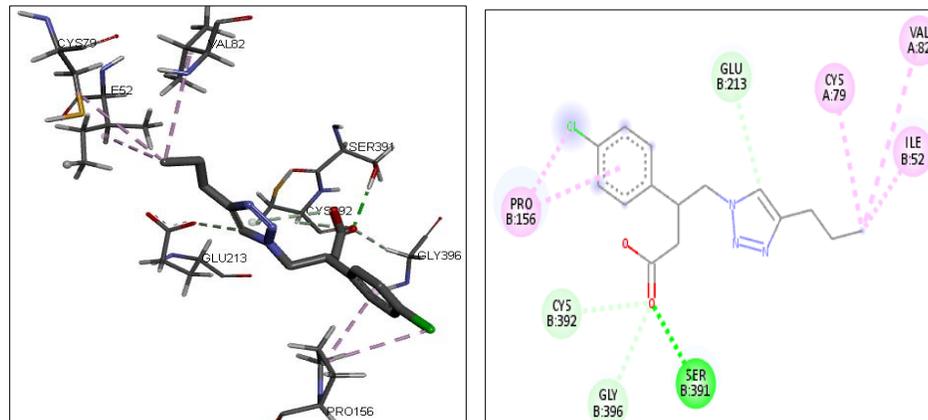


Figura 51. Interacciones de a) (*R*)-**8c** y b) (*S*)-**8c** en el sitio catalítico.

Así mismo, el acoplamiento de los compuestos (*R*)-**8d** y (*S*)-**8d** (Figura 52), mostraron una interacción similar a los descritos anteriormente; en estos se favorecieron aún más las interacciones hidrofóbicas y las de tipo π -alquilo entre la Ile52 y el sustituyente *n*-propilo a 3.95 y 4.90 Å, respectivamente y con la Tyr140 a 4.63 Å (lila), además de tener otras interacciones entre el sustituyente *n*-propilo con la Cys79 a 4.44 Å y con la Val82 a 4.96 Å (lila); además, ambos compuestos mantienen una interacción de enlace de hidrogeno con la Ser391 y el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.16 y 3.19 Å, respectivamente (verde).

c)



d)

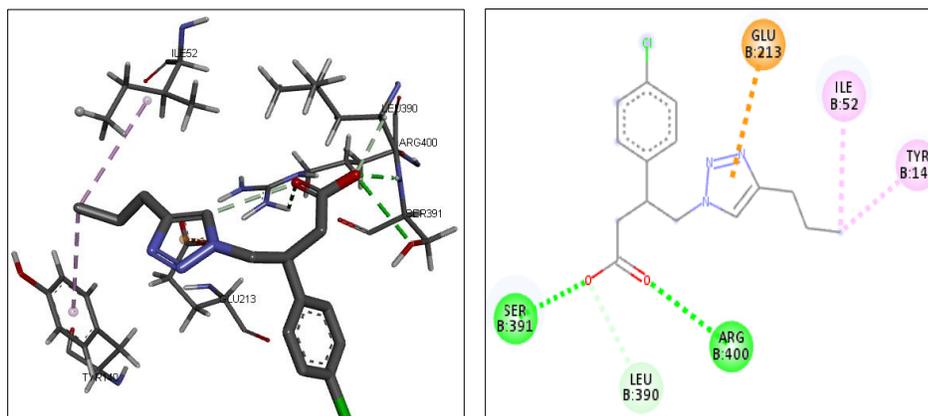
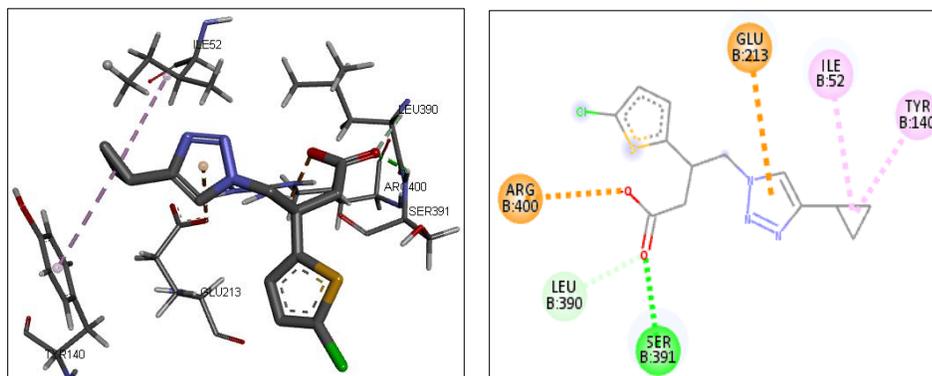


Figura 52. Interacciones de c) (*R*)-**8d** y d) (*S*)-**8d** en el sitio catalítico.

