



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICAS
AREA BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Tesis para la obtención del grado en
Maestría en Ciencias Químicas

**Evaluación *in-silico* de la actividad catalítica
del Citocromo P450 2C9 sobre
Fenprocumón**

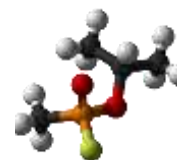
POR

Biol. Israel Quiroga Montes

Director de Tesis

D. en C. Thomas Scior

Laboratorio de Simulación Molecular, Posgrado de Ciencias
Químicas, BUAP



ABSTRACT

El metabolismo de xenobióticos es un tema ampliamente estudiado y considerado en el uso de nuevos fármacos; factores de farmacocinética y farmacodinamia están estrechamente relacionados al metabolismo de los fármacos. El sistema de monooxigenasa citocromo P450 (CYP450) es una vía crucial a este respecto, representa la mayor parte de la primera etapa de metabolismo de xenobióticos. La familia CYP pertenece a la monooxigenasa con una b grupo hemo en el centro del sitio catalítico. Los estudios *in-silico* de efectos adversos/tóxicos provocados por las drogas y productos químicos ofrecen una alternativa eficiente en términos de costo-beneficio a los modelos convencionales de pruebas con animales.

Fenprocumón (PPC) es un anticoagulante oral miembro de la familia de anticoagulantes cumarínicos utilizado para la profilaxis y tratamiento de los trastornos debidos a trombosis; sin embargo, si no es metabolizado de manera eficiente puede causar hemorragias internas, afectando a tracto gastrointestinal, vías urinarias o cerebro. CYP2C9, miembro de la súperfamilia de citocromos P450, es la principal enzima responsable del metabolismo de fenprocumón.

Para el presente estudio, se realizó modelado molecular con el fin de obtener una visión mecanicista en la biotransformación de fenprocumón mediado por las enzimas de citocromo P450 (CYP). Se evaluó computacionalmente si las energías de interacción proteína-ligando de las conformaciones obtenidas del ligando mediante acoplamiento molecular, reflejan las preferencias de regio- y estero-selectividad de CYP2C9 sobre este fármaco reportadas experimentalmente. El método para el acoplamiento molecular de los complejos CYP2C9-PPC modelados en este estudio fueron validados mediante el acoplamiento molecular de otros complejos CYPs cristalizados, al colocar el ligando nuevamente en su conformación de unión a la proteína en los complejos donde se conoce su posición. La sustrato- y regio-selectividad de un CYP determinado, está impulsado principalmente por los requerimientos estéricos conforme a los patrones de las cadenas laterales en la cavidad cerca del grupo hemo en los sitios catalíticos entre las isoformas CYP. Esto hace susceptible que el estudio y predicción de los sitios de metabolismo (SoMs) de un determinado fármaco pueda realizarse satisfactoriamente empleando un enfoque de campos de fuerza (mecánica molecular) por sí sola; aunque, se admiten las limitaciones de su éxito por las implicaciones de los reordenamientos que las cadena lateral puedan presentar debido al modelo de ajuste inducido de las enzimas.

ABREVIATURAS

CYP	Citocromo P450
PPC	Fenprocumón
WFN	Warfarina
MSA	Alineamiento múltiple de secuencias
SoM	Sitio de metabolización de los sustratos
FF	Campo de fuerza
VKOR	Epóxido reductasa de vitamina K
KO	Vitamina K epoxidada
PDB	Base de datos de proteínas
MD	Dinámica molecular
MM	Mecánica molecular
FLP	Flurbiprofeno
RMSD	Desviación de la raíz cuadrada de la media
M(s)	Metabolito(s)
S(s)	Sustrato(s)
AD4	AutoDock 4.2
ABC	Área Bajo la Curva

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.....	1
1.2 CITOCROMOS P450, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD	2
1.3 CYP2C9, LA ENZIMA DE INTERÉS, SU ROL EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS Y FENPROCUMÓN	8
1.3.1 Citocromo P450 2C9 (CYP2C9)	8
1.3.2 Estructura, actividad y metabolismo del sustrato de estudio: Fenprocumón	10
1.3.3 CYP2C9 y su rol en el metabolismo de los anticoagulantes cumarínicos	14
1.4 MODELADO Y CÁLCULO DE ENERGÍAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA.....	17
1.4.1 Campos de fuerza en el modelado molecular	19
1.4.2 Acoplamiento molecular y puntuación de sus resultados.....	20
1.4.3 Efecto de las interacciones metálicas en el modelado con mecánica molecular y acoplamiento molecular	21
1.4.4 El problemáticas en estudios de modelado con mecánica molecular y acoplamiento molecular	21
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	22
2.1 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAL Y MÉTODOS	23
3.1 MATERIAL (HARDWARE)	23
3.2 MATERIA (SOFTWARE).....	24
3.2.1 Swiss-Pdb Viewer.....	24

3.2.2 VEGA ZZ	24
3.2.3 Discovery Studio 4.0 Client	24
3.2.4 AutoDock Tools	24
3.2.5 Autodock 4.2	25
3.2.6 BioX 4.6	25
3.2.7 Yeti 8.3	25
3.3 MÉTODOS	25
3.3.1 Generación de la estructura de ligandos	26
3.3.2 Análisis de las estructuras cristalográficas de CYPs: preparación del modelo proteico.	28
3.3.3 Control del ajuste inducido: inspección y generación del modelo 3D	33
3.3.4 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos	33
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 ANALISIS DE LAS ESTRUCTURAS CRISTALIZADAS Y SECUENCIAS DE LOS CITOCROMOS P450 HUMANOS	34
4.1.1 Sitio activo de CYP2C9	35
4.1.2 Relación secuencia, estructura y función de los CYPs	37
4.1.3 Asa B-C: su papel en la actividad de los CYPs	42
4.1.4 Análisis comparativo tridimensional	44
4.1.5 El ajuste inducido en los complejos de citocromos p450 cristalizados	51
4.2 ACERCAMIENTO POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR MANUAL: EVALUACIÓN DE LAS FUERZAS QUE RIGEN LA REGIO-SELECTIVIDAD	54
4.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR, REFINAMIENTO DE POSICIONES Y CÁLCULO DE ENERGÍAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA	67

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTICAS	82
6 SUPLEMENTOS	87
6.1 Representación de la estructura terciaria de CYP2C9	87
6.2 Árbol filogenético de los CYPs humanos	88
6.3 Categorización de aminoácidos y composición del asa B-C.....	89
6.4 Redimiendo de producción de metabolitos de WFN y PPC	90
6.5 Acoplamiento molecular de los metabolitos de PPC en los CYPs que lo biotransforman	91
6.5 Energías de interacción del metabolito 7-OH-S-PPC al ser girado en la cavidad de CYP2C9 y CYP3A4	107
7 REFERENCIAS.....	108

1 INTRODUCCIÓN

1.1 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Un xenobiótico es toda sustancia ajena a un organismo. Todos los organismos vivientes, desde bacterias a mamíferos, son capaces de metabolizar a estos xenobióticos; cada uno de ellos ha desarrollado distintas estrategias, pero comparten características muy similares entre sí, haciendo lógico pensar que la cualidad de eliminar a estos xenobióticos es vital para mantener la homeostasis de los seres vivos, y que sin esta capacidad sea imposible la vida. La habilidad de metabolizar xenobióticos de los organismos heterótrofos fue desarrollada por la necesidad de eliminar a estas sustancias de manera eficiente antes de que puedan causar algún daño al organismo [1]. Los organismos que producen estos xenobióticos por lo general son las presas de otro organismo, y producen estas sustancias como mecanismo de defensa contra sus depredadores [2]. En respuesta a ésto, los depredadores han evolucionado, de acuerdo a las necesidades únicas de la dieta de cada especie, para poder alimentarse sin sufrir algún daño [2, 3].

Los fármacos son considerados xenobióticos; ésto no es raro ya que muchas de estas sustancias son extraídas de plantas u otros organismos. Por tal motivo, no es de extrañar que los humanos, con una dieta tan variada, podamos metabolizar una gran variedad de fármacos de la misma manera en que metabolizamos los xenobióticos presentes en nuestra dieta natural [4].

Gran parte de los xenobióticos son sustancias hidrofóbicas, que si no se metabolizan son difíciles de eliminar, y por consiguiente se acumularían causando intoxicación [4]. El proceso de eliminación ocurre la mayoría de la veces en dos fases reconocidas; la fase de funcionalización ocurre una vez haya ingresado el xenobiótico a la célula, este es modificado al adicionársele grupos funcionales como $-OH$, $-COOH$, $-SH$, $-O-$ ó $-NH_2$ provocando que el xenobiótico sea ligeramente más soluble en agua, alterando sus funciones biológicas e inclusive puede provocar la inactivación de un fármaco. La adición de este grupo funcional sirve además de anclaje para la siguiente fase de metabolización conocida como conjugación. Un oxígeno, nitrógeno o azufre adicionado en la fase anterior sirve como aceptor para generar un enlace con radicales altamente hidrófilos y con relativamente grandes pesos moleculares como glutatión, ácido glucurónico, sulfato, o un grupo acetilo; produciendo un metabolito con una mayor solubilidad en agua y un aumento de su tamaño, lo cual ayudará a facilitar la eliminación del xenobiótico del organismo. Un ejemplo del metabolismo de un fármaco se muestra en la figura 1 [5].

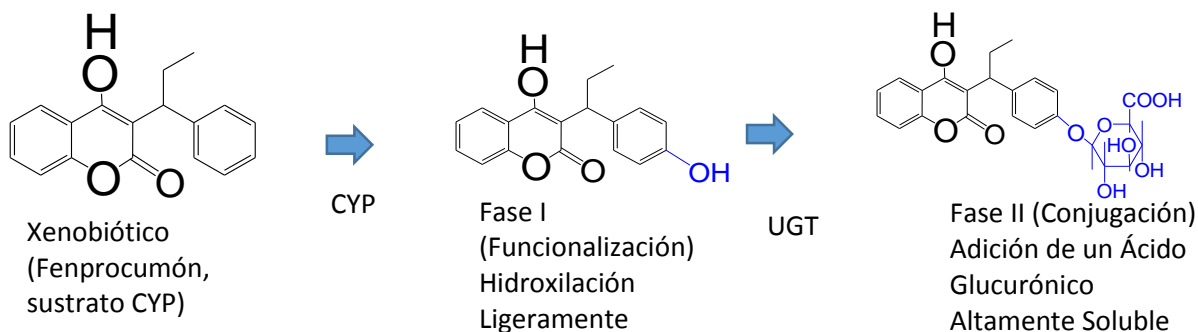


Figura 1. Ejemplo del **metabolismo** de fenpropimol en la fase I por citocromo P450 (CYP) y en la fase II por uridina difosfato-glucuronosiltransferasa (UGT). Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) hidroxila a Fenpropimol haciéndolo ligeramente más soluble, permitiéndole servir de sustrato para UGT. El producto final de ambas fases es una molécula altamente soluble que puede ser eliminada.

1.2 CITOCROMOS P450, ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD

La familia de los citocromos P450 es la principal responsable de la primera fase de metabolización de los xenobióticos [5]. Los CYPs 450 son monooxigenasas que contienen un hemo B como cofactor y a menudo utilizan NADH o NADPH como donador de electrones [6]. El término P450 proviene del pico máximo de absorbancia obtenido por espectrofotometría a la longitud de onda de 450 nm cuando se encuentra en el estado reducido y en complejo con CO [7]; sin embargo, en la mayoría de los casos cuando la enzima se encuentra en reposo, el hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}), en geometría de coordinación molecular octaédrica (O_h) con los cuatro átomos de Nitrógeno del grupo hemo, un grupo tiol proveniente de una cisteína conservada en todos los CYPs como ligando proximal y una molécula de agua como ligando distal y no una molécula de monóxido de carbono. Además de monóxido de carbono y agua, una molécula de oxígeno también puede ocupar el lugar del ligando distal [8].

Los CYPs son capaces de llevar a cabo una variedad de reacciones incluyendo la oxidación aromática y alifática, N- y O-desalquilación, S- y N-oxidación, formación de sulfóxido y de sulfona, desaminación oxidativa, desulfuración y deshalogenación [9, 10, 5]. En los últimos años, el interés en el campo del metabolismo de fármacos mediada por CYPs se centra en los procesos de hidroxilación de grupos alifáticos, así como en grupos arilo [10, 11]. Estas enzimas se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. En el humano, como en la mayoría de los animales, el hígado es considerado el órgano principal encargado del metabolismo de fármacos y otras sustancias químicas. Existe un gran número de diversos CYPs que han evolucionado en los animales

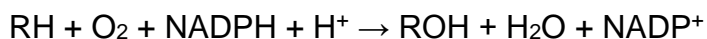
que sólo funcionan para metabolizar sustancias químicas ajenas al organismo [1]. Para el género humano, se han identificado 57 genes y al menos 59 pseudogenes agrupados en 18 familias y 43 sub familias de citocromos P450. Los distintos tipos de citocromos se designan con la abreviatura CYP, seguida de un numeral que indica la familia del gen (CYPs con 40% de similitud en su secuencia de amino ácidos), luego una letra mayúscula que indica la subfamilia (similitud del 55% - 60%) y otro número para el gen individual [12]. Los CYP450 humanos CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A4 son las principales proteínas encargadas de la primera fase de la metabolización de fármacos, contribuyendo con la hidroxilación de más del 90% de los medicamentos actuales en el mercado [13, 14]. Una característica evolutiva conferida a los CYPs es que tienen una baja especificidad por su sustrato, haciendo que más de un tipo de CYP metabolice la misma molécula o que un mismo CYP produzca más de un tipo de metabolito [1]. El metabolismo de los CYPs también se ha estudiado desde una perspectiva computacional a partir de los primeros trabajos cristalográficos de estas enzimas a finales de la década de los ochentas. Para tener un panorama más amplio acerca de los aspectos bioquímicos y mecánicos del metabolismo de los CYPs y una perspectiva desde el punto de vista de los estudios computacionales, se recomiendan las siguientes lecturas adicionales relativas del modelado de CYPs (Tabla 1).

Tabla 1. Listado cronológico de publicaciones sugeridas para favorecer la comprensión de los aspectos bioquímicos y mecánicos de los CYPs.

Año	Título	Referencia
1987	High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam	[15]
1989	Crystal structure of the carbon monoxide-substrate-cytochrome P-450CAM ternary complex	[16]
1999	Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9	[17]
2002	Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking	[18]
2003	Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology	[19]
2004	Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks α -and β -thujone	[20]
2005	Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol	[21]

2007	The Cytochrome P450 Engineering Database: a navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family	[22]
2007	A flexible approach to induced fit docking	[23]
2009	Identification of selectivity determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: a systematic analysis of the substrate recognition site 5	[24]
2009	Mechanism of oxygen activation and hydroxylation by the aromatic amino acid hydroxylases	[25]
2009	Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes	[11]
2010	Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases	[26]
2011	Heme biology: the secret life of heme in regulating diverse biological processes	[27]
2011	RS-Predictor: A new tool for predicting sites of cytochrome P450-mediated metabolism applied to CYP 3A4	[10]
2011	Identification of CYP1A2 ligands by structure-based and ligand-based virtual screening	[28]
2011	Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> and human cells	[29]
2012	Metallocenes as target specific drugs for cancer treatment	[30]
2012	Handbook of porphyrin science	[31]
2012	Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application	[32]
2012	Identification of selectivity determinants in CYP monooxygenases by modelling and systematic analysis of sequence and structure	[33]
2012	Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms	[34]
2014	Inhibitory Potency of 8-Methoxypsoralen on Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) Allelic Variants CYP2A6* 15, CYP2A6* 16, CYP2A6* 21 and CYP2A6* 22: Differential Susceptibility Due to Different Sequence Locations of the Mutations	[35]
2014	Conservation analysis of class-specific positions in cytochrome P450 monooxygenases: functional and structural relevance	[36]

La reacción general de los CYP s 450 es la siguiente [13]:



Un grupo hidroxilo, proveniente de una molécula de Oxígeno e hidrógenos provenientes de una molécula de NADPH, es introducido al ligando con liberación de agua y NADP+. El mecanismo de hidroxilación de grupos alifáticos y aromáticos mediada por los citocromos P450 puede ser visualizada en la figura 2. Según se describe en literatura especializada, es más probable que la hidroxilación de grupos aromáticos pase a través de la conversión de los derivados insaturados a intermediarios epóxidos para después llegar a una estructura hidroxilada más estable [37, 13, 38, 39].

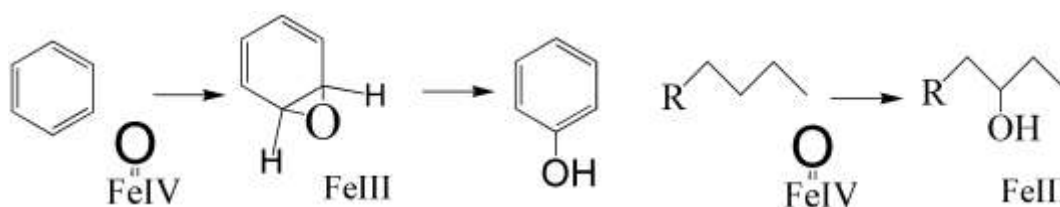


Figura 2. Representación esquemática de la reacción química para la hidroxilación de grupos aril (izquierda) y grupos alifáticos (derecha) presentes en muchos fármacos por iones ligados al grupo hemo que contienen las enzimas CYP450.

Para que la reacción anterior se lleve a cabo, el sustrato RH debe unirse al sitio activo de la proteína cuando se encuentra en su estado relajado, es decir, en su forma férrica (A). Un electrón, proveniente de NADH, es liberado por una reductasa y reduce al hierro a su estado ferroso (Fe^{2+}) (B). De esta manera, una molécula de Oxígeno es capaz de coordinarse con el hierro en un complejo ferroso dioxi y haciendo que éste vuelva a su estado férrico en un complejo superóxido (C). Posteriormente existe una segunda transferencia de electrones de una reductasa, esto genera el anión peróxido férrico que es protonado para dar el complejo hidroperoxo férrico (D). El complejo hidroperoxo férrico es muy inestable, y rápidamente es protonado para ser convertido a un intermediario ferril, Fe^{4+} o Fe^{5+} con una doble coordinación con un átomo de oxígeno, y con liberación de una molécula de agua (E). El siguiente paso es el proceso fundamental de la hidroxilación, el intermediario ferril dona el átomo de oxígeno al ligando; probablemente a través del mecanismo conocido como *rebote de radical* [20], lo que ocasiona que el hierro y la enzima regrese a su estado relajado (F) y se libere el ligando hidroxilado ROH (G) o probablemente epoxidado [11] (Figura 3).

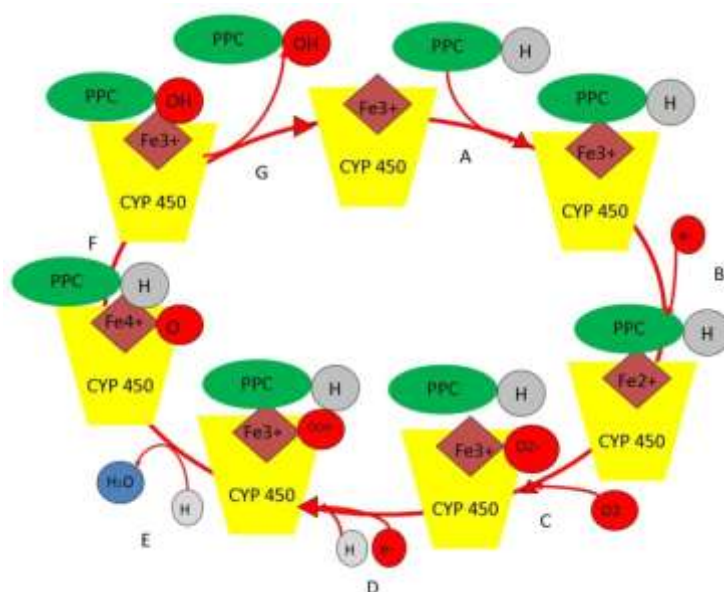


Figura 3. Resumen del ciclo catalítico de citocromos P450. Un ejemplo de citocromo P450 2C9 con el ligando fenprocumón. El grupo hemo se representa como un rombo con el hierro (Fe) en el estado en el que se encuentra durante ese paso del ciclo catalítico. Fenprocumón se representa como una elipse y el círculo continuo con un H en él representa que es el sustrato y con OH como producto hidroxilado. Figura modificada de [11].

El hierro de grupo hemo es connaturalmente electrófilo [40]. Durante la etapa central de la reacción de hidroxilación mediada por los CYPs (paso F, figura 3), un componente electrófilo del oxígeno (ligando distal del Fe) está interactuando con un fragmento de hidrocarburo propio del sustrato para a la postre formar un enlace entre el oxígeno y un átomo de carbono del sustrato [20]. Esta etapa de unión es rápidamente seguida por una etapa transitoria que en ocasiones permite que el oxígeno puede unirse el átomo de carbono adyacente formado un intermediario epóxido. Este reordenamiento de los enlaces de O y C es asistido por el átomo de hidrógeno en presencia del par libre de electrones del átomo de oxígeno que finalmente terminara como la inserción del grupo OH en el átomo de C adyacente al átomo que inicialmente sufrió el ataque electrificico (figura 2) [41, 42].

Los CYPs 450 tienen una estructura muy característica y conservada a lo largo de toda su familia. Son proteínas globulares que constan de 13 α -hélices nombradas de la "A" a la "L" según el orden de la secuencia de aminoácidos del N-terminal al C-terminal (existe un hélice nombrada K' corta pero conservada) y 4 hojas- β nombradas de 1 al 4, según el mismo criterio que el anterior, y están formadas por entre 400-500 aminoácidos de longitud en su secuencia. Las hojas β se encuentran en dos extremos opuestos de la estructura terciaria de la proteína y la α -hélice más grande (α -I) atraviesa su estructura casi por completo en paralelo a las

hojas- β ; los extremos de las estructuras secundarias de α -F, α -G, α -I, β 1-4, β 4-1 y un asa formada entre las hélices B-C forman parte del sitio activo de la enzima; esta última, además forma parte del sitio de entrada del sustrato. El asa B-C es una zona variable en secuencia y en conformación tridimensional, confiriendo a la enzima cierta especificidad al tipo de sustrato que metaboliza; aun así, tiene una composición aminoacídica muy característica, está compuesta en su mayor parte (82%) por residuos alifáticos y fenilalaninas, seguido por aminoácidos polares en un (15%) y una menor proporción de aminoácidos cargados (3%) [26].

Los primeros trabajos de cristalografía sobre los CYPs revelaron la posición del sitio activo de la enzima, así como la conformación de esta última, y de la geometría de coordinación del hierro con sus ligandos. En un trabajo fundamental en 1987, Poulos reveló en dos cristalografías, la geometría correcta de hidroxilación (hemo_Fe – O – sustrato) con un CYP bacteriano y su sustrato (el alcanfor) pre-catálisis y post-catálisis; siendo en este caso un monóxido de carbono el ligando distal (códigos PDB: 1NOO, 3CPP, 4C9N) [15, 16, 43, 44]. Posteriormente en una cristalografía en 2004 de CYP2C9 con el sustrato Flurbiprofeno (FLP), se observó que el sitio de metabolismo del sustrato (SoM, site of metabolism) se coloca a 4.9 Å del hierro del grupo hemo; entre el sustrato y el grupo hemo se encuentra el ligando distal (agua, monóxido de carbono, oxígeno u otra molécula dependiendo del paso de hidroxilación del citocromo) a una distancia del hierro de aproximada 2.5 Å y a distancia de 3 Å aproximadamente respecto al SoM del sustrato [10, 45].

Los CYPs pertenecen a un grupo de proteínas con flexibilidad estructural, como lo son también los receptores nucleares [46, 47]. Los CYPs son capaces de adoptar diferentes conformaciones, tanto en su cadena principal como en sus cadenas laterales, cuando se unen a un sustrato; haciéndoles posible su actividad en un gran número de moléculas de distintos tamaños, en el modelo conocido como ajuste inducido (induce fit) descrito por Koshland en 1958 [33, 48, 49, 50, 51, 52, 53].

El modelo de ajuste inducido o induce fit ha sido propuesto desde mediados del siglo pasado por Koshland; sin embargo, el modelo de Fischer de “llave-cerradura” ha seguido siendo utilizado como el modelo ideal para explicar las reacciones catalíticas de una enzima [54]. No obstante, en años recientes el modelo de Koshland se ha ido popularizando debido a la necesidad de explicar algunos procesos enzimáticos que el modelo de “llave-cerradura” no puede explicar [53] y, en parte gracias también, al auge y accesibilidad de nuevas tecnologías como dinámica molecular (MD, Molecular Dynamics), que permiten simular este modelo en las enzimas [55]. Teniendo consideración del efecto que el modelo de ajuste

inducido puede tener en los CYPs, se ha visto que MD, no es la única herramienta que permite simular este modelo enzimático en técnicas computacionales [23, 56].

Inicialmente, la teoría de ajuste inducido para las enzimas fue propuesta bajo los siguientes términos: “1) Se requiere la orientación precisa de los grupos catalíticos para la acción de la enzima, 2) el sustrato provoca un cambio apreciable en la relación tridimensional de los aminoácidos en el sitio activo y 3) los cambios en la estructura de la proteína causada por el sustrato atraerá los grupos catalíticos en la alineación adecuada, mientras que la forma apoenzimática no lo hará” [53]. De esta forma se cuenta con un criterio para determinar de manera computacional si los CYPs estudiados en ésta tesis se comportan o no bajo el modelo de ajuste inducido.

1.3 CYP2C9, LA ENZIMA DE INTERÉS, SU ROL EN EL METABOLISMO DE FÁRMACOS Y FENPROCUMÓN

CYP2C9 humana es una importante enzima miembro de la familia de los CYPs con un papel fundamental en la oxidación tanto de compuestos xenobióticos como de compuestos endógenos [57, 14, 13, 58]. Se ha estimado que el citocromo 2C9 es responsable del metabolismo de hasta el 15-20% de todos los medicamentos que pasan por la fase I; aproximadamente 100 fármacos terapéuticos son metabolizados por CYP2C9. Este citocromo muestra selectividad por pequeños sustratos aniónico y lipofílicos, como lo son fármacos no esteroides anti-inflamatorios como flurbiprofeno, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco; medicamentos con un margen terapéutico estrecho como warfarina, fenitoína, acenocumarol, tolbutamida, losartan, glipizida; así como el agente hipolipemiente gemfibrozil [58].

1.3.1 Citocromo P450 2C9 (CYP2C9)

En 1995, un primer modelo computacional trató el reconocimiento de CYP2C9 sobre su sustrato. El modelo estableció una visión general sobre las características de unión y las geometrías: (1) un sustrato preferentemente aniónico (2) yace a una distancia de aproximadamente 4 Å (3) de un sitio de unión catiónico postulado, el cual constituye el sitio de hidroxilación, (4) formando un ángulo casi ortogonal entre los sitios aniónico y catiónicos. (5) Se encontró que la distancia entre los sitios aniónicos y el sitio de hidroxilación del sustrato varía entre 7 a 10 Å [59]. Estos hallazgos iniciales sobre el reconocimiento del sustrato de CYP2C9 siguen teniendo valides hoy en día. Después de muchos años de estudios experimentales, las funciones de CYP2C9 dependientes de estructura-actividad fueron resumidas por Zhou y colaboradores en 2009 [60]. Una combinación entre características aniónicos e hidrofóbicas de esta enzima crea preferencias sobre

rasgos específicos de su sustrato [61]. En un estudio en 2009 de mutagénesis sitio dirigidos se identificaron los aminoácidos importantes para la unión con su sustrato, además, fueron inspeccionadas otras estructuras cristalográficas para inferir normas generales de las características relevantes estructurales y funcionales de CYP2C9 [62]. Recientemente en 2013, mediante estudios QSAR se mostró que CYP2C9 tiene selectividad hacia compuestos ligeramente ácidos, con masa molecular relativamente pequeña, gran superficie polar y mayor número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno [63]

CYP2C9 tiene la estructura típica de la familia CYP450. En su caso, el asa B-C abarca los aminoácidos del 96 al 112 son parte también de la entrada hacia el sitio activo de la enzima. El grupo hemo descansa al extremo opuesto de la entrada al sitio activo debajo la hélice I delimitando el extremo inferior del sitio activo. Una treonina altamente conservada en los CYPs, en este caso Thr 301, y el O carboxilo de la Ala 297 pueden crear un puente de hidrogeno con el ligando distal coordinado del hierro (previamente descrita la geometría de coordinación metálica). La Alanina 297, además de interactuar con el ligando distal, posteriormente interactúa con el grupo hidroxilo agregado al sustrato [45].

En diversos estudios, se ha visto que el gen que codifica para la enzima CYP2C9 tiene gran diversidad polimórfica por la sustitución de uno o dos aminoácidos [64]. Estas variaciones pueden provocar cambios en la actividad metabólica de este CYP, haciendo que su papel en la patogénesis causada por reacciones adversas a los medicamentos sea muy importante. Se ha visto que las variantes de este CYP están involucradas en reacción adversas de medicamentos con un margen terapéutico estrecho como S-warfarina y fenprocumón [65]. Los pacientes de raza caucásica presentan mayor incidencia en intoxicación relacionada con el bajo metabolismo de estos medicamentos, esto es debido a que manifiestan alguna de dos variantes de CYP2C9 con baja actividad metabólica (R144C, I359L) [66]. Es de destacar, que la sustitución de aminoácidos de estas dos variantes no se encuentran en zonas relacionadas con el reconocimiento de su sustrato ni de su actividad, si no con zonas estructurales de la enzima; y que en el caso de la variante I359L, el aminoácido sustituido mantiene las mismas propiedades químicas.

Durante el desarrollo de este estudio, existían tres archivos PDB producto de dos trabajos en el banco de datos de proteínas [67]. 1OG2 y 1OG5 son dos estructuras de CYP2C9 en su forma apoenzimática y en complejo con S-warfarina respectivamente [68]; sin embargo, estas estructuras presentan siete mutaciones en aminoácidos presentes en una región estructural y funcionalmente importante de la proteína, en el área que corresponde a las α -G y α -F. Es probable, que estas sustituciones hayan influido a que esta proteína quimérica presente dos α -hélice

cortas denominadas α -G' y α -F' en esta zona de la proteína haciendo que su sustrato, S-warfarina, no esté colocada en conformación de hidroxilación. Se debe resaltar que hasta ese momento, el complejo de 1OG5, era la única estructura de CYPs humanos que no presentaba a su ligando en conformación metabólicamente activa alejada del sitio catalítico de la enzima. Por otro lado, el archivo con código PDB 1R9O [45], contiene al CYP2C9 en complejo con flurbiprofeno (FLP). La proteína de este complejo presenta solo una sustitución en su secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal (I490V), es muy poco probable que esta sustitución modifique su actividad o estructura, ya que se encuentra en la zona terminal en un asa de estructura variable; FLP, su sustrato, se encuentra en conformación idónea para su metabolismo; y además, presenta una molécula de agua en geometría de coordinación correcta como ligando distal. Sin embargo, la zona controvertida de la estructura de esta proteína (la zona entre las α -hélices F y G) no fue correctamente resuelta en este archivo. Más recientemente, la estructura cristalográfica con código PDB 4NZ2 fue depositada en el banco de datos [69]; consta del complejo de CYP2C9 con un inhibidor, y al igual que 1OG5 presenta mutaciones similares en la zona de las α -hélices F y G, y su ligando, en este caso el inhibidor, está lejos del grupo hemo.

Existe clara evidencia de que CYP2C9 es capaz de metabolizar al anticoagulante oral Fenprocumón; fármaco empleado en el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con trombosis y es miembro de la familia de anticoagulantes orales derivados de la cumarina [17, 21].

1.3.2 Estructura, actividad y metabolismo del sustrato de estudio: Fenprocumón

Fenprocumón (PPC) esta estructural y farmacológicamente relacionado con warfarina (WFN) y acenocumarol. Pertenecen a la familia de fármacos anticoagulantes orales de 4-hidroxicumarina. Las características químicas esenciales de los derivados de cumarina para la actividad anticoagulante son un cuerpo 4-hidroxicumarina intacto con un sustituyente (radical) de en la posición del carbono 3 (C-3) [21]. Existen reportes en la literatura de que las formas biológicamente activas, de los tres anticoagulantes cumarínicos antes mencionados, están casi completamente ionizadas a pH=7.4; poseen carga negativa localizada en el oxígeno unido al carbono 4 (C-4) [70] (Figura 4). La hidroxilación en C-4 crea también enlaces en resonancia entre el oxígeno unido a C-2 y el oxígeno unido a C-4.

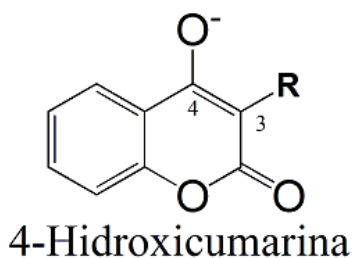


Figura 4. Estructura del cuerpo cumarínico. Se muestra la estructura general que contienen todos los anticoagulantes orales derivados de la cumarina numerado en los carbonos 4, donde se encuentra la hidroxilación generalmente en forma mono-aniónica, y 3 donde se ancla el radical que diferencia a los anticoagulantes entre sí. Se muestra el cuerpo cumarínico en su forma predominante a pH fisiológico [70].

Los derivados cumarínicos inhiben la carboxilación de glutamato dependiente de vitamina K para formar un derivado de ácido amino postraduccionales inusual que se necesita en muchos de los factores de la coagulación de sangre para modular la unión a calcio. Su función consiste en disminuir la síntesis de los factores de coagulación II, VII, IX y X dependientes de vitamina K mediante la inducción de una deficiencia funcional en la reducción de vitamina K. Por lo general, vitamina K es oxidada a su forma epoxi-vitamina K (KO) en el proceso de carboxilación. La carboxilación normal de los factores de coagulación II, VII, IX y X requiere que la KO sea reducida. La reducción a la forma regenerada de vitamina K a partir de KO es mediada por la enzima epóxido reductasa de vitamina K (VKOR, vitamin K epoxide reductase) [71]. La figura 1 de [72] ejemplifica el ciclo de la vitamina K. El blanco molecular de las 4-hidroxicumarinas es precisamente esta epóxido reductasa (Figura 5) [73, 74]. Los anticoagulantes cumarínicos bloquean esta enzima y previenen la regeneración de la vitamina K reducida. La no-carboxilación de los residuos de ácido glutámico en los extremos amino-terminales de los factores II, VII, IX y X, impide la unión a calcio y por lo tanto a los fosfolípidos en los trombocitos en sangre y células endoteliales en el sitio de la lesión. El defecto de la unión a calcio resulta en la incapacidad de participar de estos factores en la cascada de coagulación. Debido a que no tienen ningún efecto en los factores de coagulación totalmente carboxilados ya en circulación, los anticoagulantes cumarínicos no producen un efecto anticoagulante inmediato. La velocidad de eliminación de los factores previamente carboxilados y la vida media del anticoagulante derivado de cumarina determina el tiempo de inicio del efecto anticoagulante [75]. Interesantemente, se ha observado que no es necesario un cofactor que ayude a la transferencia de electrones como un grupo protético hemo para llevar a cabo la función de las epóxido-reductasas [76]. Este último puede ser reemplazado, imitando al grupo hemo, bajo condiciones *in-vitro* en la síntesis

orgánica por iones de metales pesados como el hierro (3+), lo cual fue encontrado útil para la catálisis de epóxidos [77, 78].

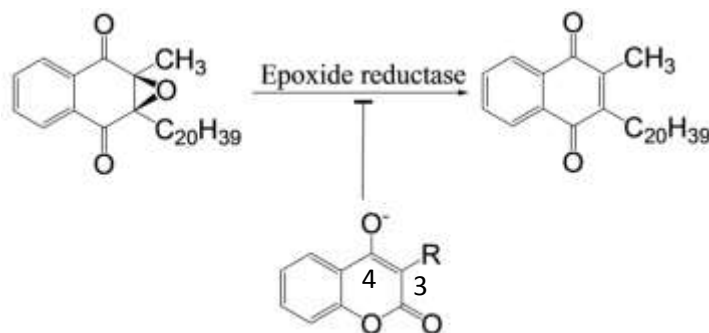


Figura 5. Reciclaje enzimático de la forma funcional de la vitamina K de su forma oxidada. La vitamina K epoxidada (KO) en presencia de la epóxido reductasa de vitamina K (VKOR) y la inhibición de la reacción por derivados de 4-hidroxycumarina, como fenprocumón o warfarina.

Fenprocumón y warfarina, son los dos derivados de cumarina más usados a nivel mundial [75], son compuestos sintéticos con un único centro quiral en el de carbono 9 (C-9). La única diferencia estructural entre PPC y WFN es la decoración en la cadena lateral del radical C-3 de la 4-hidroxycumarina. PPC posee una cadena lateral corta de etilo unida al átomo C-9 mientras que WFN posee una cadena lateral de acetnil unida al C-9 quiral en lugar de etilo (Figura 6). Ambos son utilizados comercialmente como racematos; sin embargo, el enantiómero S ha sido reportado ser el más potente con respecto a la actividad anticoagulante para ambos anticoagulantes orales, mientras que para acenocumarol el R-enantiómero parece ser varias veces más potente [73, 21].

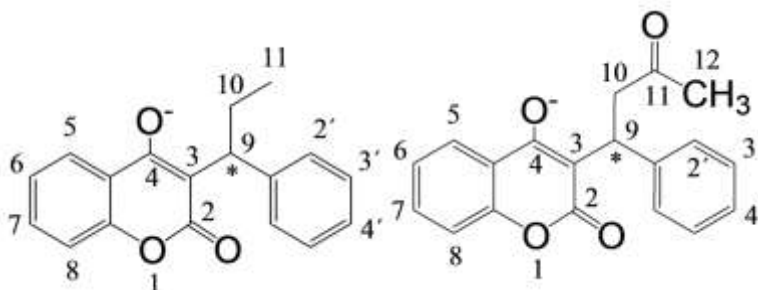


Figura 6. Estructuras quirales y numeración de los átomos de los dos correspondientes 4-hidroxycumarinas: fenprocumón (PPC, de la mano izquierda) y la warfarina (WFN, mano derecha). El asterisco marca el átomo de C9 asimétrico. Ambos compuestos se muestran en su forma tautomérica preferida y se disocian (> 90%) a monoaniones en agua debido a su (ácido carboxílico vinílico con un pKa de aproximadamente 5 a 6) [70].

Ya sea debido a su mejor afinidad con la proteína blanco del mecanismo coagulación (VKOR), por su mejor disponibilidad, distribución o menor tasa de metabolismo y eliminación o inclusive todo estos factores adicionados, podría hacer que la actividad de uno de los enantiómeros de estos fármacos sean más fuerte respecto a la de su otra forma enantiomérica. A pesar de la similitud química global de los derivados de 4-hidroxycumarina, la ruta metabólica de estos compuestos diverge a través de las enzimas que los metabolizan y los sitios en su estructura donde son metabolizados [79, 17], un ejemplo de esto se puede apreciar en la tabla 2 donde se marcan las diferencias en el metabolismo de PPC y WFN.

Tabla 2. Listado de los sitios de hidroxilación conocidos para PPC y WFN.

Sitios de Metabolismo	Referencia	Comentario
PPC en C6	[17, 80]	Cantidad insignificante para ambas formas enantioméricas
PPC en C7	[17, 80]	Metabolito principal de S-PPC y cantidad insignificante de R-PPC
PPC en C4'	[17, 80]	Metabolito principal de S-PPC y cantidad insignificante de R-PPC
PPC en 8	[17]	Solo observado en 1999
PPC en C2'	[81]	Nuevo metabolito descubierto en 2005
R-WFN en C4'	[82]	Por CYP2C9 en cantidad insignificante
R-WFN en C6	[83]	Por CYP1A1 y CYP 1A2
R-WFN en C8	[83, 84]	Por CYP1A1, CYP1A2 y la enzima principal CYP2C19
R-WFN en C10	[84]	Por CYP3A4
S-WFN en C6	[17, 85]	Por CYP2C9 en cantidad insignificante
S-WFN en C7	[17, 82]	Por CYP2C9, metabolito principal

Fenprocumón posee cuatro formas enantiomérica, además de las formas R o S, el oxígeno unido a C-2 puede presentar la hidroxilación en lugar del oxígeno unido a C-4 en ambos R- o S-enantiómero [17, 70]. Se ha observado que de las cuatro formas enantiomérica de fenprocumón (en contraste con la warfarina y acenocumarol donde su forma R con la hidroxilación en C-4 (R-OH-C4) es la más

estable) la especie S-OH-C4 PPC es la más estable [70]. Los tres derivados cumarínicos PPC, WFN y acenocumarol se metabolizan en el hígado por la enzima CYP2C9; no obstante, la contribución relativa de CYP2C9 con su metabolismo difiere entre los tres anticoagulantes como consecuencia de las diferencias en su estructura [80]. En la literatura, se puede encontrar tres principios fundamentales relativos a la relación estructura-actividad del metabolismo de PPC y WFN mediada por CYP2C9: 1) Los cambios en el comportamiento tautomérico de PPC y WFN reflejan diferencias metabólicas mediadas por CYP2C9 entre estos fármacos. WFN muestra mayor cantidad formas tautoméricas que PPC debido a su grupo acetnil. Esto podría provocar diferencias en el reconocimiento del sustrato por la forma en que los distintos tautómeros se unen e interactúan con los residuos de CYP2C9. Derivados metoxilo de PPC fueron sintetizados para detener su tautomerización y también fueron reconocidos como sustratos de hidroxilación por CYP2C9, dando en algunos casos mejores rendimiento de producción [17, 70, 86]. 2) Las ligeras diferencias la cadena lateral de C-9 entre PPC y WFN pueden explicar las diferencias en la ruta metabólica entre ambos fármacos una vez unida al sitio catalítico de CYP2C9. Debido a la cadena lateral más grande y ramificada unida a C-9, WFN no puede acceder a la estrecha hendidura en el lado distal del grupo hemo. La deformación del sitio de catalítico de CYP2C9 en diferentes conformaciones de hidroxilación del ligando fue estudiada mediante dinámica molecular y se comparó con estructuras cristalinas [49]. Este modelo implica la existencia de un mecanismo de ajuste inducido para la actividad metabólica de esta enzima. 3) Los fármacos con diferente tamaño y forma pueden ser metabolizados por la misma CYP, por ejemplo, CYP3A4 humano, que es capaz de metabolizar una gran diversidad de sustrato, y CYP2C5 de conejo en el trabajo de [87]. En este último ejemplo, el ajuste inducido consiste en el reordenamiento de las cadenas principales y laterales observado en las estructuras cristalográficas con código PDB 1NR6, 1N6B y 1DT6 que contienen a las formas apoenzimática y en complejo enzima-sustrato [87, 48].

1.3.3 CYP2C9 y su rol en el metabolismo de los anticoagulantes cumarínicos

Previamente se ha demostrado que CYP2C9 es la mayor responsable de la primera fase de metabolización de los anticoagulantes cumarínicos S-warfarina (SWF), R- S-fenprocumón (R- S-PPC) y R- S-acenocumarol; siendo SWF el sustrato con los mejores rendimientos de hidroxilación mediada por esta enzima, seguido por ambos enantiómero de Acenocumarol, luego la forma S-PPC y por último, con rendimientos de producción muy bajos en comparación con los demás derivados cumarínicos, R-PPC; esta característica, puede hacer que PPC sea considerado también como un inhibidor de CYP2C9 [17, 21, 75]. Obtener un amplio panorama acerca de las rutas metabólicas que siguen estos fármacos sirve

como referencia para explorar con mayor precisión la actividad de CYP2C9 sobre PPC; por tal motivo, se busca conocer todo lo relativo de la primera fase de metabolización tanto de WFN como de PPC y de los CYPs que median este proceso. Comparar la metabolización de un anticoagulante oral con gran similitud estructural y funcional, y que además ha sido ampliamente estudiado como lo es WFN, ofrece una perspectiva más clara acerca del metabolismo de PPC cuyo metabolismo ha sido menos estudiado. En 1997 se dieron a conocer las rutas metabólicas estereo-específicas para los enantiómeros R y S-WFN, en ellas, se observó la participación de diversas isoenzimas. CYP2C9 metaboliza principalmente a la forma enantiomérica más potente S-WFN en C-7 [21], mientras que R-warfarina no puede ser hidroxilada por esta enzima, este enantiómero (R) es metabolizado por otros CYPs, principalmente por CYP3A4 en C-10 (Figura 7) [10, 79]. Curiosamente, CYP2C19 es la principal enzima para la hidroxilación en C-8 de WFN con buena afinidad ($K_m = 0,3 \text{ mM}$) [84] si se compara con los valores más altos de K_m que 1A2 y 1A1 tienen sobre la hidroxilación en C-7 (1.4 mM y 1.2 mM respectivamente) [83].

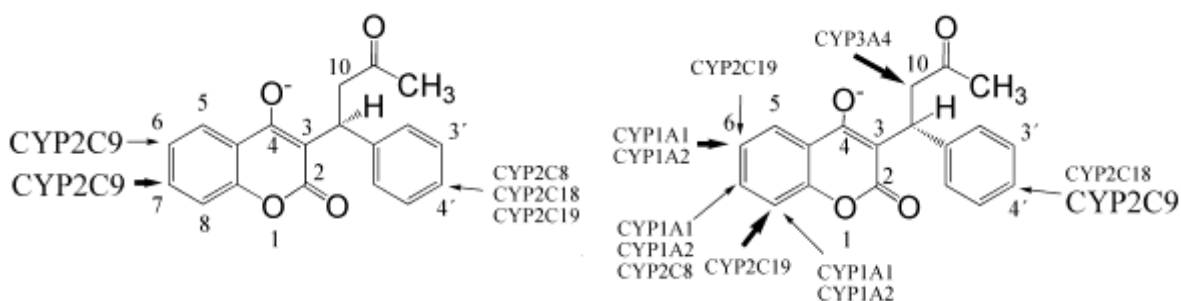


Figura 7. Localización (flechas) de los sitios de metabolización (SoMs) experimentales conocidos de hidroxilación por los CYPs que metabolizan a cada enantiómero de WFN (S-, izquierda; R- derecha). Las flechas indican la enzima citocromo P450 encargada de la metabolización en ese sitio. Las flechas gruesas simbolizan tasas más altas de metabolización [17, 80]. La herramienta farmacocinética ADMET predictor evaluó los siguientes sitios de hidroxilación WFN: 6, 7, 8 y 4' por CYP2C9; 6,7 y 4' por el CYP3A4. La posición 8 está predicha sólo para CYP2C9, en contraste con los datos experimentales existentes en el que CYP2C19, CYP1A1 y CYP1A2 participan. Basado en la figura 1 de [79].

De hecho, la selectividad de CYP2C9 hacia PPC es similar a la de WFN [79]. CYP2C9 es también la principal encargada del metabolismo de fenprocumón; siendo C7 y C4' los metabolitos con mejores rendimientos para el enantiómero S-PPC, y sin una preferencia evidente de algún metabolito para el enantiómero R-PPC [17, 80]. Fenprocumón también puede ser metabolizado por CYP3A4, CYP2C19 y CYP 2C8, con menores rendimientos de producción [80], pero es CYP2C9 la principal responsable de la hidroxilación de PPC en el tejido hepático, esto comprobado mediante estudios de anticuerpos monoclonales [80, 88]. Interesantemente, se ha observado clínicamente que la forma R-PPC tiene menor potencia de coagulación que su forma S-PPC, y es al mismo tiempo, el enantiómero más difícil de metabolizar por parte la enzimas hepáticas [17, 75].

CYP 3A4 es la segunda enzima hepática en importancia en colaborar con la tasa de hidroxilación PPC. La Velocidad máxima de reacción (V_{max}) de CYP3A4 sobre PPC es considerablemente más elevada que cualquiera de las otras enzimas que metabolizan este fármaco; mientras que su K_m es también considerablemente más alta que la de CYP2C9. CYP2C8 solo es capaz de metabolizar al enantiómero S-PPC en el carbono cuatro prima (C-4') con un significativo rendimiento de producción [80].

En varios estudios *in-vitro* se ha observado que existen tres SoMs principales para PPC [80, 17, 81]. Ufer y colaboradores en 2004 revelaron por medio de experimentos de cinética enzimática, que la tasa de producción de 7-hidroxi-femprocumon (7-OH-PPC) es extremadamente alta en comparación con los demás metabolitos de PPC, especialmente para la forma S-PPC; por tal motivo, se considera que S-7-OH-PPC es claramente el metabolito principal de PPC mediada por la enzima CYP2C9 [80, 89]. Los otros dos metabolitos principales son 4'-hidroxi-femprocumon (4'-OH-PPC) y 6-hidroxi-femprocumon (6-OH-PPC) en orden decreciente de producción [80]. En uno de los primeros trabajos del metabolismo de PPC mediado por CYP2C9, Trager encontró además al metabolito 8-hidroxi-femprocumon (8-OH-PPC) [17]. Por otra parte, en 2005, Kammerer et al demostró mediante un ensayo de espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC/LC-MS/MS), que el enantiómero R-PPC tiene preponderancia en sangre de pacientes horas después de la administración de una dosis única oral de este fármaco [81]. La mayor cantidad presente del enantiómero R-PPC, confirma que el enantiómero S-PPC es más fácilmente metabolizado. Kammerer en 2005 [81] y Ufer en 2004 [80] no encontraron al metabolito 8-OH-PPC encontrado por Trager en 1989 [17]; sin embargo, en este último estudio realizado *in-vitro* e *in-vivo* ha mostrado que este metabolito se produce en muy baja cantidad. Kammerer, además de los tres principales metabolitos de PPC (7-OH-PPC, 6-OH-PPC y 4'-OH-PPC), encontró dos nuevos metabolitos para este fármaco (figura 8). El primer metabolito fue identificado mediante su comparación con su espectrometría de masas como 2'-hidroxi-fenprocumón (2'-OH-PPC) y se presentaba en gran cantidad en la sangre de los pacientes para la forma S-PPC. El segundo metabolito nuevo se encontró en relativa baja cantidad en sangre y no pudo ser identificado. Por comparación con su espectro de masa, se descartó que este segundo metabolito se tratara de 3'-hidroxi-fenprocumón, 8-hidroxi-fenprocumón o 11-hidroxi-fenprocumón, dejando abierta la posibilidad de que sea algún derivado hidroxilado en su cadena lateral (10-hidroxi-fenprocumón o 9-hidroxi-fenprocumón) [81]. Hasta la fecha, ningún otro metabolito ha sido detectado para la primera fase de metabolización de PPC mediada por CYP2C9 [80].

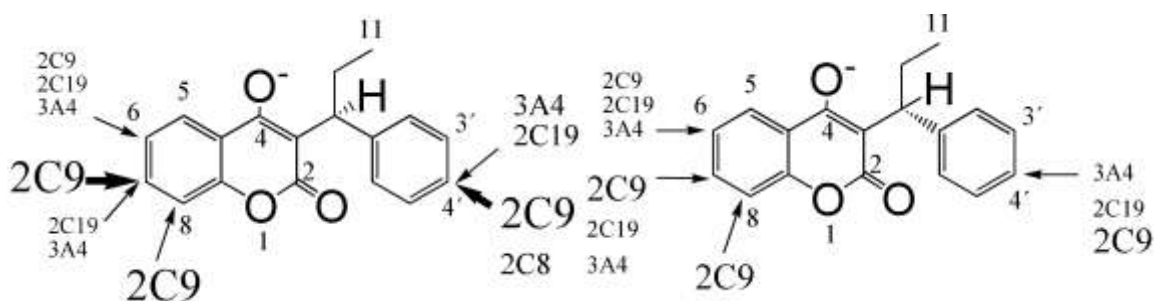


Figura 8. Localización (flechas) de los sitios de metabolización (SoMs) experimentales conocidos de hidroxilación por los CYPs que metabolizan a cada enantiómero de PPC (S-, izquierda; R- derecha). Las flechas indican la enzima citocromo P450 encargada de la metabolización en ese sitio. Las flechas gruesas simbolizan tasas más altas de metabolización [80, 17]. La herramienta farmacocinética ADMET predictor evaluó los siguientes sitios de hidroxilación PPC: 6, 7, 8 y 4' por CYP2C9; 6, 7, 10 y 4' por el CYP3A4. Sólo la posición 10 se prevé en contraste con la literatura existente.