10.3.2 Análogos de interés (9c-9d).

En el caso de los compuestos (*R*)-**9c** y (*S*)-**9c** (**Figura 53**), mostraron una interacción similar a las descritas anteriormente; en estos se observan interacciones hidrofóbicas y de tipo π -alquilo con la Ile52 y el sustituyente ciclopropilo a 5.23 y 5.17 Å, respectivamente y con la Tyr140 a 4.50 y 4.75 Å, respectivamente (lila), además, ambos compuestos mantienen una interacción de enlace de hidrogeno entre la Ser391 y el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.13 y 2.31 Å, respectivamente (verde).

e)



f)

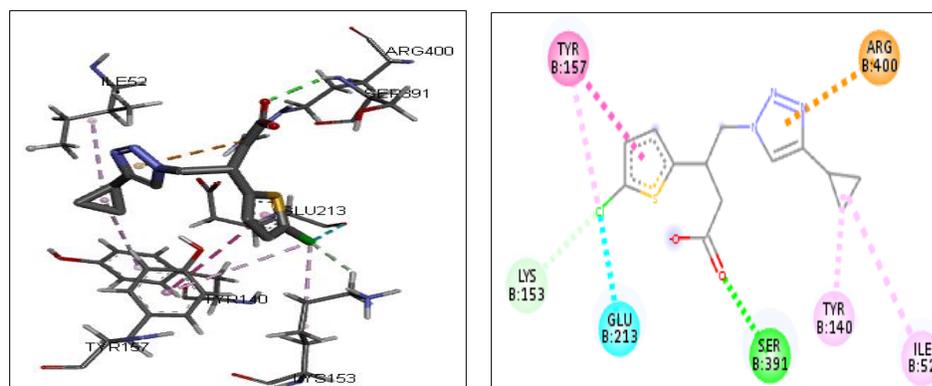


Figura 53. Interacciones de e) (*R*)-**9c** y f) (*S*)-**9c** en el sitio catalítico.

En el caso de los compuestos (*R*)-**9d** y (*S*)-**9d** (**Figura 54**), mostraron el mismo tipo de interacción con respecto a los anteriores; en estos se siguen observando interacciones hidrofóbicas y las de tipo π -alquilo entre la Ile52 y el sustituyente *n*-propilo a 4.56 y 4.81 Å, respectivamente y con la Tyr140 a 4.14 y 4.18 Å, respectivamente (lila). Además, ambos compuestos mantienen una interacción de enlace de hidrogeno con la Ser391 y el átomo de oxígeno del carbonilo de la molécula a 2.10 y 2.28 Å, respectivamente (verde).