El descubrimiento de estos nuevos metabolitos de PPC mediados por CYP2C9 es parte de la motivación para el estudio de los patrones de hidroxilación de PPC a través de CYP2C9 mediante técnicas computacionales. Por tal motivo, y habiendo recolectado toda la información posible del metabolismo de PPC en la literatura. El reto es predecir correctamente mediante técnicas computacionales los patrones de metabolización de PPC a través de la enzima CYP2C9 e identificar el nuevo SoM reportado por Kammerer. En este contexto, el presente estudio es de tipo complementario a los datos experimentales y busca una respuesta teórica a los patrones de hidroxilación reportados experimentalmente. Para este fin, la técnica de Acoplamiento molecular (“Docking”) puede ser empleada para la identificación de los CYPs que pueden llevar a cabo la primera fase de metabolización de los enantiómero de PPC, así como los posibles SoM [80, 34, 23].

1.4 MODELADO Y CÁLCULO DE ENERGÍAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA

Las interacciones moleculares existentes entre una proteína y otra molécula de tamaño pequeño, a la que se le denomina ligando, constituye un amplio campo de investigación para la bioquímica debido a la importancia biológica que tienen los complejos proteína-ligando. Ya sea en su participación en la comunicación celular (receptor-mensajero), en la auto-organización o en las rutas metabólicas (enzima-sustrato), estos complejos son indispensables para mantener la homeostasis celular. Hoy en día, los estudios *in-silico* han resultado una herramienta indispensable para el estudio de estas interacciones con el empleo de técnicas computacionales de Dinámica y/o Mecánica Molecular, como acoplamiento molecular (Docking). El acoplamiento molecular está basado en el uso de algún campo de fuerza (FF, force field) y puede ser utilizado de distintas maneras para predecir la correcta forma de unión de un ligando, identificar un nuevo ligando de

cierta proteína o predecir las afinidades de unión de los complejos mediante el cálculo de energías de interacción y energía libre de Gibbs (ΔG) [90]. De estas tres características, la última puede ser la más importante para poder predecir las preferencias que un CYP tiene sobre su metabolito. Una vez se obtengan las configuraciones del complejo, los programas de acoplamiento molecular deben ser capaces de calificar o puntuar los resultados (Docking score) para poder identificar la estructura más probable [91].

Las diferencias entre las especies en la capacidad de metabolizar xenobióticos provienen de las características específicas de la dieta de cada especie, y hace que los modelos animales no puedan ser completamente confiables para la predicción de la metabolización de cierto fármaco en los seres humanos. El tiempo y costo económico son otro obstáculo importante para la determinación de los metabolitos de fármacos. Por esta razón, se ha recurrido a estudios *in-silico* como una herramienta complementaria, para poder predecir los metabolitos de distintas sustancias en el humano [10, 92, 93, 94, 95, 96]. Sin embargo, hasta la fecha, pocas publicaciones pueden estar relacionados con métodos *in-silico* de modelado de las vías metabólicas de CYP2C9 (Tabla 3).

Tabla 3. Listado cronológico de publicaciones de modelización sobre CYP2C9 (última visita 08/14/2014).

Año	Título	Referencia
1995	The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling	[59]
1999	Homology modeling and substrate binding study of human CYP2C9 enzyme	[97]
2003	Investigation of enzyme selectivity in the human CYP2C subfamily: homology modelling of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 from the CYP2C5 crystallographic template	[98]
2004	Computational Modelling of Structures and Ligands of CYP2C9	[99]
2006	Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin	[49]
2008	Computer Modeling of Dapsone-mediated Heteroactivation of Flurbiprofen Metabolism by CYP2C9	[100]
2009	Investigation of the CYP2C9 induction profile in human hepatocytes by combining experimental and modelling approaches	[101]
2009	In silico toxicology in drug discovery-concepts based on three-dimensional	[102]

models.

2009	Interactive modeling for ongoing utility of pharmacogenetic diagnostic testing: application for warfarin therapy	[103]
2010	Probing small-molecule binding to cytochrome P450 2D6 and 2C9: An in silico protocol for generating toxicity alerts	[104]
2011	Molecular modeling used to evaluate CYP2C9-dependent metabolism: homology modeling, molecular dynamics and docking simulations	[95]
2012	Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3, 4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazine	[105]
2014	Structural and energetic analysis to provide insight residues of CYP2C9, 2C11 and 2E1 involved in valproic acid dehydrogenation selectivity	[96]
2014	Cytochrome P450 site of metabolism prediction from 2D topological fingerprints using GPU accelerated probabilistic classifiers	[106]

En este estudio se emplearan herramientas computacionales apoyadas en distintos campos de fuerza para conocer el porqué de la preferencia de la enzima CYP2C9 sobre cada uno de los metabolitos, comparando su energía de interacción ligando-proteína con las cantidades y rendimientos reportados en la literatura para los metabolitos de PPC.

1.4.1 Campos de fuerza en el modelado molecular

Los campos de fuerza son funciones matemáticas utilizadas para calcular la energía potencial de un sistema de partículas. El empleo de los campos de fuerza es un componente clave que subyace en muchas investigaciones que emplean técnicas computacionales. El uso de parámetros empíricos les permite (en los casos favorables) modelar los cambios conformacionales y energías de interacción covalentes y no covalentes [107]. Se dice que un campo de fuerza es exitoso cuando es capaz de simular con precisión las características y energías de unión inter e intramoleculares de los sistemas naturales que modela. La descomposición específica de los términos aditivos que integran un campo de fuerza depende, en sí mismo, específicamente del campo de fuerza. De manera general, la energía total de un sistema simulado puede ser escrito como $E_{total} = E_{covalente} + E_{no\ covalente}$. Casi siempre los energías que se toman en cuenta para el cálculo de las energías covalentes son las dadas por la distancia de enlace, el ángulo de enlace y la torsión de enlace; estas energías pueden ser calculadas

aplicando la ley de Hooke. Por otra parte, el cálculo de las energías de interacción no covalentes contempla distintos tipos de interacción atómica y aplica distintas ecuaciones para su cálculo; así tenemos: las interacciones electrostáticas que pueden ser calculadas a través de la ley de Coulomb, las energías de van der Waals calculadas a través del potencial de Lennard-Jones, las interacciones de puentes de hidrogeno y en algunos casos las interacciones metálicas [108].

Los campos de fuerza también definen un conjunto de parámetros para cada tipo de átomo y tipo de enlace. Estos parámetros son calculados empíricamente de distintas formas, y depende específicamente del tipo de calculo que fue empleado para obtener dicho dato [109]. La parametrización juega un papel crucial en la mecánica molecular. Un buen conjunto de parámetros debe reproducir los datos experimentales no sólo para las moléculas en el grupo de prueba, sino también para las moléculas fuera del conjunto de prueba. Por otra parte, el conjunto de parámetros debe ser completo y autoconsistente [107]. Los parámetros que un campo de fuerza contemplan son el tipo de átomo, su carga y los parámetros de enlace que este tipo de átomo pueda tener con los distintos tipos de átomos de un campo de fuerza [108].

1.4.2 Acoplamiento molecular y puntuación de sus resultados

Para calcular las interacciones moleculares específicas entre ligando y proteína, los métodos pueden dividirse en dos pasos. Uno es el acoplamiento molecular, que es la predicción de una conformación y orientación del ligando dentro del sitio de unión, y el otro es la puntuación, que se refiere a la evaluación de la calidad de las conformaciones acopladas [90].

Docking es la herramienta computacional empleada para predecir e identificar los sitios de unión, las geometrías relativas entre dos moléculas y las conformaciones del complejo proteína-ligando [110, 111]; es decir, permite encontrar la orientación (modo de unión) y posición (sitio de unión) de una molécula pequeña de interés (fármaco, sustrato, mensajero, etc.) en el sitio activo de una proteína (receptor, enzima, etc.). Esta técnica basada en campos de fuerza, el efecto estérico y algoritmos de búsqueda, ayuda a identificar los átomos de los aminoácidos de la proteína que interactúan con los átomos y grupos de los ligandos [112]. Docking implica la generación de un conjunto de conformeros 3D de un complejo de partida [113] para posteriormente ser puntuados según sus energías de interacción y encontrar la conformación más probable [114].

La puntuación o calificación deben de cumplir con varias funciones, diferenciar entre diversas posiciones de un único ligando en el sitio de unión al receptor, dar una estimación aproximada de las afinidades de unión para los diferentes

complejos de proteína-ligando y poder clasificar distintas posiciones como una sola para discernir con facilidad la conformación real [90, 115].

Desde finales de los ochenta los programas de Docking se han ido desarrollando hasta contar en la actualidad con más de 50 programas [116]. La mayoría de estos programas emplean una estructura rígida o casi rígida de la proteína con una estructura flexible del ligando. Flexibilidad del receptor sigue siendo uno de los principales retos de esta herramienta [91].

1.4.3 Efecto de las interacciones metálicas en el modelado con mecánica molecular y acoplamiento molecular

En los sistemas biológicos los metales llevan a cabo varios tipos de funciones, entre lo que se encuentran, balance de carga, señalización, transferencias de grupos, átomos o electrones, catálisis redox, entre otras [117]. Por tal motivo desde la década de los ochentas, se ha desarrollado la necesidad de poder simular las características de los metales en los sistemas biológicos.

Los átomos metálicos pueden considerarse átomos no convencionales debido a que tienen parámetros de enlace muy característicos, el tipo de enlace metal-ligando no podría considerarse únicamente como enlace de tipo covalente o como enlace iónico, si no como una combinación entre ambos; el enlace metálico es significativamente reversible [118]. Otras característica de los metales que no pueden ser simulados mediante las funciones que contemplan campos de fuerza parametrizados para los bioelementos presentes comúnmente en las biomoléculas (C, H, O, N, S, P), son efectos específicos como la transferencia de carga o cambios en el tipo de coordinación de enlace [119]. Por tal motivo, es indispensable contar con campo de fuerza que considere las características específicas de los metales como, su simetría, geometría de coordinación, direccionalidad, dinámica de interacción metal-ligando, transferencia de carga, preferencias de ligandos, entre otras, para poder contar con la precisión del cálculo de las energías de interacción del enlace entre CYP2C9, el Fe del grupo hemo y el ligando distal, ya sea agua o el metabolito de PPC.

1.4.4 El problemáticas en estudios de modelado con mecánica molecular y acoplamiento molecular

Existen varios obstáculos en el estudio de las interacciones proteína-ligando tales como el tiempo de cálculo y, en especial, las limitaciones en la exactitud del cálculo mediante el empleo de campos de fuerza creando un problema directo con enfoque fisicoquímica. Estas consideraciones han llevado al desarrollo de métodos aproximados, que mientras todavía se basa en los principios de la fisicoquímica, hacen uso de modelos optimizados empíricamente (funciones de

puntuación) y determinación de las estructuras a través de algoritmos de búsqueda conformacionales especialmente diseñados (Los algoritmos de acoplamiento como Montecarlo) [90].

En especial el modelado de la interacción proteína-ligando de un CYP con su sustrato para predecir la regio-selectividad de producción de sus metabolitos puede llegar a ser una tarea ardua, difícil y laboriosa ya que pertenecen a un grupo de proteínas con flexibilidad en su estructura, como los receptores nucleares [46, 47]. Para superar las dificultades relativas a la flexibilidad de proteína se reportaron tres enfoques: 1) acoplamiento suave o “*soft-docking*”, es la reducción deliberada de fuerzas de repulsión; 2) la gestión de rotaciones de cadenas laterales, emplea bibliotecas de rotámeros; o 3) el uso de varias estructuras con diferentes conformaciones de la misma proteína o isoformas relacionadas; ésta última es la técnica que se empleará para solventar las dificultades que plantea el modelo de ajuste inducido en este estudio [23]. Alternativamente, se han propuesto técnicas que involucran una combinación de simulaciones de dinámica molecular (MD) y ajuste molecular con mecánica molecular, para solventar este problema [56]. Es de destacar, que los cálculos de ΔG con MD son complicados y costosos en tiempo computacional [120, 121, 122], lo que hace de combinar estas dos herramientas una buena alternativa para la solución del problema del ajuste inducido.

Para la predicción de la regio-especificidad de una enzima sobre su sustrato empleando técnicas de acoplamiento molecular, el estándar actual dicta que en el resultado de las distintas conformaciones del ligando en el sitio activo, se deben encontrar los sitios observados experimentalmente de metabolismo (SoMs) entre la primer o segunda categoría según su calificación (Docking score) [10, 106]. Sin embargo, existen algunas limitaciones conocidas de los métodos de cálculo establecidos [10]. En un extraordinario trabajo publicado en 2012, se detalla en síntesis el enfoque de abordar el metabolismo de xenobióticos con el uso de las herramientas computacionales existentes, sus conceptos básicos (algoritmos) y sus limitaciones; este trabajo explica los principales preceptos y retos de predecir SoMs por los CYPs a un nivel molecular, la elucidación de potenciales metabolitos y la predicción de los efectos directos e indirectos que los xenobióticos puedan tener sobre los CYPs [34].

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS

Es importante conocer los mecanismos de hidroxilación de las enzimas hepáticas sobre xenobióticos, incluidos fármacos, ya que de esta manera se puede ayudar a predecir aspectos de farmacocinética, farmacodinamia y los efectos que los xenobióticos pueden producir en los organismos vivos.

Para el desarrollo de un fármaco es indispensable que sea eficiente y no sea tóxico para los pacientes. Ambos aspectos dependen de la metabolización del fármaco. Las pruebas realizadas a los candidatos a fármacos se realizan en roedores; sin embargo, como se ha mencionado antes, la evolución de los citocromos es diferente en cada especie dependiendo de la dieta del organismo, y los estudios en roedores pueden no ser precisos para ser aplicados a humanos. Los estudios *in-silico* brindan una buena opción para el estudio de la actividad enzimática de los Citocromos P450 sobre distintos xenobióticos apoyando a los resultados de estudios experimentales. El presente estudio pretende dar a conocer una visión clara de la metabolización de fenprocumón por CYP2C9 y la conformación del sustrato en el sitio activo de la enzima.

La aportación del estudio computacional es de tipo complementario a los datos experimentales reportados en la literatura, pretendiendo dar a conocer la correlación entre las preferencias regio-específicas del metabolismo de fenprocumón, las preferencias enantiomérica R o S y las cantidades relativas de los metabolitos con eventos moleculares de tipo Ligando-Receptor con descripciones atómicas de las interacciones.

2.1 OBJETIVOS

- Identificar y describir el mecanismo de unión de fenprocumón con la enzima que lo metaboliza, citocromo P450 2C9, mediante el uso de acoplamiento molecular.
- Conocer la energía de interacción proteína-ligando de los metabolitos de fenprocumón con CYP2C9, y relacionarla con los rendimientos experimentales reportados en la literatura.
- Explicar los mecanismos catalíticos y las preferencias de CYP2C9 sobre los metabolitos de fenprocumón mediante el cálculo de energías de interacción proteína-ligando con el empleo de distintos campos de fuerza.
- Proveer evidencia para la identificación de un nuevo metabolito de fenprocumón por CYP2C9
- Conocer la energía de interacción de los metabolitos de fenprocumón con las isoformas CYPs que lo metabolizan y compararlos con la energía de interacción proteína-ligando de los metabolitos de fenprocumón con CYP2C9.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL (HARDWARE)

El hardware utilizado durante esta tesis fue una Macintosh Mac Pro con procesador Intel® Core™ i5-5287U de 4 cores de 2.80 GHz, memoria de 8GB con

sistema operativo Mac OSX para los cálculos con el programa Yeti y una Dell Precision™ Workstation 530 con procesador Intel® Xeon™ E5-2600 de 8 cores de 3.4 GHz, RAM de 4GB sistemas con sistema operativo Windows 7 para el resto de programas.

3.2 MATERIA (SOFTWARE)

El software usado en esta tesis será descrito en breve a continuación, mientras que los métodos se describirán una sección más adelante.

3.2.1 Swiss-Pdb Viewer

Swiss-PdbViewer es una aplicación de descarga gratuita de www.expasy.org/, que proporciona una interfaz gráfica para la visualización de varios tipos de archivos al mismo tiempo en forma tridimensional. En este trabajo fue utilizado para aislar los componentes de cada archivo y superponer las estructuras proteicas con el fin de deducir las alineaciones estructurales y comparar los sitios activos de diferentes estructuras cristalinas de la misma proteína o diferentes isoformas de la misma enzima [123].

3.2.2 VEGA ZZ

VEGA ZZ es una suite de modelado molecular completa que incluye herramientas de visualización, edición y cálculo para trabajos de investigación. Este software es gratuito para usos académicos sin fines de lucro descargable desde www.ddl.unimi.it/vegazz/. Fue utilizado para crear y refinar las estructuras de los ligandos a estudiar para el acoplamiento automatizado. En él se calcularon las cargas parciales atómicas de los ligandos [124].

3.2.3 Discovery Studio 4.0 Client

Accelrys Discovery Studio® software ofrece capacidades integrales de modelado y simulación molecular para la investigación en estudios computacionales. Su gran maniobrabilidad y buenos gráficos de visualización permitieron llevar a cabo el ajuste inducido manual y algunas imágenes en esta tesis. Descargable desde <http://accelrys.com/products/discovery-studio/visualization-download.php> [125].

3.2.4 AutoDock Tools

Autodock tools, o ADT, es la interfaz gráfica de usuario gratuita para AutoDock desarrollada por el mismo laboratorio que creo AutoDock. Se puede utilizar para configurar, ejecutar y analizar acoplamientos de AutoDock y los isocontorno de los mapas de afinidad AutoGrid. Fue utilizado para preparar a la proteína, así como la

parametrización del ligando para su cálculo con AutoDock. Descargable desde <http://autodock.scripps.edu/resources/adt> [126].

3.2.5 Autodock 4.2

AutoDock es un programa que calcula el acoplamiento molecular automatizado con un algoritmo de busque especializado y es capaz de calcular la energía de interacción proteína ligando. Los resultados puede agruparlos de acuerdo la diferencia de posición de sus átomos y según su mínimo energético de interacción proteína ligando. Está diseñado para predecir cómo pequeñas moléculas, tales como sustratos o candidatos a fármacos, se unen a la estructura 3D de una proteína. La paquetería de AutoDock 4.2 incluye al programa AutoGrid. Descargable desde <http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/> [126].

3.2.6 BioX 4.6

Biox es un programa de modelado molecular general capaz de diseñar moléculas, asignar cargas parciales y refinar estructuras con el campo de fuerza Yeti. En esta tesis se utilizó para asignar las cargas parciales de los ligandos resultantes del acoplamiento automatizado e inspeccionar las estructuras para los refinamientos con el programa Yeti. Descargable desde <http://www.biograf.ch/index.php?id=software> [127].

3.2.7 Yeti 8.3

Yeti es un programa de refinamiento de mínimos energéticos que emplea a YetiFF. YetiFF es una extensión de AMBERFF que contemplan funciones metálicas y esta parametrizado para los metales Zn (II), Co (II), Cu (II), Ca (II), Mg (II), Ni (II), Fe (II) y Fe (III) permitiendo la simulación de sus coordinaciones metálicas (tetraédrica, cuadrada-plana, cuadrada piramidal, trigonal bipiramidal y octaédrica), así como su simetría, la transferencia de carga dinámica de metal-ligando, su direccionalidad, preferencias de ligando, entre otras. Yeti es capaz de simular y calcular las interacciones de distintas metalo-proteínas con sus ligandos y tiene la opción de hacer el refinamiento mediante la opción induce fit. Descargable desde <http://www.biograf.ch/index.php?id=software> [119, 128].

3.3 MÉTODOS

Teniendo en cuenta el diseño del estudio requerido para comparar modelos moleculares con los datos experimentales e identificar la estructura hasta ahora desconocida para el pico no identificado en los datos MC/LC de Kammerer en 2005, se ha desarrollado el siguiente diagrama de trabajo (figura 9). En base a la

literatura conocida, fueron preparadas las estructuras de los ligandos que se iban a utilizar y se acoplaron, inicialmente de forma manual, a la estructura CYP más adecuada para este estudio. Se tuvo especial cuidado en el efecto del ajuste inducido que presentan estas enzimas para la elección de la estructura cristalográfica. Se realizó el acoplamiento molecular automático con sus respectivos controles y se llevó a cabo el refinamiento de dichos complejos.

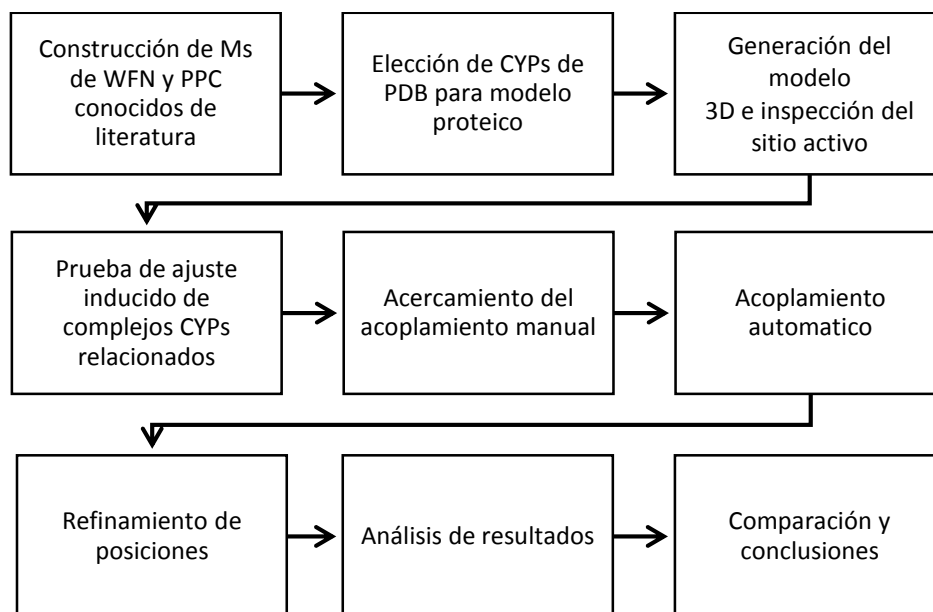


Figura 9. El diagrama de flujo de trabajo del presente estudio in silico con las 9 etapas sucesivas. Swiss-PDB viewer, VEGA ZZ y Discovery Studio se utilizaron en las etapas 3, 4 y 5. En las etapas 6 y 7 una combinación de Autodock 4.2 y Yeti complementado con BioX se utilizaron de una manera sistemática.

3.3.1 Generación de la estructura de ligandos

A partir de la estructura cristalográfica del anticoagulante oral SWF en complejo con la mutante de CYP2C9 reportado en el archivo con código PDB 1OG5 [68], fueron modeladas las estructuras para PPC, tanto en su forma R y S como en todos sus metabolitos reportados hasta la fecha [17, 80, 81], con el programa VEGA ZZ. Al desconocer la identidad del metabolito reportado en 2005 por Kammerer, se crearon todos los metabolitos posibles asignables a ese pico del espectro fotométrico que no han sido descartados previamente en dicho trabajo [81]. Es de recalcar que una hidroxilación en el carbono 10 de PPC crea un nuevo centro quiral. La tabla 4 muestra explícitamente los ligandos que fueron generados para esta tesis.

Tabla 4. Listado de los ligandos creados para este estudio.

Ligando	Tipo
S-2'OH-PPC	M
R-2'OH-PPC	M
S-4'OH-PPC	M
R-4'OH-PPC	M
S-6OH-PPC	M
R-6OH-PPC	M
S-7OH-PPC	M
R-7OH-PPC	M
S-9OH-PPC	M
R-9OH-PPC	M
S-S10OH-PPC	M
S-R10OH-PPC	M
R-S10OH-PPC	M
S-R10OH-PPC	M
S-PPC	S
R-PPC	S

**El tipo M, se refiere a que se trata de un metabolito y S a que es el sustrato. La primera S o R se refiere a la forma enantiomérica dada por el carbono 9 y la segunda S o R es la forma enantiomérica dada por el carbono 10 hidroxilado. El numero señala el carbono que se encuentra hidroxilado.*

Las cargas atómicas parciales fueron calculadas usando Gasteiger [129]; en el programa VEGA ZZ con tipos de átomos del campo de fuerza TRIPOS para el acoplamiento molecular [124], y con el programa BioX con tipos de átomos del campo de fuerza AMBER para los refinamientos con el programa Yeti. Se optó por utilizar la forma aniónica de PPC debido al pKa reportado en la literatura [17, 70]

3.3.2 Análisis de las estructuras cristalográficas de CYPs: preparación del modelo proteico.

En vista de la disponibilidad de estructuras de CYP humanos, el modelado por homología no fue necesario. Se recopilaron los complejos de CYPs humanos para la inspección de la posición de sus ligandos en el sitio activo de cada una de las enzimas. Para obtener una visión detallada de la estructura de las apoformas de CYPs fue inspeccionada la estructura general y de la cavidad después de superposición de todas las estructuras CYPs humanas y CYPs relevantes de otras especies (como 3ME6 y 1NOO) [123, 125]. De esta manera se logró conocer las características importantes de su estructura para la actividad metabólica de la enzima, los residuos destacados que interaccionan con su sustrato y los necesarios para su actividad. Las estructuras de complejos con ligandos similares a PPC fueron utilizados para validar el acoplamiento molecular a ciegas mediante la evaluación de la confiabilidad que se tienen de las posiciones halladas (geometría del ligando en los resultados) y las energías calculadas con Yeti. Estos complejos cristalizados sirvieron además para calibrar los parámetros para calcular en el programa Yeti. La tabla 5 muestra todos los complejos de CYPs humanos reportados en PDB y la energía de interacción Proteína-Ligando calculada con Yeti. Es de resaltar que no todos los CYPs humanos se encuentran en esta base de datos

Tabla 5. Listado de los complejos CYPs humanos reportados en PDB. Ultima visita 27/10/2014.

Código PDB	CYP	Mutaciones	Código del ligando	Energía de interacción	Tipo de L
4I8V	1A1		BHF	-12.61	S/I
2HI4	1A2		BHF	-12.32	S/I
3PM0	1B1	A119S	BHF	-11.61	S
4EJH	2A13		0QA	-3.86	S
3T3S	2A13		9PL	-12.18	I
2P85	2A13	V23M/W24A/R25K/Q26K/R27T/K28S/R30K	IND	-8.84	S
4EJG	2A13		NCT	-7.74	S
4EJI	2A6		0QA	-9.00	S
1Z11	2A6		8MO	-6.33	I
3T3R	2A6	Y392F	9PL	-8.16	I

1Z10	2A6		COU	-10.68	S
2FDU	2A6		D1G	-6.01	I
2FDV	2A6		D2G	-9.97	I
2FDW	2A6		D3G	-7.86	I
2FDY	2A6		D4G	-7.53	I
3EBS	2A6	I208S/I300F/G301A/S369G	N4E	-9.51	S
4EJJ	2A6		NCT	-5.56	S
3UA5	2B6	Y226H/K262R	06X	-2.07	I
3QOA	2B6	Y226H, K262R	3QO	-1.06	I
3IBD	2B6	Y226H, K262R	CPZ	-5.13	I
4I91	2B6	Y226H, K262R	TMH	-11.40	I
4GQS	2C19		0XV	-11.21	I
2NNJ	2C8		"225	-6.86	S
2NNI	2C8		MKT	-19.07	I
2NNH	2C8		REA	-14.28	S
2VN0	2C8		TDZ	-22.53	I
1R9O	2C9	I490V	FLP	-30.44	S
1OG5	2C9	K206E/I216V/C217Y/S220P/P221A/I222L/I223L/	SWF	-18.59	S
3QM4	2D6		PN0	-11.81	I
3TDA	2D6		PN0	-12.28	I
3TBG	2D6		RTZ	-15.59	I
3E4E	2E1		4PZ	5.95	I
3T3Z	2E1		9PL	-9.08	I
3LC4	2E1		LC4	-5.63	I
3E6I	2E1		LZ1	5.33	I
3GPH	2E1		OID	-18.25	I

3KOH	2E1		OIO	-14.25	I
3CZH	2R1		D2V	-19.17	S
3DL9	2R1		V2H	-23.39	S
3C6G	2R1		VD3	-6.35	S
3UA1	3A4		08Y	-20.05	S
4K9T	3A4		1RD	-16.38	I
4K9U	3A4		5AW	2.59	I
4K9V	3A4		6AW	-18.38	I
4K9W	3A4		7AW	-19.08	I
4K9X	3A4		8AW	-7.98	I
3TJS	3A4		DOR	-7.51	I
2J0D	3A4		ERY	-13.47	S
2V0M	3A4		KLN	-18.98	I
3NXU	3A4		RIT	-19.50	I
4I4G	3A4		Z8Z	-23.10	I
4I4H	3A4		Z9Z	0.94	I
1W0F	3A4		STR	16.41	M
1W0G	3A4		MYT	-3.64	I
3V8D	7A1	T104L	0GV	12.18	S
3V8D	7A1	T104L	0GV	-9.49	S
3SN5	7A1	T104L	K2B	7.64	S
3SN5	7A1	T104L	K2B	-20.12	S
3B6H	8A1		MXD	-1.86	I
3B6H	8A1		MXD	-3.46	I
3NA0	11A1		2DC	-14.42	M
3N9Y	11A1		CLR	-13.19	S

3N9Z	11A1	HC9	-20.12	M
3NA1	11A1	HCD	-22.03	M
4FDH	11B2	OT3	-8.49	I
4DVQ	11B2	1CA	-14.72	S
3RUK	17A1	AER	-9.99	I
3SWZ	17A1	TOK	3.08	I
4GL7	19A1	0XJ	4.49	S
3S79	19A1	ASD	-17.46	S
4KQ8	19A1	ASD	-6.83	S
3S7S	19A1	EXM	-7.42	S
4GL5	19A1	G29	-8.98	S
4FIA	46A1	0U9	-14.61	I
2Q9F	46A1	C3S	-22.11	S
3MDV	46A1	CL6	-5.56	I
3MDM	46A1	FJZ	4.02	I
4ENH	46A1	FVX	-7.86	I
3MDR	46A1	GJZ	-0.82	I
3MDT	46A1	VOR	-9.44	I
4J14	46A1	X2N	-7.03	I
3JUS	51A1	ECL	1.48	I
3LD6	51A1	KKK	-13.51	I

**I es inhibidor, S es sustrato y M es metabolito, el código del ligando es el utilizado en el servidor PDB*

A la fecha no se ha reportado una estructura cristalográfica de PPC con la enzima CYP2C9 (tabla 5) [67], sin embargo, existe un modelo muy similar al modelo de estudio; en él, está reportado al anticoagulante oral SWF con una mutante de la enzima CYP2C9 [68], lamentablemente, el sustrato no está colocado en geometría de hidroxilación; de hecho, es el único ligando de los complejos CYPs que se encuentra lejos del sitio activo [16]. Probablemente las 7 mutaciones que contiene modifican la estructura de la enzima, incluyendo su sitio

activo y la afinidad con el ligando. Como se ha previamente mencionado, una mutación puntual en CYP2C9 aunque no sea en su sitio activo, puede provocar que disminuya su actividad sobre cierto sustrato [66]. Casi todas las estructuras cristalinas estudiadas pertenecen a la especie humana; sin embargo, además de los complejos destacados de CYP2A6 con los ligandos similares a PPC, cumarina y metoxaleno (códigos PDB 1Z10 y 1Z11) [130], y CYP2C9 con ligando flurbiprofeno (código PDB 1R9O) [45], también se estudió la isoforma de conejo CYP2B4 con un ligando de estructura similar a PPC, S-clopidrogel (código PDB 3ME6) [131]. La posición del anillo cloro-fenil y la geometría global de clopidrogel sirvió como plantilla 3D para encontrar las poses de enlace durante el acoplamiento manual de las hidroxilaciones en C-2 'y C-4' del anillo de fenilo de PPC. Además, para el estudio de la selectividad y afinidad de los CYPs humanos con sus ligandos, se analizó el grado de similitud (porcentaje de identidad) de sus secuencias de aminoácidos utilizando CLUSTAL W, de acceso libre vía web, para los alineamientos múltiples de secuencias (MSA). Esta herramienta fue de utilidad para lograr la visualización de la similitud de que tienen los CYPs que metabolizan PPC.

Se optó por utilizar como modelo proteico a 1R9O, esto debido a la importancia de mantener la estructura y secuencia lo más parecido posible a la isoforma natural y conformación de hidroxilación para los correctos cálculos de afinidad ligando-proteína. A pesar de poseer 1R9O gaps en la estructura cristalina, estas no se encuentran en el sitio activo, y se tiene certeza de que la estructura se encuentra en la correcta conformación, ya que su ligando posee correcta geometría de hidroxilación; además, cuenta con una molécula de agua en coordinación con el Fe como ligando distal. A diferencia de 1OG5, la conformación de CYP2C9 en 1R9O permite calcular con mecánica molecular las energías de afinidad de esta enzima con los ligandos de PPC de manera confiable. El posible efecto del ajuste inducido hace que 1R9O sea la mejor elección como modelo proteico.

Para comparación de estructura y actividad catalítica, y otros trabajos de acoplamiento molecular del complejo CYP-PPC fueron utilizadas las estructuras cristalizadas 1TQN [132], 4GQS [133] y 2NNJ [134] para CYP3A4, CYP2C19 y CYP2C8 respectivamente.

Se aislaron los componentes de 1R9O usando SPDBV [123]. Para el acoplamiento molecular, la proteína CYP2C9 fue preparada usando Autodock tools [126]; y para el refinamiento de las posiciones resultantes del acoplamiento molecular con BioX [127]. Los parámetros de la proteína están en las librerías de ambos programas y usan AMBER y Yeti respectivamente como campo de fuerza.

3.3.3 Control del ajuste inducido: inspección y generación del modelo 3D

Como ya se ha mencionado, se hace evidente que la flexibilidad estructural de la proteína tiene un papel crucial en la conformación del complejo ligando-proteína, sobre todo en las enzimas que se sospecha tienen ajuste inducido. Para solventar este reto, se realizó la búsquedas de pares de complejos CYP con su ligando y en su forma apoenzimática para encontrar fenómenos de ajuste inducido sobre la unión del ligando en el sitio activo de distintos CYPs humanos. Después de la superposición de las estructuras cristalográficas, cualquier reordenamiento conformacional de cadenas laterales o cadenas principales (backbone) de los complejos con ligando respecto a la forma apoenzimática fue identificada y descrita como posible caso de ajuste inducido.

La tabla 1 en [34] contiene alrededor de 40 métodos computacionales para predecir SoMs e interacciones de sustratos con enzimas metabólicas. Para este estudio se decidió combinar los enfoques reportados de acoplamiento proteína-ligando y modelado farmacóforo [135, 34]. El fundamento de esta combinación es la evidencia existente en la literatura que permite predecir modos de unión, comparar afinidades de unión estimados de los valores notificados y sacar conclusiones sobre las especificidades de cada isoenzima [34].

3.3.4 Acoplamiento molecular y refinamiento de complejos

Para cumplir con los objetivos del presente estudio, por medio del enfoque de mecánica molecular se estudió si solo el efecto estérico y energético implementado en las funciones de acoplamiento y de puntuación serían lo suficientemente sensibles para reproducir los resultados experimentales sobre selectividad del sustrato y su regio-selectividad de metabolización.

Estructuras cristalinas relacionados de complejos enzimáticos ligando-CYP fueron inspeccionados y utilizados como acoplamiento control positivo (Backdocking) para validar el acoplamiento a ciegas de PPC en CYP2C9. Se llevó a cabo el acoplamiento manual de complejos reportados en la literatura y no existentes en cristalización; por ejemplo, el modelado de R-WFN con CYP3A4 en posición de hidroxilación en C-10. El acoplamiento manual fue realizado con el programa Discovery Studio 4.0 [125]. De esta misma manera, se tuvo un acercamiento de las posiciones de los ligandos a estudiar (tabla 4) en el sitio activo de la proteína teniendo consideración de las geometrías de hidroxilación y los lugares donde los sustratos de los CYPs (vistos mediante la superposición de los complejos de PDB) residen.

El acoplamiento automatizado se llevó a cabo por Autodock 4 mediante las herramientas MGL en Autodock tools [126]. Las posiciones del acoplamiento

manual fueron utilizadas como las posiciones iniciales para el acoplamiento automatizado. Con el fin de mejorar la selección de las posiciones finales en el procedimiento de acoplamiento automático, se tomó consideración particular en la geometría de hidroxilación [15, 16]. Para el refinamiento fueron seleccionadas no solo las posiciones con mejor puntuación energética, sino también las que tuvieran la geometría previamente descrita (distancias y ángulo de enlace).

Las posiciones finales fueron refinadas bajo el programa Yeti [119, 128]. La razón de la decisión de redefinir los mínimos locales de las geometrías finales radica en la implementación de los parámetros específicos que YetiFF tiene para el átomo de hierro del grupo hemo.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al haber sido ofrecidos la colaboración y los datos experimentales concernientes al análisis de espectrometría de masa acoplada a cristal líquido de metabolitos de fenprocumón mediados por CYP2C9 presentes en sangre de pacientes [81], con el fin de dilucidar la identidad un metabolito sin identificar, se recolectaron datos adicionales de los patrones de metabolización de esta enzima y se generaron las estructuras de todos los metabolitos de PPC reportados hasta la fecha en la literatura (figura 8, tabla 4) [81, 17, 80].

La siguiente etapa de la investigación continuó con el estudio de las estructuras cristalográficas de las proteínas CYPs reportadas en PDB para proseguir con el protocolo de investigación reportado en la figura 9. El estudio de los patrones de hidroxilación sobre los átomos de carbono alifáticos y aromáticos de PPC mediados por las enzimas CYPs se realizó de una manera imparcial y objetiva.

4.1 ANALISIS DE LAS ESTRUCTURAS CRISTALIZADAS Y SECUENCIAS DE LOS CITOCROMOS P450 HUMANOS

Antes de cualquier cálculo de acoplamiento molecular, fueron comparadas y analizadas las estructuras CYPs relevantes reportadas en PDB; en especial, fue analizada a detalle la estructura y conformación del sitio activo de CYP2C9 en complejo con flurbiprofeno (código PDB 1R9O) [45]. Previamente ya se han descrito las razones de la elección de CYP2C9 en este modelo sobre otros complejos de esta enzima reportados en esta base de datos. Se compararon y analizaron la relación que se tienen entre la secuencia de distintos CYPs con su estructura, actividad y afinidad sobre los sustratos estudiados.

4.1.1 Sitio activo de CYP2C9

Como ya se ha reportado en trabajos anteriores, existen aminoácidos importantes para la regio-selectividad en distintas moléculas sustratos; tal es el caso del papel que juega Asn297 en CYP2A6 humana en la hidroxilación de la cumarina, donde a excepción de este aminoácido, el sitio activo de esta enzima es claramente hidrofóbico (código PDB: 1Z10) [130]. En el caso de CYP2C9 los aminoácidos involucrados en el reconocimiento y actividad sobre el ligando también son una combinación entre hidrofóbicos y polares, en particular F100, R108, V113, F114, I205, L208, A297, T301, L362, L366 y F476 son los aminoácidos principales en el sitio activo de CYP2C9. Estos aminoácidos están ubicados en regiones específicas de la enzima para el reconocimiento del sustrato [26]; de manera más concreta, estos aminoácidos se encuentran en el asa B-C, la α -hélice I, en la zona N-terminal de la α -hélice F, en las asas cercanas a las hojas β -1 y β -4. El sitio activo de CYP2C9 tiene forma de "V"; esta forma está dada por la posición y orientación de I205 que se encuentra en la α -hélice F constituyendo el techo del sitio activo, el grupo hemo delimita la zona inferior del sitio activo ("piso del sitio activo"). Las cadenas laterales de los aminoácidos del sitio activo, a excepción de F100, L208 y F476, están orientados en dirección al grupo hemo. Las dos fenilalaninas F100 y F476 junto con L366, conforman la pared opuesta a la α -hélice I que delimita al sitio activo, las fenilalaninas en la parte superior y las dos leucinas (L362 y L366) en la parte inferior. La pared opuesta a la entrada está delimitada por los aminoácidos T301 y L362; cerca de la entrada, en posición opuesta a estos dos últimos aminoácidos se ubican R108, V113 y F114 para formar la última pared que delimita al sitio activo de CYP2C9 (figuras 10, 11). Existen otros aminoácidos que participan en el metabolismo del sustrato, sin embargo se encontró que los descritos anteriormente son los aminoácidos más relevantes en dar la estructura y actividad al sitio activo de CYP2C9 [45].

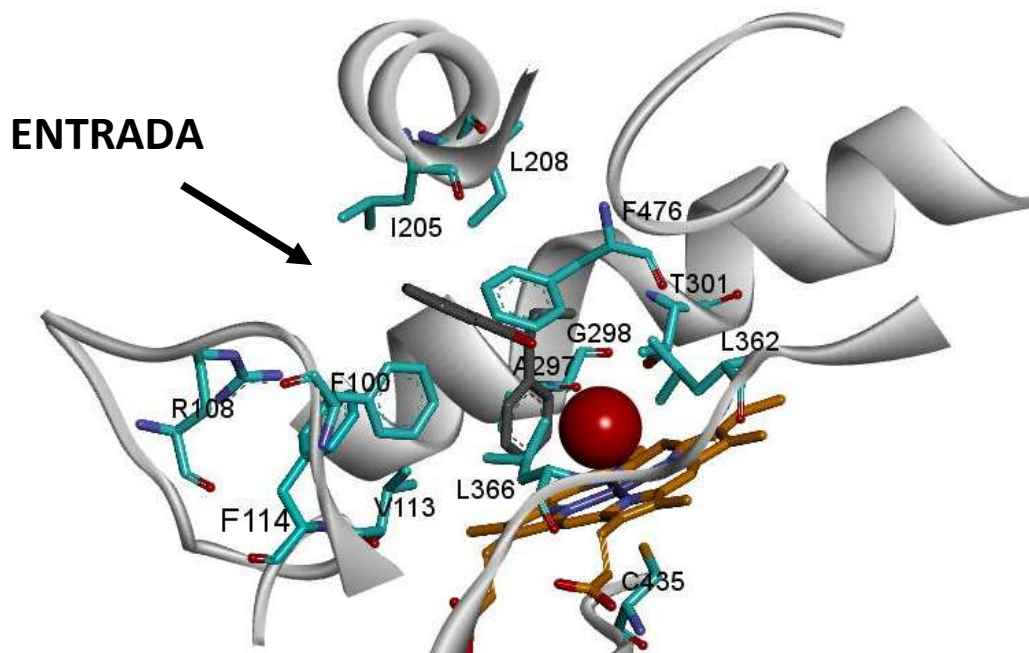


Figura 10. Composición de los aminoácidos del sitio activo de CYP2C9. Se representa a CYP2C9 (blanco) en forma esquemática de su estructura tridimensional resaltando los aminoácidos importantes del sitio activo (azul) en complejo con PPC (gris) y se muestra la entrada hacia la cavidad. El ligado distal (rojo), oxígeno con radios de Van der Waals, se encuentra en coordinación con el grupo hemo (naranja). Código PDB: 1R9O [45].

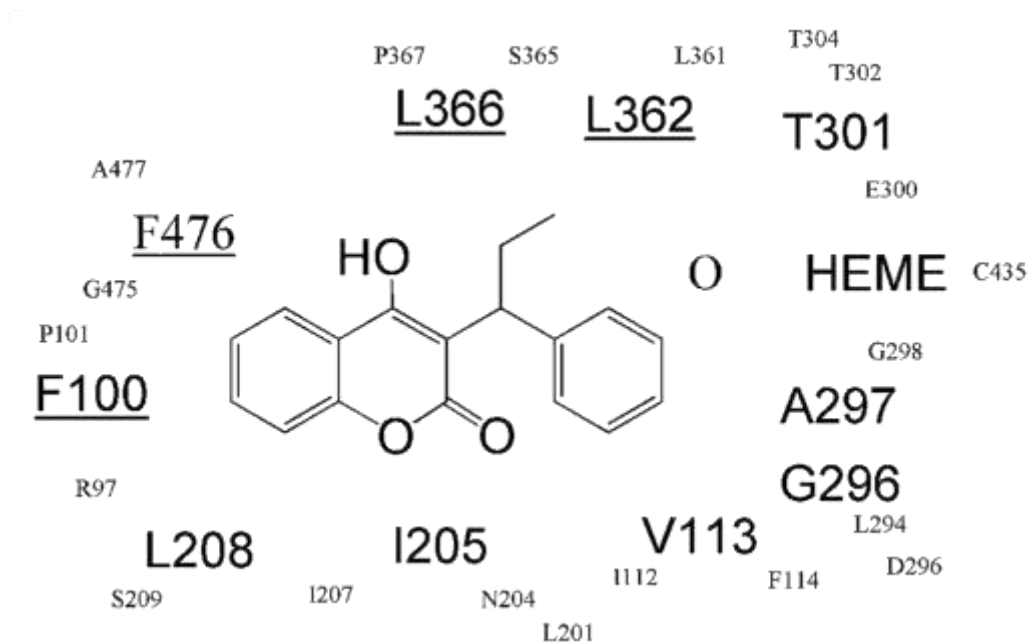


Figura 11. Composición de los aminoácidos del sitio activo de CYP2C9. Se muestra un esquema bidimensional de la posición de los aminoácidos del sitio activo en relación al sustrato PPC.

4.1.2 Relación secuencia, estructura y función de los CYPs

Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las de las isoformas de CYPs humanas fueron identificadas por el estudio del alineamiento múltiple de secuencias (MSA, por sus siglas en inglés multiple sequence alignment). Como era de esperarse, CYP2C9 comparte un alto porcentaje de similitud en su secuencia con CYP2C19 y CYP2C8 ya que pertenecen a la misma familia y subfamilia (2C); no obstante, a pesar de su alto porcentaje en la similitud de la secuencia primaria, CYP2C9 y CYP2C8 no comparten ni la afinidad ni los mismos patrones de metabolización sobre PPC, mientras 2C9 hidroxila a ambos enantiómeros de PPC en varios SoMs, CYP2C8 solo es capaz de hidroxilar al carbono C-4' del enantiómero S-PPC en un rendimiento menor al de CYP2C9. En contraste, al comparar las secuencias de CYP2C9 y CYP3A4, se aprecia que tienen muy baja similitud; esto es una sorpresa teniendo en cuenta que comparten la misma afinidad por los sustratos WFN y PPC, y tienen los mismos patrones de hidroxilación sobre PPC en la misma proporción, siendo las posiciones preferidas de metabolización el átomo de carbono C-7, C-4' y C-6 en orden decreciente para ambas enzimas [80]. La siguiente tabla revela el porcentaje de similitud que guarda CYP2C9 con todas las isoformas CYP humanas. No se ha reportado que otros CYPs además de 2C9, 2C19, 2C8 y 3A4 metabolicen a PPC, sin embargo, existen otros CYPs que guardan mayor porcentaje de similitud en su secuencia con 2C9 antes que CYP3A4 (Tabla 6). Se debe recordar que CYP2C9 y CYP3A4 son las mayores encargadas de la primera fase de metabolización de este PPC (figura 8, tabla 2) [80]. Ver sección de suplementos para el árbol filogenético de estos CYPs. Se pueden descartar como posible blanco de estudio molecular a las isoformas CYPs no marcadas en rojo, ya que no son capaces metabolizar al sustrato de estudio.

Tabla 6. Enumeración en orden decreciente del porcentaje de similitud que guardan los CYPs humanos con CYP2C9. En **rojo** se marcan las isoformas CYPs bajo investigación.

Posición	Isoforma CYP humana	Porcentaje de similitud
1	CYP2C9	100.00%
2	CYP2C19	91.40%
3	CYP2C18	81.80%
4	CYP2C8	77.90%
5	CYP2E1	56.60%
6	CYP2A13	49.50%
7	CYP2A6	48.70%
8	CYP2F1	48.70%
9	CYP2A7	48.10%
10	CYP2B6	47.30%

11	CYP2S1	42.00%
12	CYP2D6	38.20%
13	CYP2J2	37.50%
14	CYP2W1	33.80%
15	CYP2U1	33.20%
16	CYP2R1	32.70%
17	CYP1A1	26.30%
18	CYP1B1	26.20%
19	CYP1A2	24.30%
20	CYP17A1	22.60%
21	CYP21A2	22.30%
22	CYP27B1	19.30%
23	CYP3A4	17.70%
24	CYP3A5	17.70%
25	CYP3A7	17.00%
26	CYP4A1	16.70%
27	CYP4V2	16.50%
28	CYP27A1	16.30%
29	CYP3A43	16.20%
30	CYP24A1	15.80%
31	CYP4F12	15.70%
32	CYP20A1	15.70%
33	CYP5A1	15.50%
34	CYP19A1	15.00%
35	CYP4X1	14.70%
36	CYP26A1	14.60%
37	CYP26C1	14.60%
38	CYP4A11	14.50%
39	CYP4F2	14.50%
40	CYP4Z1	14.50%
41	CYP8A1	14.40%
42	CYP39A1	14.40%
43	CYP4A22	14.30%
44	CYP4F3	14.30%
45	CYP4B1	14.20%
46	CYP4F22	14.20%
47	CYP7B1	14.20%
48	CYP8B1	14.10%
49	CYP11B2	14.10%
50	CYP4F8	13.80%
51	CYP4F11	13.80%
52	CYP11B1	13.70%

53	CYP11A1	13.50%
54	CYP7A1	13.20%
55	CYP27C1	12.80%
56	CYP26B1	10.30%
57	CYP51A1	10.20%

El MSA nos permitió observar donde se localizan la mayor cantidad de diferencias de la secuencia de los CYPs que metabolizan a PPC. En la figura 12 se muestra parte del alineamiento de CYP2C9 con otros relevantes que son capaces de metabolizar pequeñas moléculas iónicas como lo son los anticoagulantes cumarínicos. Los aminoácidos que forma parte de la cavidad catalítica de CYP2C9 están marcados con letras mayúsculas, mientras que los identificados como importantes para la interacción directa con el sustrato en la cavidad están subrayados. Las secuencias de los otros CYPs comparados con CYP2C9 se muestran de manera parcial colocando únicamente los aminoácidos que difieren de la secuencia de CYP2C9. En la línea 7 se resaltan prolina identificadas como responsables principales en la estructura tridimensional de las enzimas; como se sabe las prolina son señaladas como responsables de cambios o giros en la cadena principal de las proteínas. Se muestra también dos líneas que señalan el tipo de estructura secundaria y la identificación de esta. Las secuencias de CYP2C9 y CYP3A4 se muestran en las líneas 5 y 6 de la Figura 7 respectivamente; se puede distinguir claramente cómo difieren en su secuencia de aminoácidos, aun en los residuos de unión al sustrato. La diferencias en las secuencias de CYP2C8 y CYP2C9 radica principalmente en los aminoácidos del sitio activo, mientras que CYP2C19 difiere de CYP2C9 en zonas estructurales de la enzima.

```

CYP2C19          pf          i          di 48
CYP2C8          epf          fm f          cr r          i ml dv 48
CYP2D6          mglea p avivaif vdlmh rqrwaary l gl l hvdfq 48
CYP1A2          malsqsvpfsate llasaifclvfwlkg rprvpkgl s e wgw ll hv t1 - 59
CYP3A4          malipdlametw l av lv ylygthshglfkklgi fl syhkg 55
CYP2C9          -----mdslvvlvclscilllls--lwrqssgrgklppgptlpvignilqigik 48
Sec. strc. 2C9 -----LLLLLLLLLLLLLLLLLLLL--LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLAAAA
Sec. strc. Id          A

          . . . :          :          * * * : * : *

CYP2C19          v          i          erm          v          h          107
CYP2C8          c f f          v mn f          n          ns isq it 107
CYP2D6          ntpycfdq rrrf d s qlawt v n la r vth dtad ppv itqilg 111
CYP1A2          nphla srm qr d lqiri st vl srltdirg vrq d d k pdlytstlit 118
CYP3A4          -fcmfdmech k k wgf d qq vlaitdpdmi tv vkecyv tn rp gpvgfmk 115
CYP2C9          disksltlnskvygvpvftlyfglkipivvlhgyeavkealidlge-efsgRGIFPLAERAN 107
          P73          P101
Sec. strc. 2C9 AAAAAAAAAAAAAAAAAALBBBBBLLLLBBBBBLAAAAAAAAAALLLL-LLLBLLLLLLLLLLLL
Sec. strc. id          A           $\beta$ 1-1           $\beta$ 1-2          B           $\beta$ 1-5
          . : : * * . . . : : : : : : : * : . *

CYP2C19          r          156
CYP2C8          k l          is r          t          h          156
CYP2D6          f prsqgvflary pa r q vs l l k l qw t a caaf 164
CYP1A2          d qs ltfatds pv aar laqna ntfsiasdpasssscyl eh ske ka isrl 176
CYP3A4          sais --iaedee rl sllsp ftsgklkemvp ----iiaqygdv rnl 160
CYP2C9          RGFG----IVFSNgkkwkeirrfslmltrnfgmgkr-----siedrvqeearclveel 156

Sec. strc. 2C9 LLLL----LLLLAAAAAAAAAAAAAAAAALLLLLLLLL--AAAAA
Sec. strc. id          C          D
          .          . * * : : : . : . : : . * :

CYP2C19          q          r v t          214
CYP2C8          vv q          n t krf fr n          214
CYP2D6          anhsgr fr ngl dkavs a ltogr e d pr r ldlaq glkeesgflre 222
CYP1A2          qelmagpghfd ynqvvsva gamc gqh pessdem s vknth fveta --gn 234
CYP3A4          reaetgkpvtkdvh aysmd t ts gvni slnnpqdpfv ntkllrfdfldpff 220
CYP2C9          rktkasp--cdptfilgcapcnvicsiifhkrfdykdqqflnlmekLNENIKLSSpwiq 214
          P211
Sec. strc. 2C9 AALLLLL--LLAAAAAAAAAAAAAAAAALLLLLLAAAAAAAAAAAAAAAAALLLLL
Sec. strc. id          D          E          F
          .          .          : ** :          :          .          : : : . .