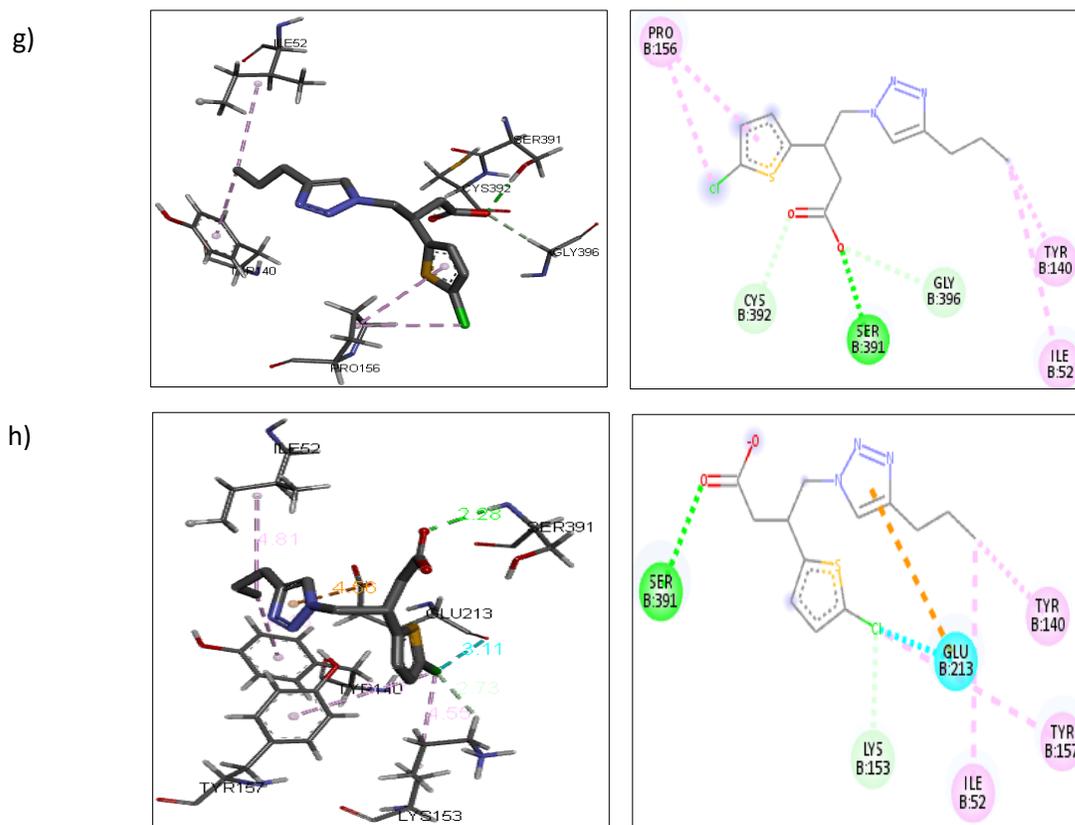


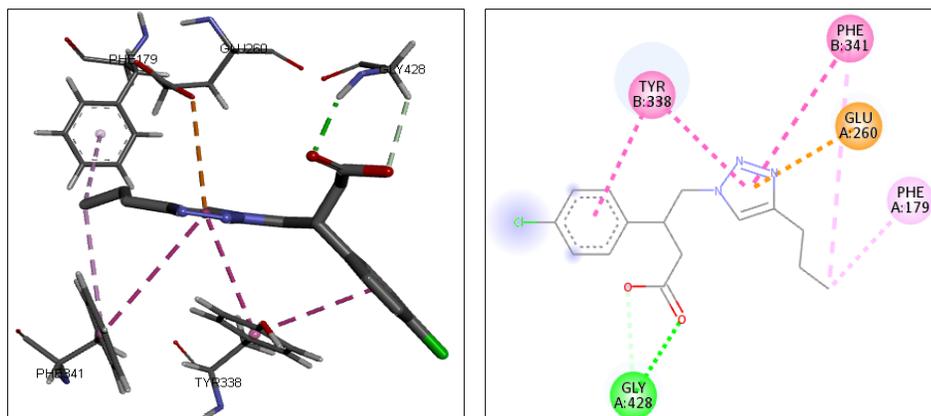
Figura 54. Interacciones de g) (*R*)-**9d** y h) (*S*)-**9d** en el sitio catalítico.

10.4. Modelo GABA-AT de humano

10.4.1. Compuesto de referencia (**8d**)

A partir de los resultados de acoplamiento, los compuestos (*R*)-**8d** y (*S*)-**8d** (Figura 55), mostraron una interacción diferente con la proteína, ya que se observan interacciones de tipo π - π entre el anillo de triazol y el sustituyente cloro-fenilo con los residuos de aminoácidos de Tyr338 a 4.33 y 3.78 Å, y con Phe341 a 4.74 Å y con la His34 a 5.28 Å, respectivamente (rosa); así como también se observan interacciones de tipo π -alquilo entre la Phe179 y el *n*-propilo a 4.79 Å y con la Phe 341 y el mismo sustituyente a 5.41 Å (lila).

a)



b)