```

```

CYP2C19          pt          l e d          i r          i          271
CYP2C8          v   pll c          v   ltr r          a l v r          i   q          271
CYP2D6          vl avp-vllhi alag v rfqkafltqldellte rmtw paqppr ltea ae          279
CYP1A2          pldf pilrylpnpalqrfkafnqrfwflqkt q yqdf k s-vr itgalfkxsk          291
CYP3A4          lsii pfl pilevlnicvfprevtnflrksv rmkesrle tqkhrv lqlmidsqns          278
CYP2C9          icnnfspiidyfpqthnkllknvafmkxyilekvkehqesmdmnp-qdfidcflmkmek          271
                    P220
Sec. strc. 2C9  LLLLLLLLLLLLLLLLAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAALLLLLL-LAAAAAAAAAAAA
Sec. strc. id          G          H
                .. :          .          .. * . *: : : ..

CYP2C19          q q          n vi a l          331
CYP2C8          d k n n vg va v          g          dh          331
CYP2D6          a g pe s nd n rivva s mv          awg mil d qrr q dd q          339
CYP1A2          gprasgnlipq kiv lvn i          fd vttaisws my vtk iqr i k ldt          351
CYP3A4          keteshkalsdle vaqsiifif y          sv sfimy e at d qq l da lpn          338
CYP2C9          ekhnqpsseftieslentAVDLFGAGTETTSTTLryallllllkhpevtakvqeieivigr          331
Sec. strc. 2C9  AALLLLLLLAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAALAAAAAAAAAAAAAAAAALL
Sec. strc. id          H          I          J
                . : : : : ** * : : : : : : * : : * : * : * .

CYP2C19          g          i          v          391
CYP2C8          h          i s v gv          t t          mal          391
CYP2D6          v r e g qa          ta i          fg iv lgvt mtsr evqgfr          litn s          399
CYP1A2          e r rls pql leafil tf hssfl fti st r ttlngfy          kccvfvnqwq          411
CYP3A4          kap tydtvlq e l m n tl lfpiamr- ervcck veingmf          vvvvm psya          397
CYP2C9          nrspcmqdrshmpytdavvhevqRYIDLLPTSLPHAVtodikfrnylipkggttilislts          391
                    P367
Sec. strc. 2C9  LLLLAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAALLLLLLLBBBBLBBBLLLLBBBBLAAA
Sec. strc. id          J'          K          beta-4 beta-1 beta-2 beta-3 K'
                *          : : * : : * * : : : : . * ... *** : :

CYP2C19          r          n          g r          448
CYP2C8          d ni g kn          d          a g r          448
CYP2D6          k eavwek fr h e          aq h v          pea l          r a l p r          f          456
CYP1A2          nh pelwed se r er tad tainkpl ekml gm          ri v kw i          a          471
CYP3A4          lhr p ywte k l er skknkndid -pyiyt gs p n i mrf l nmk a I          454
CYP2C9          vlhdnkefpnpemfdphhfldeggnfk---kskyfmpfsagkricvgealagmelflft          448
Sec. strc. 2C9  AAALLLLLLLLLLLLLLAAAAAAAAALLLLLL---LLLLLLLLLLLLLLLLAAAAAAAAAAAAA
Sec. strc. id          K'          K''          L
                : : * : : * * * : *          .          * . * * * : * : : * :

CYP2C19          f          i d          490
CYP2C8          t          vd l n a tk iv l s i          490
CYP2D6          l h sfs-vptgqprpshhg fa lvs sp e av r          497
CYP1A2          il qliefsvppgv vdltpiygltnkharcehvqarlrfain          516
CYP3A4          rv sfpcketqi plklslsgllqpek vvlkvesrdgtvsqa          502
CYP2C9          silqfnlkslvdpknltdttppvvnGFASVPFyqlcfipv-----          490
Sec. strc. 2C9  AAAAABBBBBLLLLLLLLLLLLBBLLLLBBLLLLLLLLBBBBBL-----
Sec. strc. id          L          beta-3          beta-4-1 beta-4-2          beta-3-2
                : ** : : : : : : : :

```

Figura 12. La secuencia de CYP2C9 es alineada comparada con otros CYPs que son relevantes en el metabolismo de las 4-hidroxycumarinas. Las letras minúsculas representan los códigos de una letra de los aminoácidos. Las letras mayúsculas simbolizan los aminoácidos del sitio catalítico. Letras mayúsculas subrayadas representan los aminoácidos que interactúan con el ligando.

Aunque CYP3A4 y CYP2C9 son muy diferentes en su secuencia y estructura, comparte comportamientos y patrones semejantes de metabolización; al decir esto, parece no haber relación entre estructura y secuencia con el reconocimiento y actividad de los CYPs sobre PPC; sin embargo, diferencias en aminoácidos específicos, tanto del sitio activo como de zonas estructurales de la enzima, parecen tener influencia sobre la actividad que los CYPs tienen sobre su sustrato. Tal es el caso de cómo estas sutiles diferencias en la secuencia entre CYP2C9, CYP2C19 y CYP2C8 contribuyen a las diferencias en el reconocimiento del sustrato y su actividad metabólica. CYP2C8, CYP2C19 y CYP2C9 son muy parecidos secuencial y estructuralmente, y sin embargo, CYP2C8 no es capaz de metabolizar WFN y solo metaboliza a S-PPC en el carbono C-4' [80]; mientras que, aunque CYP2C9 y CYP2C19 metabolizan ambos enantiómeros de WFN, CYP2C9 tiene preferencias por la forma S-WFN en el carbono C-7 y CYP2C19 tiene preferencias por la forma R-WFN en el carbono C-8 [79]. Otro ejemplo claro de cómo la secuencia de aminoácidos modifica el comportamiento de un CYP, se haya en las variantes de CYP2C9 que tienen una baja actividad metabólica [66].

Con el MSA se detectó, además, que existen prolinas importantes para la estructura tridimensional de estas enzimas. Como se sabe, las prolinas juegan un papel muy importante en la estructura general de las proteínas, determinan cambios bruscos en la dirección de la cadena de aminoácidos y permite que se formen o no ciertas estructuras secundarias. En el caso de los CYPs que metabolizan a PPC, la prolina 220, situada entre el α -hélice G y el α -hélice F, hace completamente diferentes la estructura tridimensional del sitio activo los citocromos P450 2C9 y 2C19, a pesar de su similitud en el resto de su secuencia. Esta prolina se encuentra desfasada respecto a los otros CYPs, lo cual puede favorecer a que los aminoácidos del sitio activo estén situados u orientados de distinta forma. Existen otras prolinas no conservadas antes del asa B-C, que es la entrada del sustrato al sitio catalítico de la enzima, estas prolinas también juegan un papel importante en el reconocimiento del sustrato al estar ubicadas en esa posición. La importancia de dichas prolinas en la estructura y actividad de los CYPs se describirá a detalle en un caso en secciones más adelante.

4.1.3 Asa B-C: su papel en la actividad de los CYPs

El asa B-C es parte fundamental en el reconocimiento del sustrato, y en trabajos anteriores se ha caracterizado la composición de esta asa en un número considerable de CYPs, revelando que los aminoácidos hidrofóbicos son los que tienen mayor incidencia [26]. Basándose en el estudio de la composición de los aminoácidos del esta región reportada por Sirim en 2010 [26], se procedió al análisis de la composición de la entrada de los CYPs que tienen actividad sobre los anticoagulantes cumarínicos (tabla 7). Se realizó una corrección de los valores

reportados en las categorías del trabajo original debido a algunas inconsistencias en su agrupación y caracterización química de aminoácidos. Se efectuó la categorización de aminoácidos según las características químicas de los ligandos de estudio (ver suplementos, para conocer los aminoácidos en cada categoría).

Tabla 7. Composición porcentual de los tipos de aminoácidos presentes en CYPs que tienen como sustrato a los anticoagulantes cumarínicos.

Categoría	Varios	2C8	2C9	2C19	3A4	2D6
alifáticos o fenilalanina	82%	50%	72%	67%	71%	73%
polares	12%	33%	6%	6%	12%	18%
ionizados	3%	17%	22%	28%	18%	9%
Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Los cinco CYPs estudiados tienen una composición más alta aminoácidos polares, y aún más alta de aminoácidos cargados, en decremento de los residuos alifáticos y aromáticos. Esta tabla permite observar un patrón interesante respecto a la afinidad que las enzimas podrían tener sobre un sustrato con características hidrofóbicas y, al mismo tiempo, iónicas como lo es PPC. La cadena lateral etil de PPC hace a que este fármaco sea aún más hidrofóbico que WFN (log P 3.62 y 2.7 respectivamente) [136]. Las enzimas con un porcentaje más alto de aminoácidos alifáticos o aromáticos son CYP2C9, CYP3A4 y CYP2D6, y con un mayor porcentaje de residuos cargados son CYP2C9, CYP3A4 y CYP2C19 (tabla 7). De las enzimas que metabolizan a los anticoagulantes orales, CYP2C9 y CYP3A4 son las enzimas que tienen una composición más alta de aminoácidos alifáticos, aromáticos y con carga; al mismo tiempo, son las enzimas que mejor rendimiento tienen sobre la bio-transformación de PPC.

No solo la química del sitio activo ejerce las preferencias y rendimientos que los CYPs tienen sobre su sustrato. La composición de aminoácidos que el asa B-C tiene en un CYP, juega un papel muy importante en el reconocimiento y afinidad que estas enzimas tienen sobre el sustrato. Si se desea conocer o predecir las preferencias que un citocromo P450 tiene sobre un posible sustrato, es importante evaluar la química de esta región. Factores de cinética enzimática como Km y Vmax están determinados también por la facilidad en que el sustrato ingresa al sitio catalítico de una enzima. El asa B-C nos revela parte de las preferencias que los CYPs tienen sobre sus respectivos sustratos. Por tal motivo no se puede perder de vista la importancia que esta región tiene sobre la primera fase de metabolización de los de los fármacos.

4.1.4 Análisis comparativo tridimensional

Una vez siendo descargadas todas las estructuras de los CYPs humanos presentes en PDB (última revisión 16/08/14) se procedió al análisis de la ubicación que los ligandos tienen en el sitio activo de la enzima. Existen complejos cristalizados con ligandos de mayor volumen en comparación con PPC, así que se procedió a la discriminación de estos ligandos y se optó por utilizar los ligandos de un tamaño y forma similar al de los anticoagulantes orales para poder ser utilizado como plantilla para el acoplamiento molecular manual. En esta superposición de ligandos se logró apreciar como la SWF de 1OG5 se encuentra fuera de la geometría de hidroxilación.

La superposición de las enzimas que metabolizan a PPC se muestra en la figura 13, en ella se pueden apreciar las diferencias estructurales que existen entre dichas enzimas. En trabajos previos fueron remarcadas las diferencias estructurales en el sitio catalítico y en el asa B-C entre los CYPs de la misma subfamilia 2C [133]. En este trabajo se exhiben las características de estructura en relación a la actividad que distinguen a las enzimas 2C9, 2C19 y 2C8 entre sí. Como era de esperarse, a pesar de la similitud en su secuencia, las pequeñas diferencias cambian la estructura del sitio activo, dando como consecuencia que los aminoácidos del sitio activo tengan distinta distribución espacial e interactúen de manera diferente con sus respectivos sustratos. No obstante, se puede apreciar que también existen aminoácidos que tienen una clara relevancia en la actividad de los CYPs de esta subfamilia; 476, 366 y 100 son las posiciones de los aminoácidos que coinciden con la interacción del sustrato (tabla 2 en [133]). En la figura 12 se distingue como la posición que corresponde a I99 de CYP2C9 es un residuo no conservado en ninguno de los tres CYPs comparados de esta subfamilia, e interesantemente es la zona que marca el comienzo del asa B-C; este aminoácido puede ser el responsable de las diferencias estructurales en esta región. La superposición de estos tres CYPs nos permitió observar como a partir de este aminoácido la conformación tridimensional de estas enzimas es variable. Un efecto similar ocurre al final de la α -hélice F, donde existen diferencias considerables en su secuencia de aminoácidos y se crea un considerable cambio en la estructura de la cadena principal y en la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos consecutivos a estas variaciones. Las zonas del asa B-C y las α -hélices F y G son, como era de esperarse, las zonas de mayor variabilidad estructural (figura 13), y coincidentemente son en estas zonas, donde se encuentran grandes diferencias en las secuencias de CYP2C9 y CYP2C19 (figura 12).

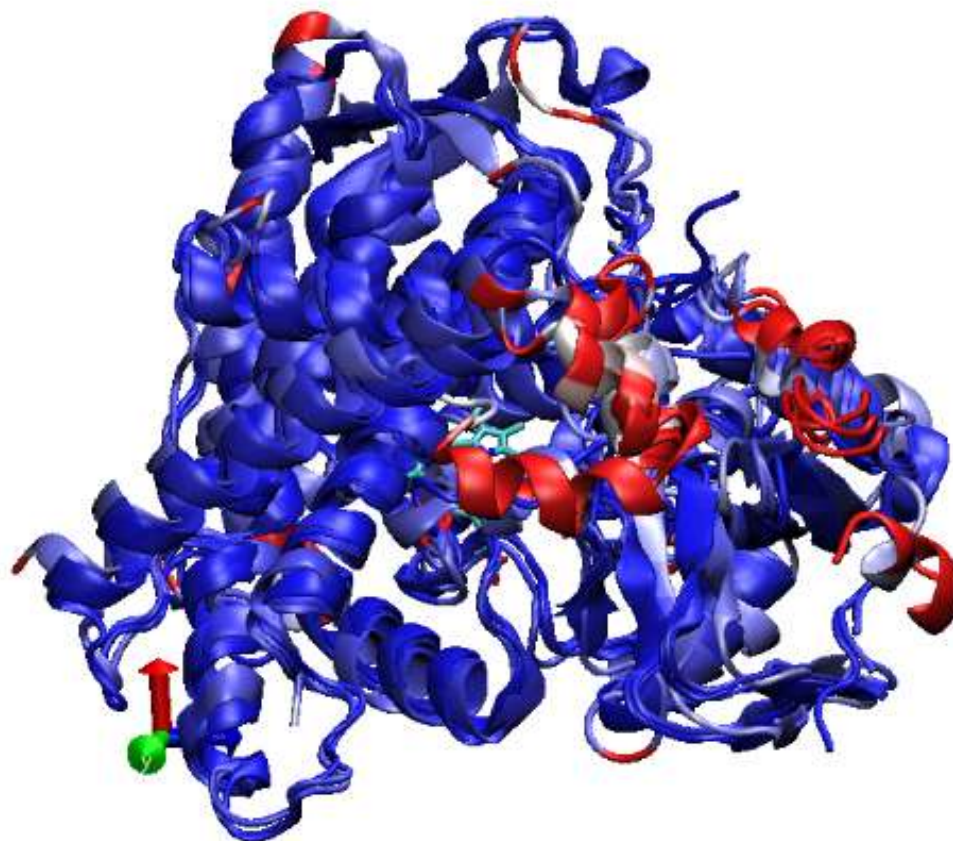


Figura 13. Superposición de los CYPs 2C9, 2C8, 2C19 y 3A4 y zonas de mayor desviación y diferencias en la estructura de las enzimas. En azul se muestran las zonas con menor RMSD y en rojo mayor RMSD.

La desviación de la raíz cuadrada de la media (RMSD, root mean square deviation) es una herramienta que permite hacer una comparación cuantitativa entre las estructuras de distintas proteínas. Mientras mayor sea la cantidad de RMSD, mayor será la diferencia en la estructura. El valor numérico representa que tan alejado en angstroms se encuentra un grupo de átomos entre sí. La figura 14 muestra una gráfica de las zonas que tienen mayor RMSD respecto a CYP2C9; en ella se aprecia como los cuatro CYPs varían su estructura en las zonas N-terminal y C-terminal (que son zonas de estructuras móviles y variables, ej. asas), y en los aminoácidos cercanos a los residuos 100 y 220, que representan las zonas correspondientes al asa B-C y a las α -hélices F y G. También se reconocen aminoácidos que en CYP2C9 forman parte del sitio activo y en CYP3A4 tienen gran desviación, por ejemplo la zona de F476 de CYP2C9 (figura 14).

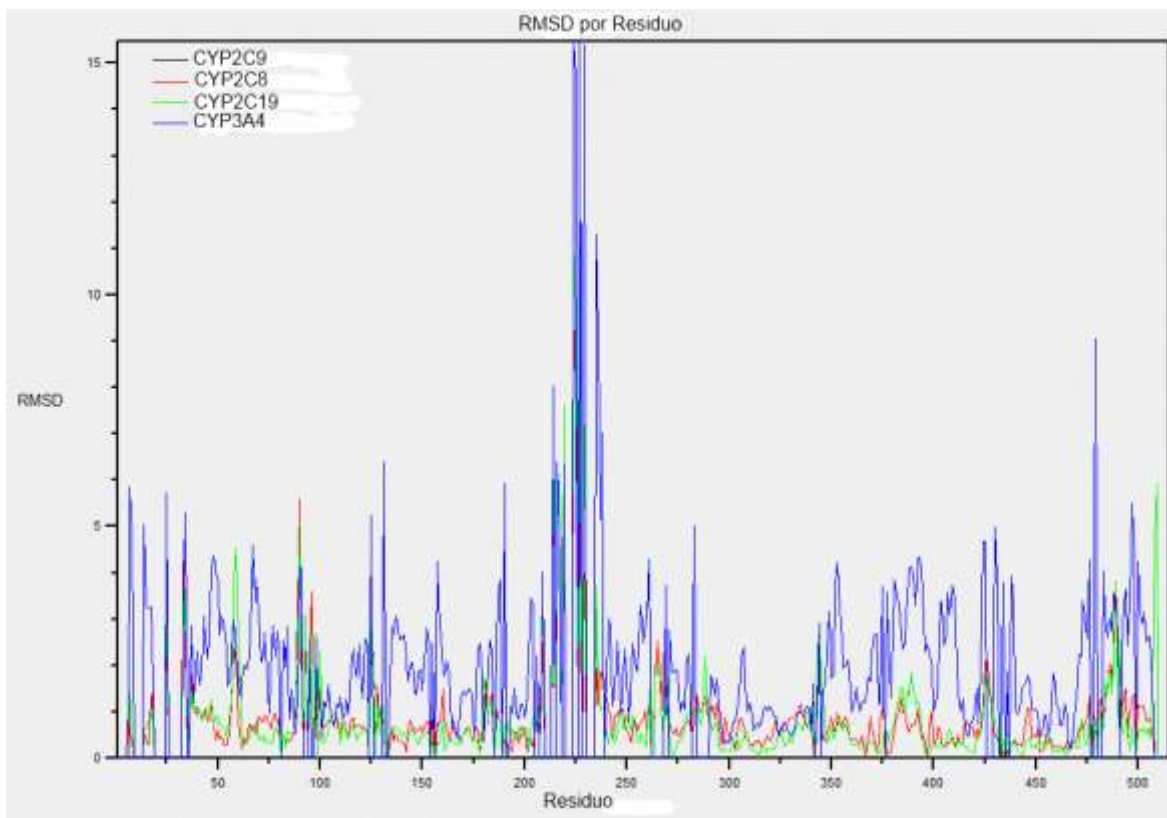


Figura 14. Grafico que representa la RMSD de las enzimas CYPs 3A4, 2C8 y 2C19 respecto a CYP2C9. La línea negra de CYP2C9 no se aprecia ya que su RMSD es 0.

Una comparación general cuantitativa de las diferencias estructurales entre los CYPs que metabolizan a PPC se resume en la tabla 8. CYP3A4 y CYP2C9 son las enzimas con mayores diferencias de RMSD en su estructura, lo cual es sorprendente si se considera la similitud en la actividad que tienen sobre PPC. El valor de RMSD de CYP2C9 es menor con respecto a CYP2C8 que respecto a CYP2C19 pese a la similitud en su secuencia (CYP2C19 es aproximadamente 14% más parecida a CYP2C9 que CYP2C8); este hecho es interesante si tomamos en cuenta que las mayores diferencias en la secuencia de aminoácidos entre CYP2C9 y CYP2C8 se hayan en los aminoácidos que conforman la cavidad del sitio activo y no en zonas estructurales a diferencia que CYP2C19. Comprueba que las pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos en zonas no relacionadas con su actividad metabólica generan grandes cambios en la estructura general de la proteína, y que estos cambios ocasionen a su vez diferencias importantes en su actividad biológica. No obstante, los aminoácidos que interactúan directamente con el sustrato en el sitio catalítico son cruciales para su función, selectividad y actividad. CYP2C8 y CYP2C19 son muy parecidas en estructura, pero metabolizan sustratos de características muy diferentes entre

sí, esto en parte es debido a que las mayores diferencias en sus secuencias se encuentran en el sitio activo [137, 133].

Tabla 8. Matriz comparativa del RMSD y de identidad de secuencia de los CYPs que hidroxila a PPC. Se comparan las RMSD que tienen las estructuras de los CYPs entre sí, en paréntesis se muestra su coeficiente de similitud en sus secuencias.

	CYP2C9	CYP2C19	CYP2C8	CYP3A4
CYP2C9	0	2.13 (0.914)	1.95 (0.779)	5.72 (0.177)
CYP2C19	2.13 (0.914)	0	0.89(0.781)	4.22(0.173)
CYP2C8	1.95 (0.779)	0.89(0.781)	0	4.18(0.177)
CYP3A4	5.72 (0.177)	4.22(0.173)	4.18(0.177)	0

Cuando se compara el sitio catalítico de estas tres enzimas contra CYP3A4 se puede apreciar que, a pesar de la poca similitud en la secuencia de aminoácidos y en la estructura tridimensional, el sitio catalítico de CYP2C9 tiene grandes similitudes con esta enzima. Aminoácidos de CYP3A4 y CYP2C9 que no se acoplan en un alineamiento múltiple de secuencias, se superponen en la conformación tridimensional que adquieren estas enzimas. En la figura 15 se puede observar como F215 de CYP3A4 ocupa el lugar de F476 de CYP2C9 y CYP2C19; en esta posición CYP2C8 tiene una isoleucina en lugar de la fenilalanina. CYP2C9, a diferencia de CYP2C19 y CYP2C8, posee una arginina en su sitio catalítico, situación semejante a CYP3A4; mientras que R108 de CYP2C9 se sitúa en el asa B-C, R212 de CYP3A4 se sitúa en una asa entre el α -hélice G y el α -hélice F, pero ambas interactúan directamente con el ligando y están reportadas como residuos importantes para la actividad y afinidad específica de dichas enzimas sobre sustratos aniónicos [45, 132]. En un intercambio de posiciones químicas, R108 de CYP2C9 esta remplazada por F241 de CYP3A4, R212 de CYP3A4 está ocupado el lugar de I205 de CYP2C9, y por si fuera poco, I120 de CYP3A4 está ocupando el lugar de F114 de CYP2C9, haciendo que la composición de aminoácidos de estas dos enzimas en el sitio activo sea muy semejantes; al menos, en la sustitución de estos cuatro aminoácidos solo cambian su colocación en el sitio activo (figura 15). CYP2C8 también posee una arginina que delimita la cavidad del sitio activo (R241), pero no se ha reportado como un residuo que interactúe directamente con sustratos de pequeño volumen en el sitio activo debido a su alejada posición del grupo hemo; no obstante, por medio de estudios de mutagénesis sitio dirigido se ha observado que este residuo le confiere preferencias a CYP2C8 sobre sustratos aniónicos como lo es PPC [138, 134]. El amplio volumen que posee la cavidad del sitio activo de CYP2C8 le

confiere a esta enzima la capacidad de hidroxilar sustratos mucho más grandes que PPC; además, R241 de CYP2C8 se sitúa en el α -hélice G muy cerca del asa B-C, haciendo imposible que un sustrato del tamaño de PPC interactúe con este residuo y al mismo tiempo se coloque en geometría de hidroxilación. R241 de CYP2C8 puede funcionar como un residuo que facilite el ingreso de sustratos aniónicos a su cavidad como una especie de “atractor”.