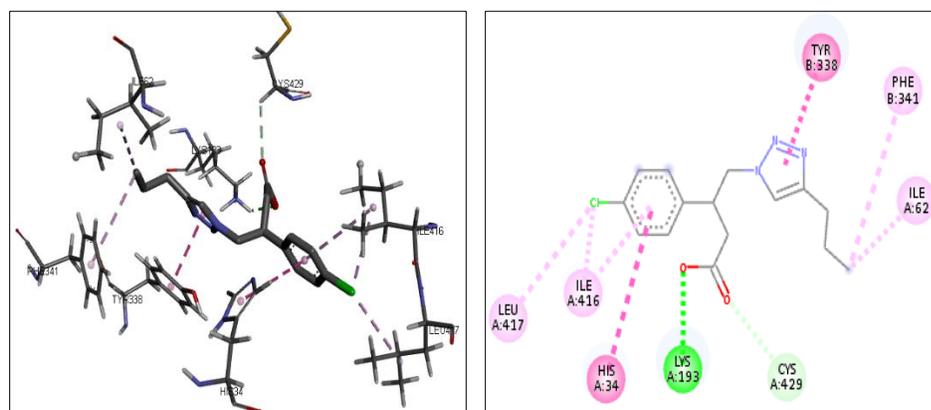


Figura 55. Interacciones de a) (*R*)-**8d** y b) (*S*)-**8d** en el sitio catalítico.

10.4.2. Análogo de interés (**9d**)

Para el caso del compuesto (*R*)-**9d** se observan interacciones de tipo hidrofóbicas entre la Ile62 y el sustituyente *n*-propilo a 3.95 Å (rosa); así como también interacciones de tipo π -alquilo entre la Phe341 y el *n*-propilo a 4.88 Å, y de la Tyr338 con el átomo de cloro a 4.86 Å, respectivamente (lila). Una interacción de enlace de hidrógeno entre el N del anillo de triazol y la Arg435 a 2.95 Å (verde).

En contraste, el compuesto (*S*)-**9d** (**Figura 56**), solo muestra dos interacciones de tipo π -alquilo, una con el grupo *n*-propilo y la Phe179 a 4.41 Å, y la segunda entre el átomo de cloro y la Tyr338 a 5.02 Å (lila).