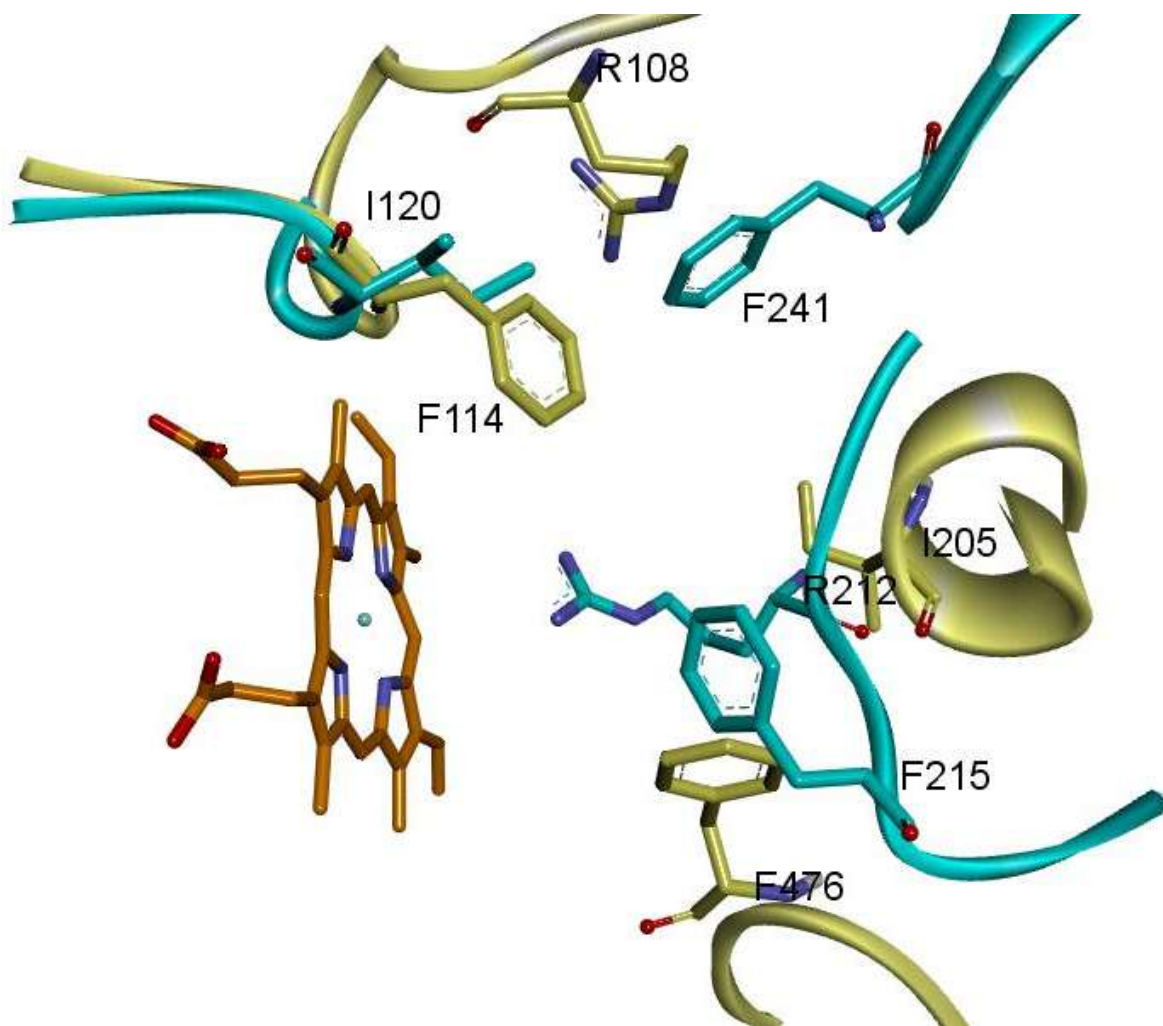


Figura 15. Disposición tridimensional de los aminoácidos intercambiados de CYP3A4 (azul) y CYP2C9 (amarillo) del sitio catalítico de estas enzimas. Se puede apreciar cómo, a pesar de no corresponder en un alineamiento de secuencias, la conformación tridimensional hacen que se superpongan estos residuos en el sitio activo de la enzima. Al fondo se muestra el grupo hemo (naranja) como referencia del sitio catalítico de ambos CYPs.

El remplazamiento de cadenas laterales en el sitio activo que existe entre CYP2C9 y CYP3A4 podría explicar la similitud en el metabolismo y preferencias que ambas enzimas tienen sobre PPC, así como la gran diferencia estructural que se mide en

su RMSD y de cómo estas diferencias no afecta las semejanzas en la actividad de ambas enzimas sobre PPC (figura 14, figura 13, tabla 8).

Los residuos que forman los límites del sitio activo o interactúan directamente con el sustrato se resumen y se comparan con los residuos que están ocupando dichas posiciones en los cuatro CYPs capaces de metabolizar a PPC (tabla 9). Los residuos que interactúan directamente con el sustrato en geometría de hidroxilación se han escrito con letras rojas, los residuos en segundo orden de importancia que bordean el sitio activo se han escrito con letras verdes, y los residuos que se escribieron en negro son aquellos que no se ha encontrado que tengan directa interacción con el sustrato pero ocupan el lugar de un residuo escrito en verde o rojo en otro CYP. Como ya se ha reportado la mayor parte de las diferencias en las secuencias entre CYP2C9 y CYP2C19 respecto a CYP2C8 se encuentran en los aminoácidos cercanos y que forman parte del sitio activo [133]. Estas diferencias en la secuencia de aminoácidos, ubicadas tan puntualmente en la región del sitio activo, podrían explicar las disimiles preferencias de la regio-selectividad que CYP2C8 y CYP2C9 tienen en la bio-transformación de PPC. Interesantemente, CYP2C8 tiene preferencias sobre sustratos aniónicos de gran tamaño con grupos formadores de puentes de hidrogeno; curiosamente, el 50% de los residuos que conforman el asa B-C son polares (tabla 7). Por otra parte el sitio catalítico de CYP3A4 es rico en fenilalaninas y contiene un residuo con carga positiva, muy similar al sitio de CYP2C9 que contiene 3 fenilalaninas, 4 aminoácidos alifáticos de cadena larga (isoleucina o leucina) y una arginina.

Tabla 9. Comparación de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico de los CYPs 2C9, 3A4, 2C19 y 2C8 de acuerdo a la superposición de las estructuras cristalográficas que comparten la misma posición tridimensional. **En rojo** se muestran los aminoácidos que interactúa directamente con el sustrato en el sitio activo, **en verde** los que forma parte de la cavidad y **en negro** los que se encuentran ocupando la posición de algún aminoácido en otra enzima CYP.

2C9	3A4	2C19	2C8
Ile 99	Pro 107	His 99	Asn 99
Phe 100	Phe 108	Phe 100	Ser 100
Leu 102	Gly 109	Leu 102	Ile 102
Asn 107	Phe 113	Asn 107	Thr 107
Arg 108	Phe 241	Arg 108	Lys 108
Val 113	Ser 119	Val 113	Ile 113
Phe 114	Ile 120	Phe 114	Ser 114
Leu 201	Leu 210	Leu 201	Phe 201
Asn 204	Leu 211	Asn 204	Asn 204
Ile 205	Arg 212	Ile 205	Phe 205
Leu 208	Phe 213	Val 208	Leu 208
Ser 209	Asp 214	Ser 209	Asn 209
Val 237	Thr 246	Leu 237	Val 237

Met 240	Leu 249	Met 240	Thr 240
Lys 241	Phe 86	Glu 241	Arg 241
Asp 293	Ile 301	Asp 293	Asp 293
Gly 296	Phe 304	Gly 296	Val 296
Ala 297	Ala 305	Ala 297	Ala 297
Glu 300	Glu 308	Glu 300	Glu 300
Thr 301	Thr 309	Thr 301	Thr 301
Thr 305	Val 313	Thr 305	Thr 305
Leu 361	Ile 369	Leu 361	Leu 361
Leu 362	Ala 370	Ile 362	Val 362
Thr 364	Arg 372	Thr 364	Thr 364
Leu 366	Glu 374	Leu 366	Val 366
Pro 367	R106	Pro 367	Pro 367
Phe 476	Phe 215	Phe 476	Ile 476
Ala 477	Leu 482	Ala 477	Val 477

En trabajos de mutagénesis sitio dirigidos se ha observado que la cara externa del α -hélice G ha sido reportada como una zona importante, al igual que el asa B-C, para el reconocimiento del sustrato; esta zona es parte del sitio de entrada la proteína y se ha reportado que para el caso en particular de CYP2C8 el residuo R241 está involucrado directamente en la afinidad y reconocimiento de la enzima a sustratos de tipo aniónicos. Esta posición es variable en los CYPs capaces de metabolizar a PPC [134]; en ella podemos encontrar a E241 en CYP2C19, que al ser un aminoácido con carga negativa a pH fisiológico puede influir de manera considerable en el rendimiento que esta enzima tiene sobre la bio-transformación de un sustrato aniónico a pH fisiológico como PPC; una repulsión causada por las cargas negativas del sustrato y de E241 puede provocar que el rendimiento de producción de PPC mediada por CYP2C19 sea mucho más bajo que el de CYP2C9, la cual posee una lisina (K241) en esta posición. F113 de CYP3A4 está ocupando el espacio tridimensional que en los otros tres CYPs corresponden al aminoácido 241; sin embargo, CYP 3A4 tiene también una arginina la zona que le corresponde al α -hélice G perfilándose en dirección opuesta al sitio catalítico (figura 16). Los aminoácidos ionizados positivamente en esta posición pueden facilitar el ingreso de sustratos aniónicos al sitio catalíticos de estos CYPs.

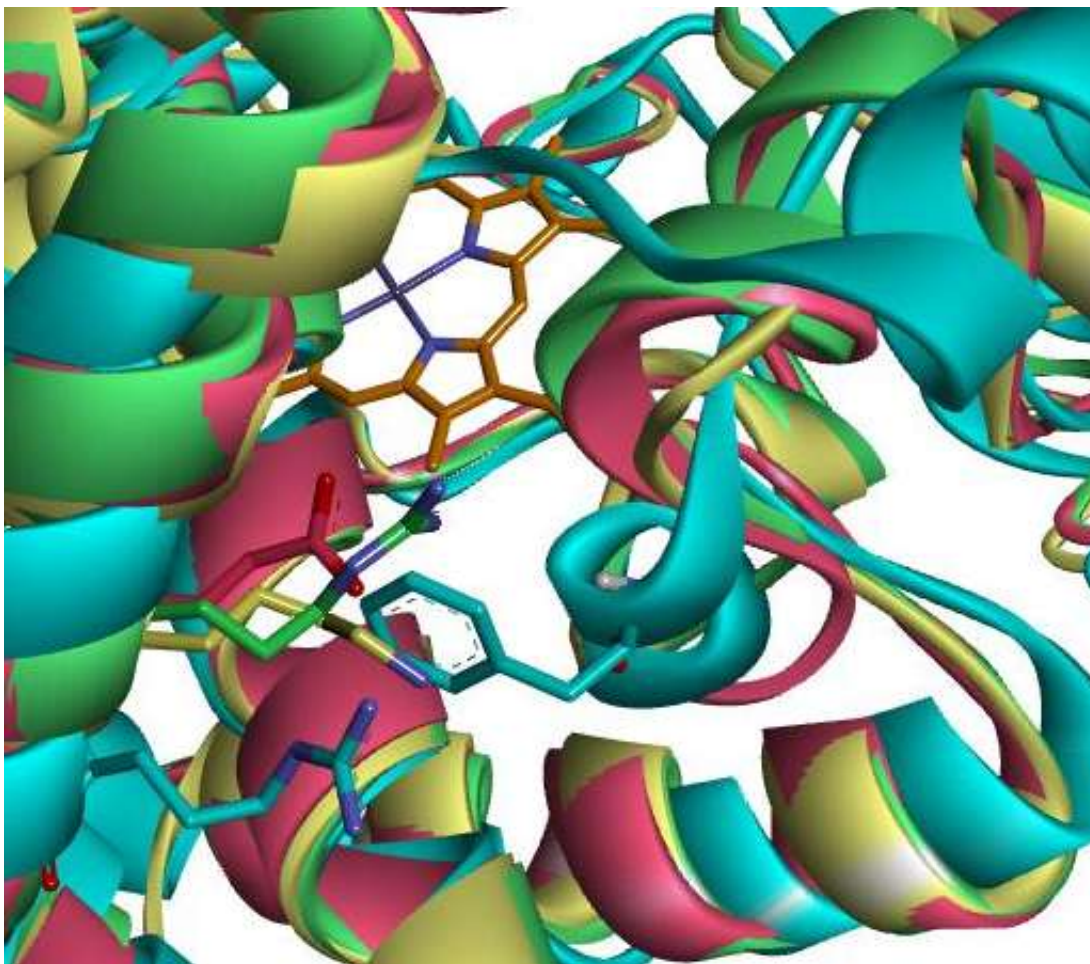


Figura 16. Aminoácidos de las enzimas **CYP2C9 (amarillo)**, **CYP3A4 (azul)**, **CYP2C19 (magenta)** y **CYP2C8 (verde)** correspondientes a posición de R241 de CYP2C8. Al fondo se observa al grupo hemo en color gris, mientras que los aminoácidos de las respectivas enzimas se ilustran del color de la enzima. Se puede apreciar como F113 de CYP3A4 está situada en la posición que corresponde a los aminoácidos de 241 de las otras enzimas mientras que R250 se orienta en dirección contraria al sitio catalítico.

4.1.5 El ajuste inducido en los complejos de citocromos p450 cristalizados

Teniendo en cuenta el modelo de ajuste inducido, los reportes que señalan a los CYPs 450 como enzimas con flexibilidad en su estructura y el método empleado para modelar el acoplamiento y regio-selectividad que estas enzimas tiene sobre su sustrato, se estudió la conformación que adquiere el sitio activo de la proteína tras el acoplamiento con su sustrato en distintas cristalizaciones reportadas en PDB. Para esto se realizó la superposición de distintos pares de CYPs en su forma apoenzimática y en complejo con su sustrato. Se buscaba cualquier reordenamiento en las cadenas laterales o algún cambio en la estructura de su cadena principal. Si los átomos de la cadena lateral del modelo de la apoenzima

se en localiza en el sitio que ocupa el ligando en el modelo del complejo, se puede interpretar como un reordenamiento conformacional entre la forma apoenzimática (forma no activa) y el complejo enzima-sustrato; en otras palabras, cualquier rearrreglo de la columna vertebral y de las cadenas laterales en el complejo enzima-sustrato respecto a la forma apoenzimática, puede interpretarse en términos del modelo de ajuste inducido. Se tuvo especial cuidado en la interpretación de estos resultados, debido a que muchos estudios cristalográficos usan estructuras más antiguas como plantillas para generar nuevos modelos de cristalización; lo que compromete la conformación estructural del modelo más reciente, generando una especie de sesgo en las posiciones de sus átomos (tabla 10).

Tabla 10. Comparación de la estructura de la forma apoenzimática y del complejo correspondiente de diferentes pares de CYPs.

Código PDB de la apoenzima (plantilla cristalográfica)	Código PDB del complejo (plantilla cristalográfica)	CYP y sustrato
2PG5 (1Z10)	2FDY (1Z10)	2A6 & 4,4'-dipiridil disulfuro
2PG5 (1Z10)	1Z10 (1PQ2)	2A6 & cumarina
1PQ2 (1N6B)	2NNI (1PQ2)	2C8 & montelukast
1PQ2 (1N6B)	2NNJ (1PQ2)	2C8 & felodipina
1TQN (NULL)	3UA1 (1TGN)	3A4 & bromoergocriptina
1TQN (NULL)	3NXU (1TQN)	3A4 & ritonavir

En la figura 17 se ilustra la superposición de los modelos cristalizados de la enzima CYP3A4 en su forma apoenzimática (código PDB 1TQN [132]) y en complejo con ritonavir (código PDB 3NXU [139]). Ritonavir es un sustrato natural de CYP3A4 [140, 141, 137]. El asa intermedia entre las α -hélices F y G que forma parte del sitio activo y está en interacción directa con el sustrato se ve desplazada hacia el exterior del sitio activo. El cambio más evidente está dado por la arginina 212 que en la forma de la apoenzima (1TQN) está orientada hacia el interior de la cavidad catalítica, mientras que en el complejo (3NXU) esta misma arginina se ve dramáticamente desplazada hacia el exterior dando mayor espacio para que el sustrato ritonavir de gran tamaño se acomode en el sitio activo de la enzima. Otras cadenas laterales del sitio activo como fenilalaninas también se ven desplazadas para darle lugar a ritonavir. Es importante mencionar que el cristal de CYP3A4 en

complejo con ritonavir (3NXU) utilizó como plantilla de cristalización a la forma apoenzimática (1TQN), estructura con la que se hizo la comparación.

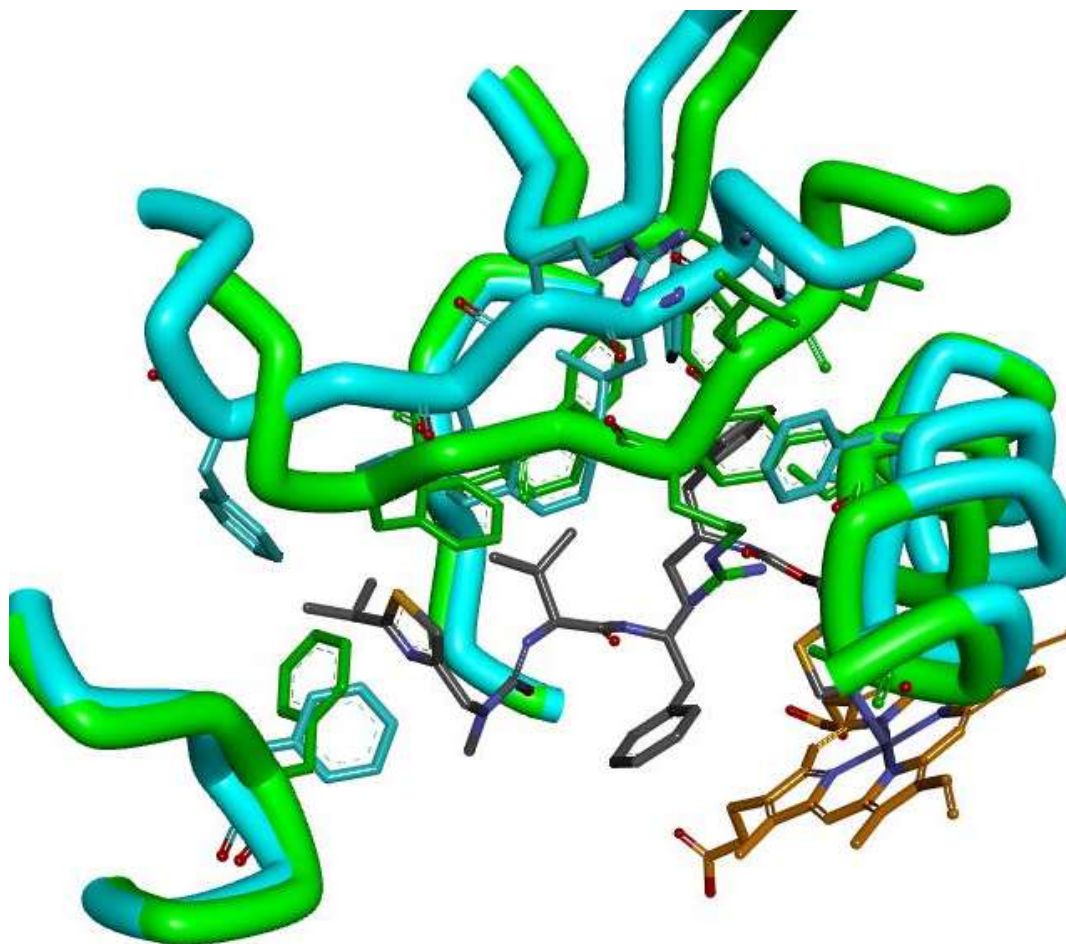


Figura 17. Superposición de las estructuras cristalizadas de CYP3A4 en la forma apoenzimática (verde, código PDB: 1TQN) y en complejo con ritonavir (azul, código PDB: 3NXU). Se aprecia un evidente reordenamiento en la conformación del complejo respecto la conformación de la apoenzima. Ritonavir (gris) y el grupo hemo (naranja) se muestran en la cavidad de la enzima.

En otras comparaciones, se esperaría que los complejos CYPs con un sustrato de tamaño similar al de ritonavir presentara el mismo tipo de reordenamiento en sus cadenas laterales como lo tuvo la pareja 1TQN y 3NXU; sin embargo, al comparar parejas como el complejo CYP2C8 y montelukast (código PDB 2NNI) [134] y su forma de apoenzima (código PDB 1PQ2) [138] no se encontró ningún reordenamiento especial ni en sus cadenas laterales ni en su cadena principal, permitiéndonos inferir que el empleo de 1PQ2 como plantilla para 2NNI fue crucial para el resultado de la cristalización, impidiendo observar el modelo de ajuste inducido en CYP2C8. De esta manera, el modelo de ajuste inducido no se alcanza a apreciar en todos los complejos CYPs cristalizados reportados en PDB.

4.2 ACERCAMIENTO POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR MANUAL: EVALUACIÓN DE LAS FUERZAS QUE RIGEN LA REGIO-SELECTIVIDAD

De la extensa revisión bibliográfica de los complejos de enzimas CYPs con sus respectivos sustratos en la base de datos de PDB, fueron seleccionados algunos modelos de acuerdo a su relevancia y semejanza con el modelo de estudio (CYP2C9-PPC) para ser usadas como modelos plantilla para el acoplamiento molecular manual. Los complejos CYP centrales utilizados para conocer y colocar los sustratos en geometría de hidroxilación en los sitios catalíticos fueron los complejos 3CPP y 1NOO [15, 16]. Las geometrías de estos complejos, distancias atómicas entre Fe-O-C, ángulo de Fe-O-C y ángulos de torsión entre el grupo hemo y ligandos acoplados, fueron medidas y sirvieron como criterios de evaluación y validación de las posiciones derivadas de los procesos acoplamiento molecular tanto manual como el sucesivo automatizado (figura 18) [44, 15, 16].

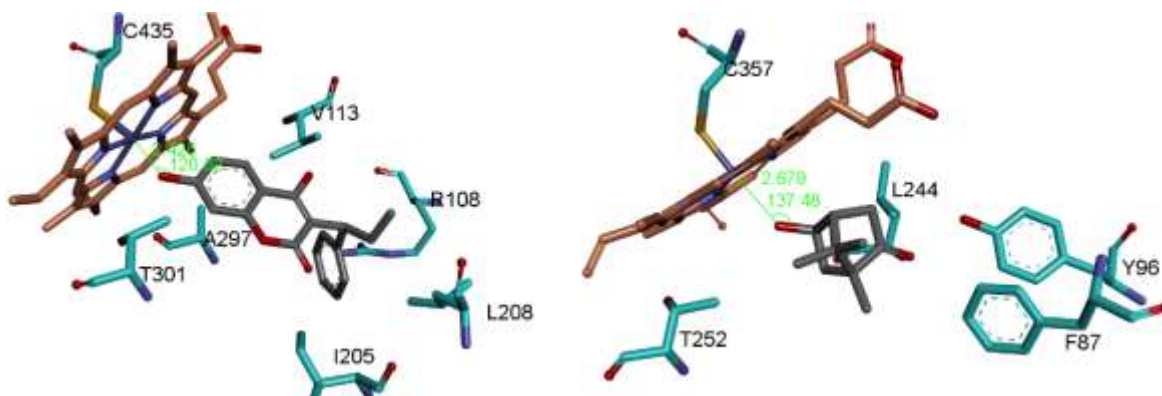


Figura 18. Comparación de la geometría entre las posiciones finales de 7-OH-PPC y el caso observado de complejos alcanfor hidroxilado. Código de colores: O rojo, azul N, C gris en ligando, C azul suave en aminoácidos, C naranja en el grupo hemo, Fe morado, S amarillo, verde distancias (2.4 Å, izquierda; 2.6 Å, derecha) y ángulos (120°, izquierda; 137°, derecha). Códigos PDB: 1NOO y 1R9O [15, 45].

Otro modelo seleccionado que destaca es la estructura de rayos x de CYP2A6 humano cristalizada con cumarina (código PDB 1Z10) [130]; esta estructura posee las geometrías de hidroxilación entre el sustrato, el hemo y su oxígeno como ligando distal, y al ser la cumarina base de la estructura de PPC, es perfecta para conocer y acoplar el cuerpo cumarínico de PPC en la cavidad de los CYPs. Debido a las características químicas y estructurales de la cumarina, en este complejo se observa una cavidad de CYP2A6 estrecha y con residuos hidrofóbicos y polares sin carga que interactúan con su sustrato; además, la geometría de hidroxilación de la cumarina concuerda con la reportada en trabajos previos. Esta posición permite que al superponer a la cumarina con el cuerpo cumarínico de PPC dentro de la cavidad de CYP2C9 no exista transposición del

ligando con algún residuo de este CYP; existe suficiente espacio en la cavidad de esta enzima para que ningún átomo de PPC choque con la proteína, permitiéndole conservar su geometría y posición de hidroxilación. En el cristal se puede apreciar como la cumarina está colocada para la hidroxilación que correspondiente al C-7 de PPC; por tal motivo, este complejo sirvió de plantilla para acoplar PPC para su hidroxilación en los SoM de C-6 y C-7 (figura 19). En el caso del este complejo CYP2A6-cumarina, una asparagina (N297), orienta a la cumarina y es señalada como la principal responsable en la regio-selectividad de la hidroxilación de este sustrato [130]. En CYP2C9 el aspartato 293 ocupa la posición de N297 de CYP2A6 y potencialmente también puede crear puentes de hidrogeno con el cuerpo cumarínico de PPC y ser indispensable para su regio selectividad. La visualización del complejo cristalizado con código PDB 1Z10 muestra una apreciable superposición del ligando cumarina con el radio atómico del ligando distal del grupo hemo.