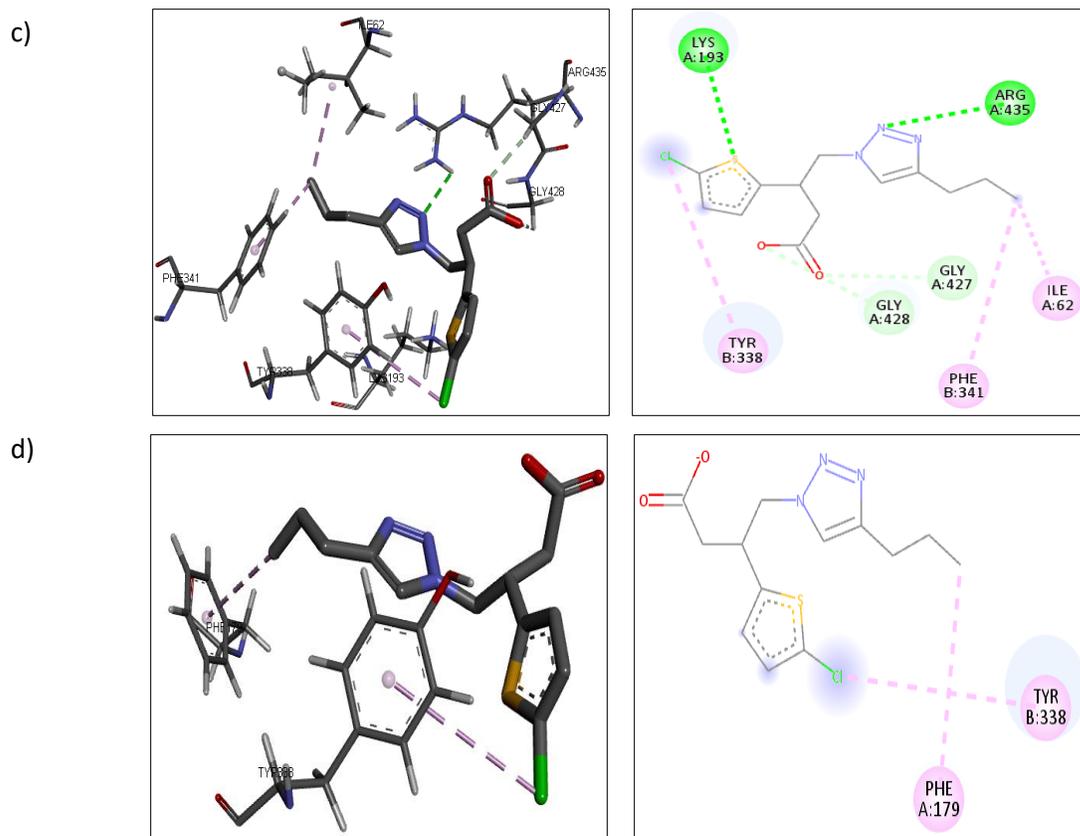
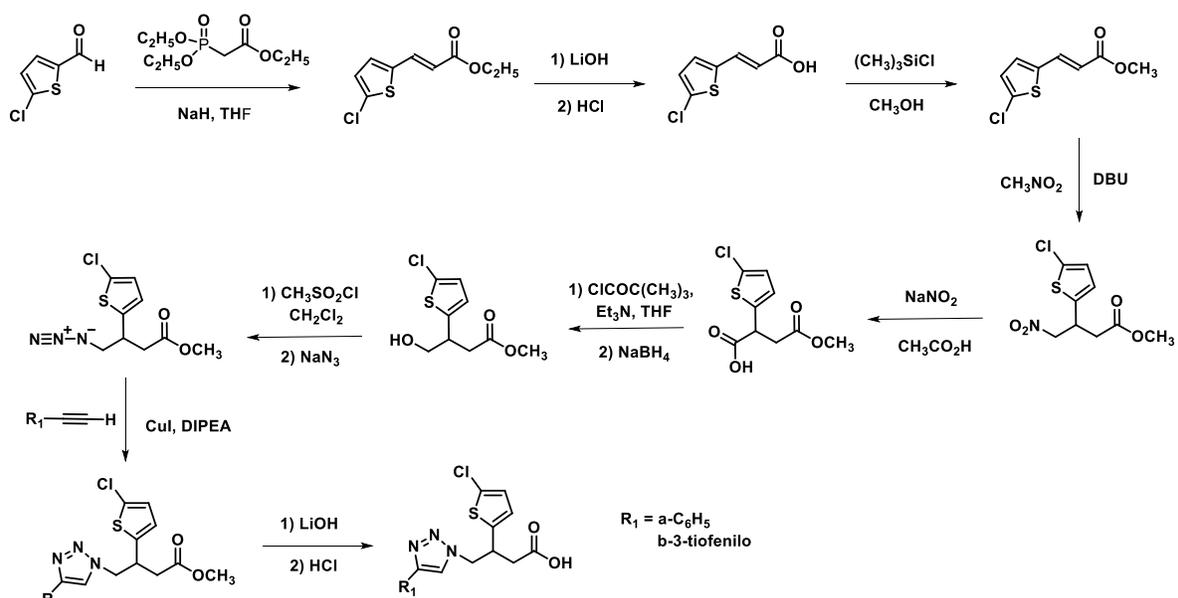
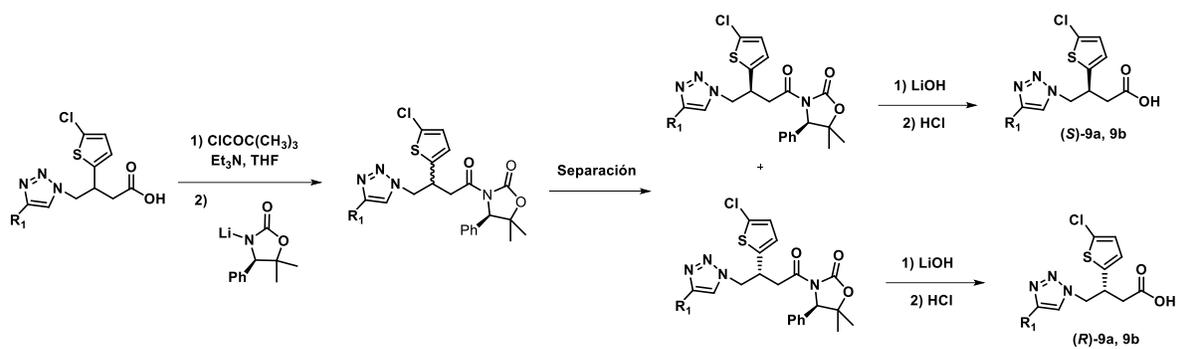


Figura 56. Interacciones de c) *(R)*-9d y d) *(S)*-9d en el sitio catalítico.

10.5. Síntesis general de los análogos de interés





Esquema 5. Propuesta de síntesis de los análogos objetivo.