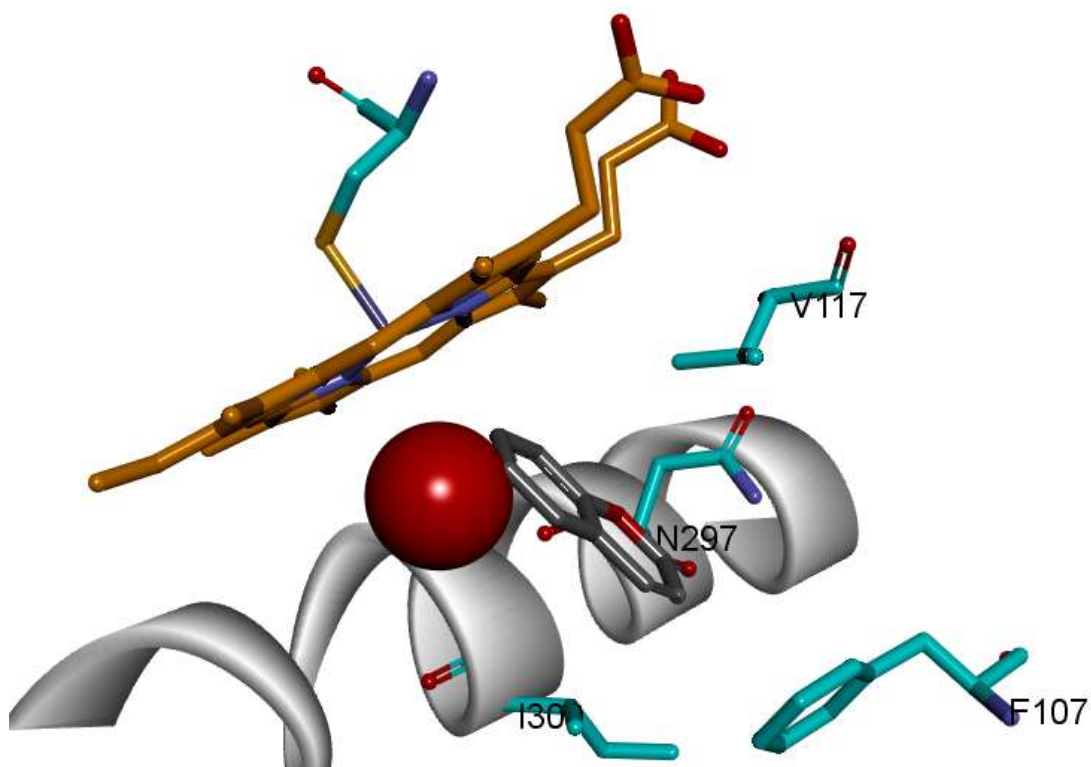


Figura 19. Posición de la cumarina (gris) en el sitio activo de CYP2A6 humano y los residuos (azul) que interactúan con este. Se muestra la α -hélice I al fondo de la figura junto con el grupo hemo (naranja) y su ligando distal (rojo) como referencia y para dar perspectiva del sitio activo.

El siguiente modelo notoriamente útil para el acoplamiento molecular manual fue el complejo del CYP de conejo 2B4 y clopidrogel (código PDB 3ME6) [131]. Como se mencionó anteriormente, la posición del anillo de cloro-fenilo y la geometría

global de clopidrogel sirve como una plantilla tridimensional para encontrar las posiciones de acoplamiento molecular para los SoMs 2' y 4' del anillo fenilo de PPC. En este caso en particular, se puede observar el intercambio energético relativo a las posibles flexibilidades conformacionales necesarios, tanto de la proteína como del sustrato, para el reconocimiento molecular entre los dos protagonistas del complejo. En específico en el trabajo de Gay de 2010 es posible reconocer como CYP2B4 es capaz de adaptar su sitio activo al volumen y forma de clopidrogel para el metabolismo de este sustrato, que es de tamaño pequeño, moviendo sólo un número limitado de cadenas laterales para permitir el posicionamiento del ligando en su cavidad [131]. Además, es sugerido que la reorientación del ligando es energéticamente favorecida por los cambios conformacionales de la proteína, accediendo a la unión con distintas moléculas de tamaño similar. El ajuste tanto de la conformación de la proteína como la orientación del ligando en el sitio activo, brinda a los CYPs la facultad de unirse a una gran variedad de moléculas, además de permitir que la unión sea energéticamente favorable (figura 20) [131]. El acoplamiento molecular de la conformación de PPC en CYP2C9 para la hidroxilación del carbono 4' hubiese sido complicado si no se hubiera utilizado como plantilla a 3ME6 debido a la forma particular de este ligando.

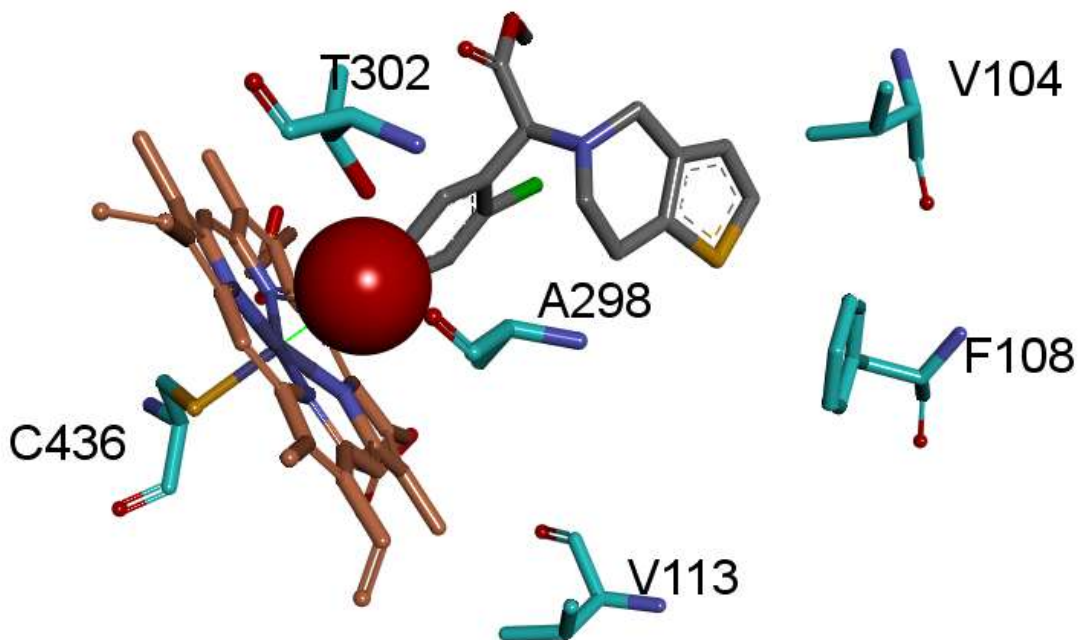


Figura 20. Visualización de la colocación de la forma enantiomérica (S) de clopidogrel (gris) en la geometría de hidroxilación en complejo con CYP2B4 de conejo que sirvió como plantilla 3D para orientar el ligando y el posicionamiento de los anillos de fenilo de PPC y WFN durante el acoplamiento manual. Se colocan como referencia algunos aminoácidos (azul) del sitio catalítico, al grupo hemo (naranja) y su ligando distal (rojo) como referencia de la cavidad de esta enzima.

En base a la literatura y análisis de estructuras CYPs cristalizadas, se determinaron las distancias que servirán para validar los modelos de los distintos complejos CYPs acoplados con los ligandos a estudio (tabla 11). Se debe hacer mención de que la geometría usada como referencia es aproximada con un margen de error no mayor a 0.3 Å en el caso de la distancia entre el grupo hemo y el átomo que sea el ligando distal (oxígeno de agua o del grupo OH agregado al M-PPC), 0.2 Å en la distancia entre el hierro del grupo hemo y el SoM del sustrato y 0.4 Å en la distancia del ligando distal y del sustrato.

Tabla 11. Resumen de distancias de la geometría de hidroxilación que se usaran como referencia para validar las posiciones de los ligandos resultantes del acoplamiento molecular.

Distancia	Ångström
Hemo Ligando Distal	2.5
Hemo Sustrato	5
Ligando Distal Sustrato	3

Debido a que S-WFN es hidroxilado en C-10 por CYP3A4 pero no por CYP2C9 [79], se procedió al acoplamiento molecular manual de la forma S-warfarina en ambas enzimas para observar como las diferencias en la conformación de las cadenas laterales y principales de estas de estas dos enzimas favorecen o impiden la producción del metabolito hidroxilado en C-10 en ambos casos. Al mismo tiempo, la colocación de PPC para la hidroxilación en C-10 fue estudiada para evaluar la posible producción del metabolito 10-OH-PPC por CYP2C9. El acoplamiento molecular manual debe permitirnos observar que WFN debe colocarse en CYP3A4 en una posición que permita la hidroxilación C-10, mientras que en CYP2C9 no debería existir dicha disposición. La superposición de ambas enzimas reveló las razones por las cuales existen diferencias en el metabolismo del sustrato S-WFN en estos CYPs. Mientras que para la hidroxilación en C-10 de S-WFN existe un impedimento estérico para por parte de CYP2C9, no la hay por parte de CYP3A4, esto es debido al mayor volumen en la cavidad que posee esta última, permitiendo que S-WFN se ubique en geometría para la hidroxilación de C-10. Es de resaltar que no se observó evidencia de impedimento estérico para la hidroxilación en C-10 en PPC por ninguna de las dos enzimas (figura 21). Se aprecia cómo las diferencias en la cadena lateral del carbono 9 de ambos anticoagulantes orales perjudican la hidroxilación C-10 en el caso de WFN pero no en el de PPC; al tener un mayor volumen y cierta polaridad en su grupo acetil de WFN, existe menor posibilidad de acomodo en la cavidad del CYP para su metabolismo en este SoM.

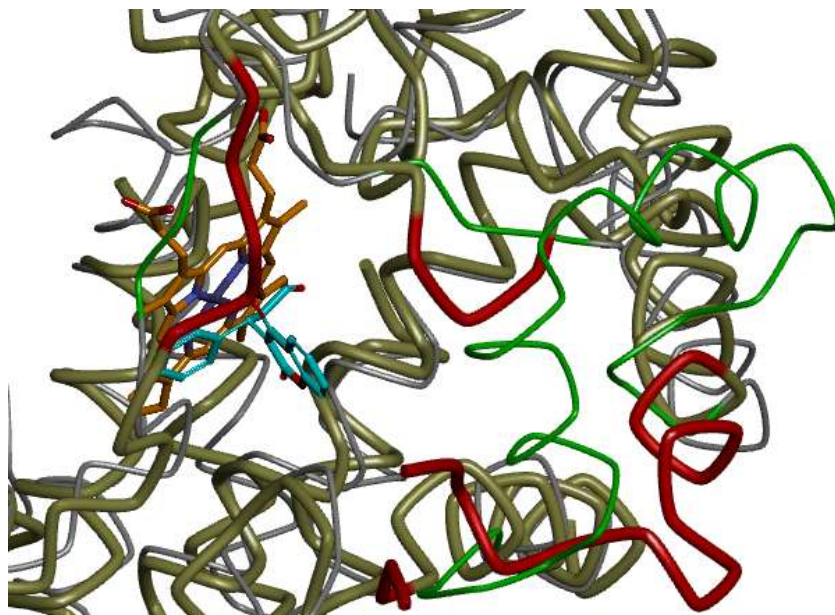


Figura 21. Superposición de CYP3A4 (plata) y CYP2C9 (oro). La cadena principal de color rojo representa los segmentos de CYP2C9 que reducen el sitio catalítico de la enzima; la cadena principal verde de CYP3A4 muestra todos los segmentos que corresponden al espacio que deja disponible el sitio catalítico reducido de CYP2C9. El hemo (naranja) en geometría con la posición C-10 de warfarina (azul) en para su hidroxilación, sólo accesible en el caso de CYP3A4. El impedimento estérico del CYP2C9 puede ser observado por la línea roja en estrecho contacto con la warfarina ligando amarilla.

CYP3A4 está conformado por 502 aminoácidos, mientras que CYP2C9 por 490. Esta diferencia de 12 aminoácidos, unido a la sustitución en algunas cadenas laterales pertenecientes al sitio activo provoca una disminución de volumen lo que impide que el grupo acetónil de S-WFN se coloque en posición de hidroxilación en CYP2C9, mientras que el grupo etilo, más pequeño en PPC, tiene el suficiente espacio para ser hidroxilado en C-10. En las líneas 5 y 6 de la figura 12 se pueden comparar y distinguir claramente cómo las cadenas laterales de 13 aminoácidos del sitio activo en la región que se encuentra consecutiva al α -hélice K en CYP2C9 y CYP3A4 difieren, generando dimensiones y estructuras muy diferentes en las cavidades de dichas enzimas. En particular, la zona que comprende a Ser365, Leu366, Pro367, His368 (figura 22) está reduciendo el volumen del sitio catalítico de CYP2C9 respecto a CYP3A4 alrededor de 5 x 15 Å mediante rotaciones de la cadena principal hacia el interior de la cavidad en dirección al grupo Fe del hemo. La rotación de la cadena lateral de Glu374 en CYP3A4, que ocupa el lugar de Leu366 en CYP2C9 crea el cambio más drástico tanto espacial como químico. Además de las rotaciones en la cadena principal, los cambios de residuos en Pro211, Ile213, Gln214, Val215 y Pro220 reducen el espacio mediante la formación de una única asa en la región intermedia de las α -hélices F y G en el

sitio catalítico de CYP2C9, esa que se encuentra desplazada y más próxima al grupo hemo en CYP3A4 y que le brinda mayor volumen al sitio catalítico de esta última enzima. Finalmente, Phe100, Pro101 y Leu102 causan cambios espaciales y en la cadena principal similar a los anteriormente descritos (figura 22). Al parecer, los residuos de prolina no se encuentran conservados a lo largo de los miembros de la súper-familia de las isoenzimas CYPs; por lo tanto representan las torsiones y las principales diferencias en la estructura tridimensional que adquiere la cadena principal en estas proteínas.

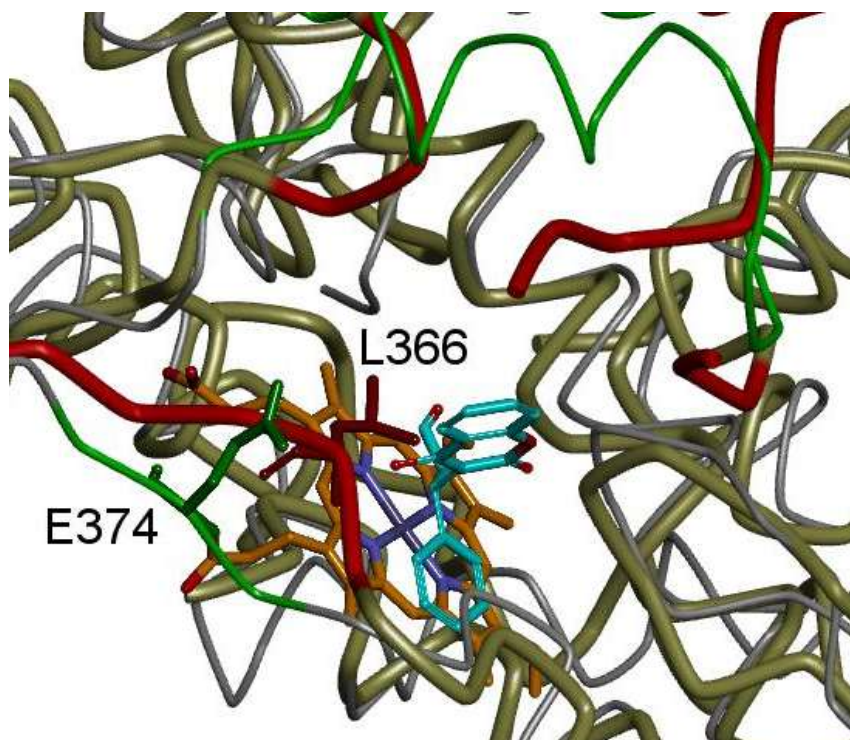


Figura 22. Superposición de CYP3A4 (plata) y CYP2C9 (oro). La cadena principal de color rojo representa los segmentos de CYP2C9 que reducen el sitio catalítico de la enzima; la cadena principal verde de CYP3A4 muestra todos los segmentos que corresponden al espacio que deja disponible el sitio catalítico reducido de CYP2C9. El hemo (naranja) en geometría con la posición C-10 de warfarina (azul) en para su hidroxilación, sólo accesible en el caso de CYP3A4. El impedimento estérico del CYP2C9 puede ser observado por la línea roja en estrecho contacto con la warfarina ligando amarilla. La figura muestra una vista girada 90 grados de la figura 21 en los ejes X y Z. La leucina 366 de CYP2C9 en rojo es el aminoácido responsable de la reducción principal del espacio, mientras que su análogo de glutamato 374 en CYP3A4, en color verde, junto con su columna vertebral se ve desplazado hacia el exterior lo que permite la ampliación de la cavidad sitio catalítico.

Es de resaltar que aunque la secuencia primaria de CYP3A4 y CYP2C9 compartan baja similitud, ambas metabolizan a WFN y PPC en patrones muy similares; mientras que CYP2C8, que comparte gran similitud en la secuencia con

CYP2C9, apenas es capaz de metabolizar a WFN con bajos rendimientos [79], no es capaz de metabolizar a R-PPC, y solo metaboliza a S-PPC en C4' [80]. Por tal motivo se esperarían mayores similitudes en secuencia y estructura entre CYP2C9 y CYP3A4; no solo en la química de su sitio activo, sino también en su estructura tridimensional (tabla 9, figura 15). En este sentido se puede deducir que los aminoácidos que conforman el sitio activo de un CYP tienen un papel crucial en los valores cuantitativos del rendimiento de producción de la bio-transformación de su sustrato, y que la estructura que adquieren estas enzimas permite, o no, el acceso al SoM de dicha hidroxilación. En otras palabras, la relación estructura actividad de los CYPs se resumen en si la estructura permite la hidroxilación en determinada posición del sustrato y la química del sitio activo dicta cuán eficiente es dicha hidroxilación.

Se procedió al acoplamiento molecular manual de todos los metabolitos de PPC y de las distintas conformaciones de PPC en forma de sustrato que dejan asequible a los respectivos carbonos a hidroxilarse a manera de simular las geometrías de hidroxilación (descritas en la introducción) y verificar la accesibilidad al oxígeno ligando distal de todos los SoMs reportados (figura 7, tabla 4). CYP2C9 humana es capaz de catalizar la formación de PPC de al menos cinco metabolitos monohidroxilados diferentes en las posiciones C-2', C-4', C-6, C-7, C-8 y un metabolito desconocido en su cadena alifática; siendo cuantitativamente la hidroxilación en el carbono 7 la de mayor relevancia metabólica, seguido por la hidroxilación del grupo aril en posición para- (C-4') [17, 80, 81]. Estos patrones de hidroxilación de PPC mediada por CYP2C9 tienen concordancia con casos similares de otros CYPs que tienen regio-selectividad a la porción aromática de diversos fármacos. Uno de estos casos se encuentra en la actividad que CYP2C5 de conejo tiene sobre diclofenaco; en el trabajo cristalográfico de Wester et al. de 2003 se reveló como la fracción diclorofenil interactúa de manera directa con el Fe del grupo hemo con los extremos en los carbonos 3' y 4' situados a 4.4 y 4.7 respectivamente del Fe para producir la porción para-hidroxi-diclorofenil semejando a la regio-selectividad que CYP2C9 tendría sobre los C-6 y C-7 de PPC [48]. El mismo patrón para la hidroxilación de un grupo aromático en la posición para- se observa en las cristalizaciones de CYP2A6 acomplejado con cumarina y de CYP2C9 con flurbiprofeno [45, 130]. Siguiendo estos patrones, fueron fácilmente modeladas las conformaciones en el sitio activo del sustrato PPC para la hidroxilación del grupo aromático en el carbono en posición para-; en parte, esto también fue debido a que existe suficiente espacio en el sitio activo de CYP2C9 (figuras 23 y 24). El efecto estérico parece ser un factor determinante en las preferencias que CYP2C9 tiene en la producción de los metabolitos de PPC. Al mismo tiempo, la conformación del complejo que es capaz de hidroxilar a C-7 puede ser la misma que permita la hidroxilación de C-6.

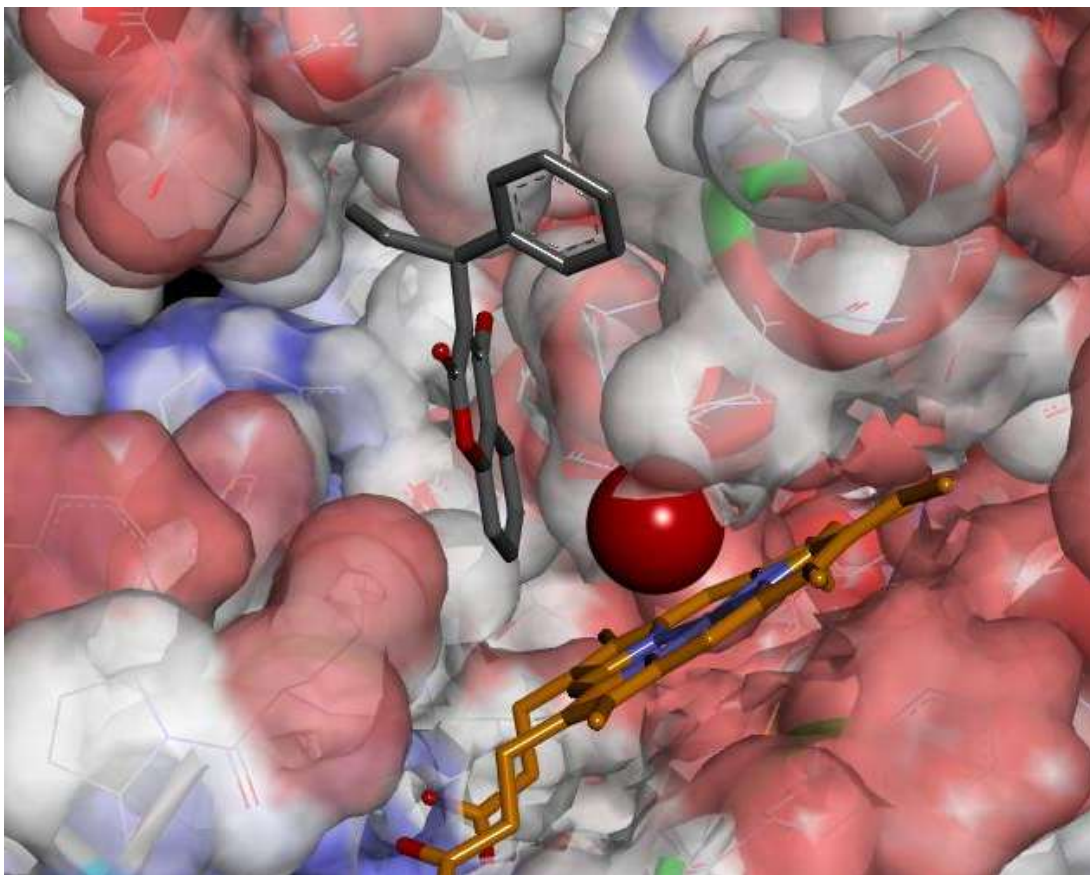


Figura 23. Acoplamiento molecular manual de PPC (gris) en la cavidad de CYP2C9 humano después de la eliminación de los flurbiprofeno ligando cristalizado. La accesibilidad de la posición de los SoMs 6, 7 e incluso 8 con respecto al átomo de oxígeno ligando distal (rojo) del grupo hemo (naranja) que permite para la hidroxilación del grupo arilo se hace evidente. El código de colores de la superficie de la cavidad es: azul (hidrofílico), blanco (neutro) y rojo (lipofílica).

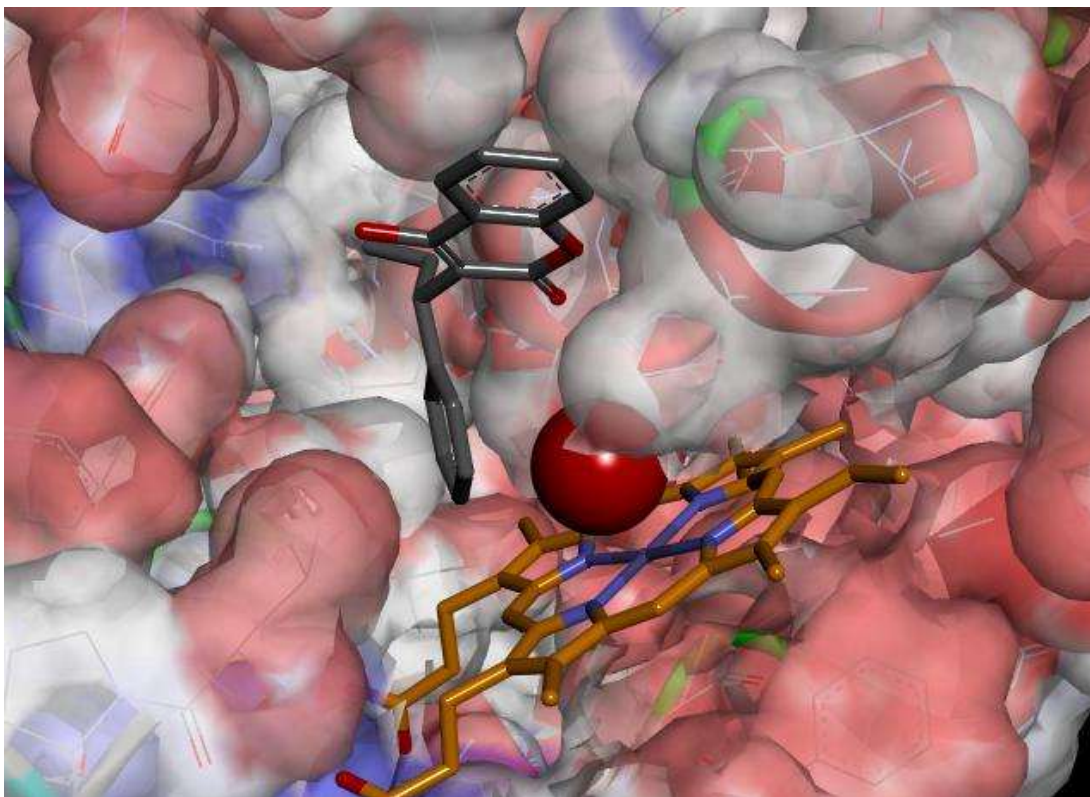


Figura 24. Acoplamiento molecular manual de PPC (gris) en la cavidad de CYP2C9 humano después de la eliminación de los flurbiprofeno ligando cristalizado. La accesibilidad de las posiciones meta- y para-fenilo (SoMs 3' y 4') con respecto al átomo de oxígeno ligando distal (rojo) del grupo hemo (naranja) que permite para la hidroxilación del grupo arilo se hace evidente. El código de colores de la superficie de la cavidad es: azul (hidrofílico), blanco (neutro) y rojo (lipofílica).

La parte más voluminosa de PPC es el cuerpo cumarínico, el ángulo que forma con el grupo aril, la forma de "V" del sitio catalítico de CYP2C9 y la proximidad que tiene el asa B-C al grupo hemo hace suponer que existe un margen estrecho para posicionar a este fármaco en geometría para la hidroxilación de C-4' en esta cavidad tan estrecha; no obstante, aún existe suficiente espacio en esta cavidad paralela al α -hélice I, para que no exista contacto directo entre algún aminoácido de la enzima con el sustrato, lo que ocasiona que haya más de una posición aceptable para la hidroxilación en C-4'. No se aprecia una clara preferencia sobre alguna posición específica que permita la hidroxilación de este SoM. El acoplamiento manual control de esta posición permite dilucidar una de las razones por la cual CYP2C9 no es capaz de hidroxilar en C-4' a S-WFN; la posición de Ile205, que contribuye de en demasía a la forma en "V" de la cavidad de CYP2C9, y crea un efecto repulsivo sobre el radical polar acetilo de S-WFN, ocasionando que la colocación para la hidroxilación de este SoM sea improbable; mientras que para PPC, con un radical etilo menos voluminoso, Ile205 no restringe lo suficiente

el espacio haciendo posible más de una posición de acoplamiento molecular enzima-sustrato para la producción de 4'-OH-PPC (figura 24).

Asombrosamente, el acoplamiento molecular manual dilucidó una conformación en la que se permitiría la hidroxilación de PPC en los otros sitios reportados en el trabajo de Kammerer en 2005 [81]. Una sola conformación muestran accesibles los SoM de C-2' y C-10 sin que exista alguna restricción estérica por parte de algún aminoácido del sitio catalítico de la enzima. En esta posición los átomos de carbono 2' y 10 se encuentran a la misma distancia del oxígeno ligando distal del hierro. Como existe rotación en el diedro formado por los carbonos 10, 9, 3 y 4 de PPC, el grupo etilo y arilo podrían encontrarse invertidos en un giro de 180° sin que esto cambiase significativamente sus geometrías de hidroxilación. De esta posición, la hidroxilación se realizaría con el grupo con el cual se es más afín; en este caso, el grupo arilo, a causa del sistema de electrones π atraería con más frecuencia la hidroxilación hacia este grupo, tal y como se demuestra por las cantidades de estos dos posibles metabolitos registradas en sangre de pacientes en el trabajo de Kammerer 2005 (figura 25) [81]. En esta posición, el cuerpo cumarínico apunta e interacciona con las fenilalaninas del sitio activo F476, F114 y F100; la leucina 366 se encuentra en interacción directa con el anillo aromático y la alanina 297 del α -hélice I interactúa y le concede suficiente espacio para la colocación del grupo etilo en el sitio activo. Se resalta que este acercamiento manual permite observar una única posición para las dos SoMs descubiertos recientemente en el trabajo de 2005 [81]; sin embargo, no es un resultado concluyente ya que no se toman en cuenta los términos de intercambio energético y afinidades electrostáticas que tenga el ligando con la enzima y únicamente se mide la posibilidad de acceso por el efecto estérico y volumen de la cavidad.

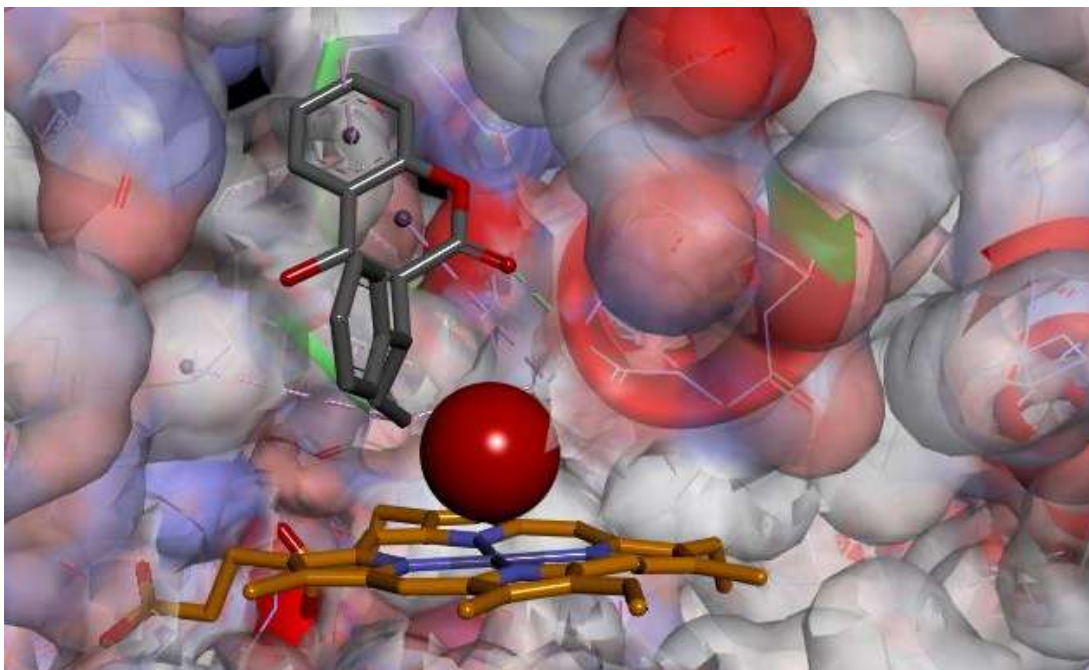


Figura 25. Acoplamiento molecular manual de PPC (gris) en la cavidad de CYP2C9 humano después de la eliminación de los flurbiprofeno ligando cristalizado. La accesibilidad de la posición orto-fenilo (SoMs 2') y carbono 10 con respecto al átomo de oxígeno ligando distal (rojo) del grupo hemo (naranja) que permite para la hidroxilación tanto del grupo arilo como del grupo etilo se hace evidente. El código de colores de la superficie de la cavidad es: azul (hidrofílico), blanco (neutro) y rojo (lipofílica).

Lamentablemente, por medio de este enfoque fue más complicado modelar la posición para el metabolito en C-9, debido a que el α -hélice I de la enzima disminuye el espacio para que el carbono quiral sea accesible al Fe del grupo prostético. El α -hélice F, y en especial la Ile 205 impiden que PPC se coloque en geometría de hidroxilación para el metabolismo en C-9. Una posición hipotética de PPC en la que se permita esta hidroxilación tendría que remover a I205 del sitio activo; la posición para el metabolismo de C-9 sobrepone al cuerpo cumarínico de PPC con este aminoácido. Por si solo este SoM (C-9) se encuentra inaccesible debido a las ramificaciones de esta molécula que crean obstáculos para su metabolización (figura 26). Esta parte del estudio aporta evidencia significativa para la dilucidación de la identidad del metabolito sin identificación en [81]. El efecto estérico es el primer criterio de exclusión para determinar si un metabolito mediado por cierto CYP es capaz de producirse. En este caso, no se observó ninguna evidencia clara de poderse llevar a cabo actividad metabólica sobre el carbono 9 de PPC; mientras que la posición que permite la hidroxilación de C-10, átomo más accesible que su contraparte quiral, puede ser la misma que la que permita la hidroxilación en C-2'.

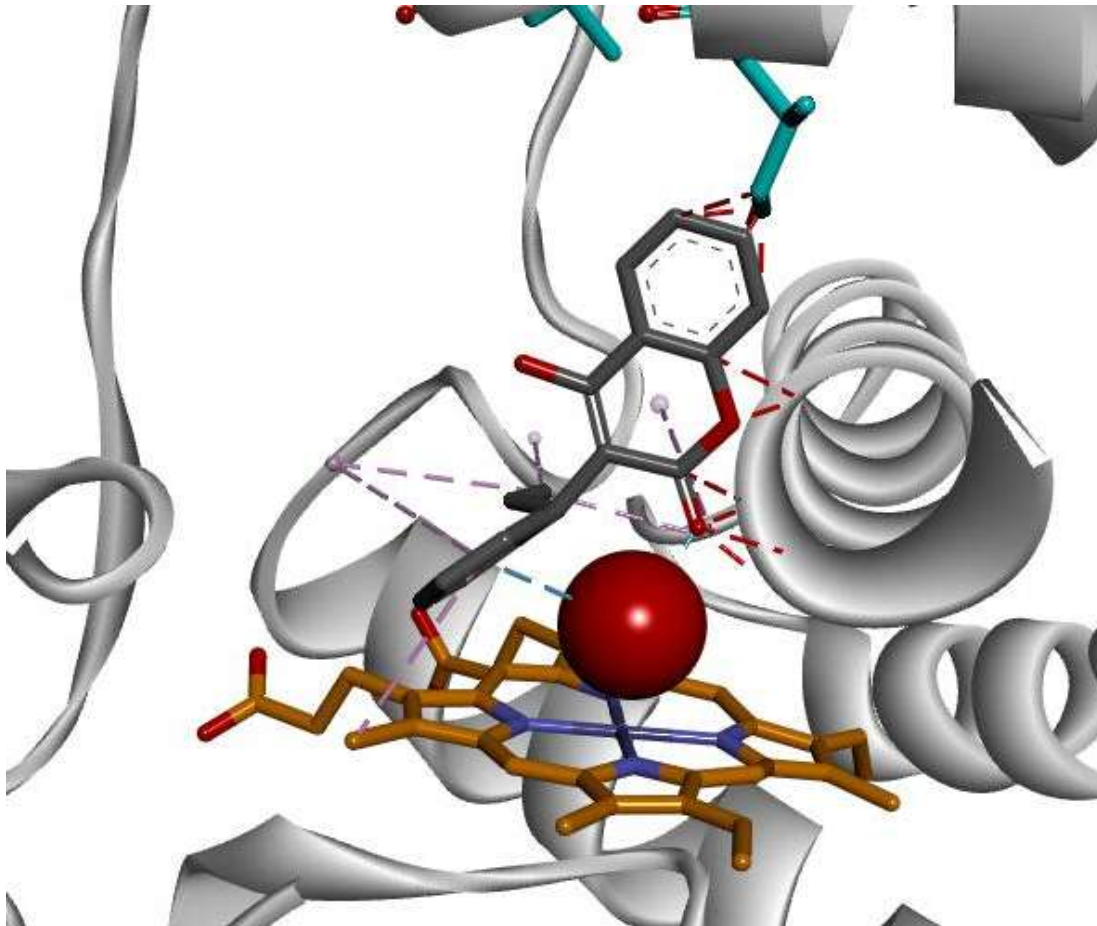


Figura 26. Acoplamiento molecular manual de PPC (gris) en la cavidad de CYP2C9 humano. El carbono quiral (C-9) de PPC permanece inaccesible con respecto al átomo de oxígeno ligando distal (rojo) del grupo hemo (naranja) a causa del estrecho tamaño del sitio activo de CYP2C9. La proteína se representa en su forma esquemática de la estructura secundaria de la en color blanco. Se aprecia como I205 (azul) impide el acercamiento del ligando para la hidroxilación del carbono quiral del sustrato.

En el caso del acoplamiento manual de los metabolitos de PPC, se observó que existen condiciones estéricas favorables para que se lleve a cabo su acoplamiento en el sitio catalítico (figura 27). La condición para decidir si un metabolito es viable o no, es que se logre situar el oxígeno del grupo hidroxilo adicionado a una distancia de aproximadamente 2.5 Å del Fe del grupo hemo sin que otro átomo perteneciente al ligando se superponga con algún átomo de la enzima. En este sentido, el enlace covalente que se forma entre el carbono de PPC y el oxígeno ligando distal del hierro crea suficiente espacio para un acoplamiento manual sin mayores dificultades de todos los metabolitos puestos a prueba en este estudio (incluyendo 9-OH-PPC); esto es debido a la ganancia de al menos 1.5 Å de espacio creado al llevarse a cabo la bio-transformación del sustrato al metabolito.

Si para el acoplamiento molecular del sustrato en el sitio activo había espacio, esta ganancia de 1.5 Å deja disponible aún más espacio para el acoplamiento del ligando en forma de metabolito. Incluso el metabolito 9-OH-PPC era estéricamente viable. Esto hace inferir que es cuestión de Å para que la producción de un metabolito de PPC sea viable, o no, si es mediado por CYP2C9.

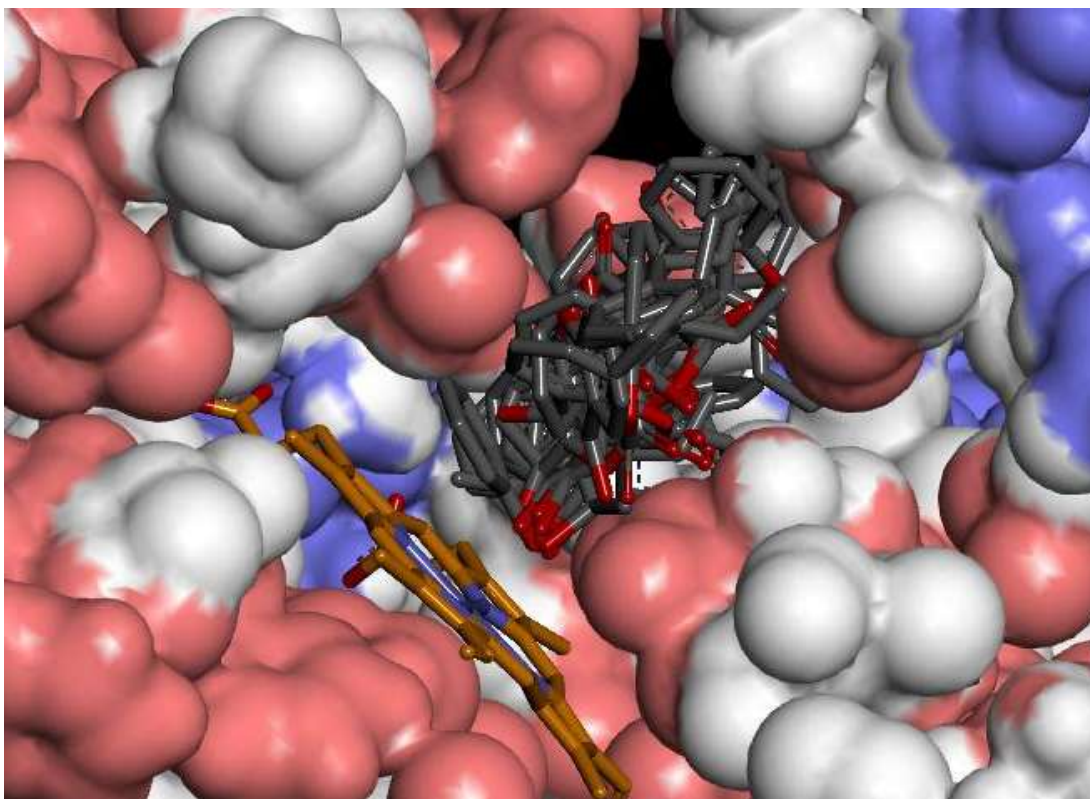


Figura 27. Superposición de los metabolitos de PPC (gris) en el sitio catalítico de CYP2C9 humano después de la eliminación de los flurbiprofeno ligando cristalizado. Se evidencia la permisividad de la cavidad de esta enzima para que se sitúen los Ms de PPC. Se coloca el grupo hemo (naranja) como referencia de la cavidad catalítica de la enzima. Código de colores de la superficie de la cavidad es: azul (hidrofílico), blanco (neutro) y rojo (lipofílica).

4.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR, REFINAMIENTO DE POSICIONES Y CÁLCULO DE ENERGÍAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-PROTEÍNA

Después del acercamiento por acoplamiento molecular manual, se procedió a la etapa 6 de la figura 9. Las posiciones de los ligandos mejor colocados en la etapa del acoplamiento manual fueron utilizadas como archivos de entrada para el acoplamiento molecular asistido con el programa AutoDock 4.2 (AD4) [115]. Como se ha explicado en la sección de material y métodos, este programa cuenta con un algoritmo de búsqueda de conformaciones especializado y cálculo de energías de interacción proteína-ligando, lo cual permite un acoplamiento molecular más

sistematizado. A manera de control, se efectuó el acoplamiento molecular y cálculo del complejo CYP2C9 con el ligando flurbiprofeno con dicho programa. Se obtuvieron tres agrupaciones de conformaciones de flurbiprofeno en los resultados, las primeras dos clasificadas según su mínimo energético de interacción, se encontraban en posición de hidroxilación para el carbono en posición para- del anillo distal de este fármaco (figura 28). Este resultado de AD4 está en concomitancia con los datos reportados en literatura y el cristal reportado en PDB [45]. El tercer grupo, con una energía de interacción mayor al de los grupos 1 y 2, se encontraba de manera paralela a la α -hélice I y en una conformación donde es difícil determinar que carbono es susceptible de hidroxilación.

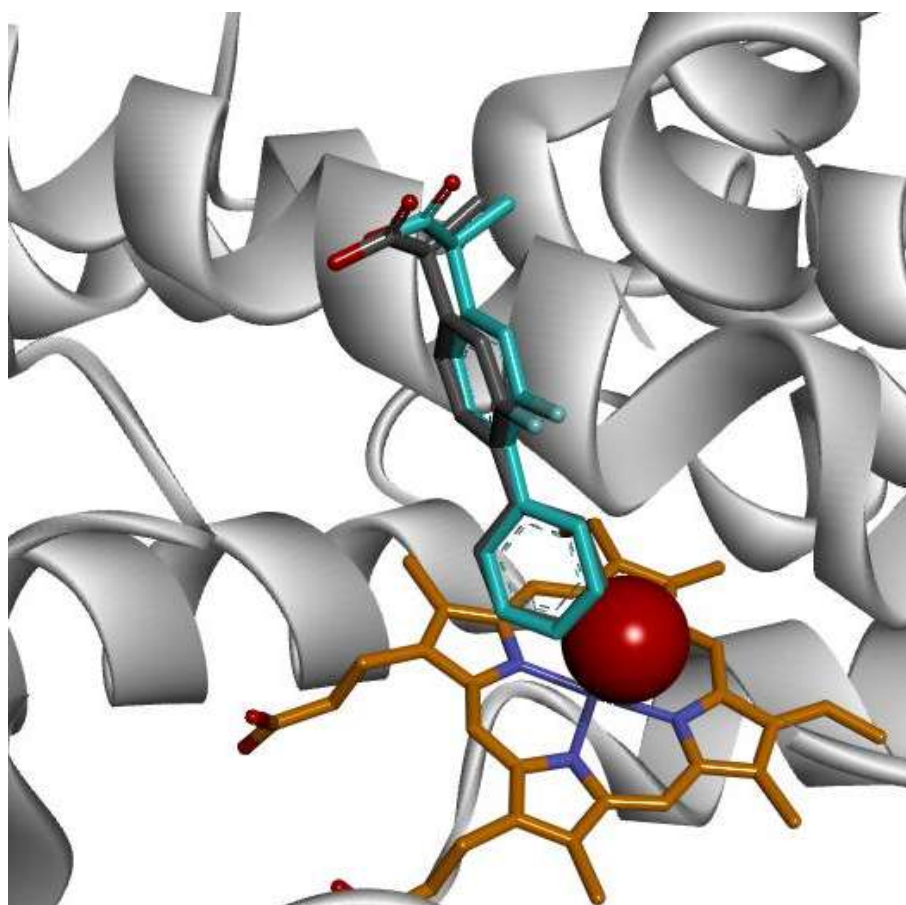


Figura 28. Superposición del flurbiprofeno (gris) en complejo con CYP2C9 del trabajo de cristalización con código PDB 1R90 y la conformación de flurbiprofeno (azul suave) en el grupo 1 resultante del acoplamiento molecular asistido. Se escogió como mejor resultado esta conformación de flurbiprofeno por su baja energía de interacción y por mantener la geometría de hidroxilación reportada en la literatura. La proteína se representa en su forma esquemática de la estructura secundaria de la en color blanco y el grupo hemo (naranja) con su ligando distal (rojo) se colocan como referencia del sitio catalítico de la enzima.

El resultado anterior brinda la confianza de que el método de búsqueda y cálculo de acoplamiento molecular realizado con el programa AD4 está correctamente realizado y muestra los lineamientos que se deben buscar para hallar las mejores conformaciones de los ligandos como resultado.

Se conoce que CYP2C9 es capaz de metabolizar a la forma S- de WFN (SWF) y debido a que en complejo reportado entre ambos componentes no muestra a la warfarina en geometría de hidroxilación [68], se procedió al acoplamiento molecular con AD4 de SWF con CYP2C9, también a manera de control. Se obtuvieron las conformaciones esperadas reportadas para dicho complejo; en la agrupación 2 se encontraron aquellas en donde la hidroxilación está dirigida a los carbonos 7 y 6 de SWF. El hecho de que se hayan encontrado en la agrupación clasificada segunda las conformaciones para la metabolización de estos SoM permite considerar que la predicción de estas posiciones fue correcta [10] (figura 29). La posición de WFN se encuentra con su cuerpo cumarínico en una posición similar a la que la cumarina se encuentra en 1Z10 [130], su grupo fenil interactúa con aminoácidos alifáticos, tres fenilalaninas y una leucina, mientras esta posición permite que el grupo acetil interaccione con aminoácidos de la α -hélice I. Curiosamente al igual que el trabajo de cristalización de cumarina con CYP2A6, si se visualiza al ligando distal del grupo hemo con su radio completo atómico, se puede apreciar como existe una superposición del ligando distal con el cuerpo cumarínico de los ligandos en ambos casos (figuras 19 y 29)

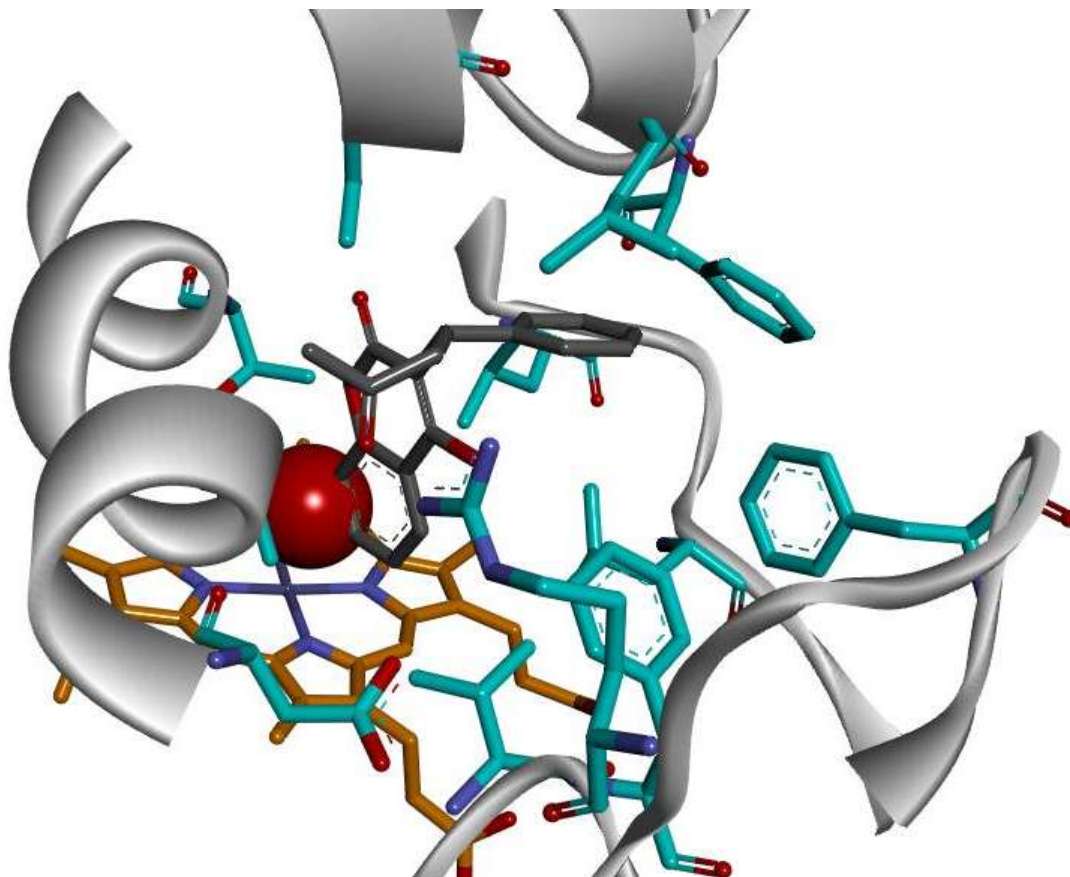


Figura 29. Conformación resultante del ajuste molecular de WFN (gris) que permite la hidroxilación en C-6 y C-7. Se observa como el cuerpo cumarínico se coloca de manera similar a la cumarina de 1Z10 (figura 19) [130]. El grupo hemo (naranja), su ligando distal (rojo) y algunos aminoácidos de la enzima (azul) que interactúan con el ligando se muestran como referencia de la cavidad de la enzima.

Un resultado trascendental fue el encontrado en la agrupación número 1 (la de mayor afinidad proteína-ligando) donde se descubrió una conformación de SWF en el sitio catalítico de CYP2C9 que permite la hidroxilación en la posición orto- del radical fenil de SWF (C-2') (figura 30); posición que en PPC se descubrió su metabolito de manera experimental en 2005 [81]. Existen condiciones estéricas favorables que hacen accesible al C-2' del sustrato WFN, incluso con su cadena radical acetil con un volumen mayor que el radical etil de PPC. El cuerpo cumarínico de WFN se encuentra en la parte más amplia de la cavidad de CYP2C9 en interacción directa con L366, mientras que el grupo fenil y acetil se encuentran en paralelo a la α -hélice I. El fenil de WFN es capaz en esta posición de interactuar con V113 y con A297, lo que brinda mayor estabilidad a esta posición.

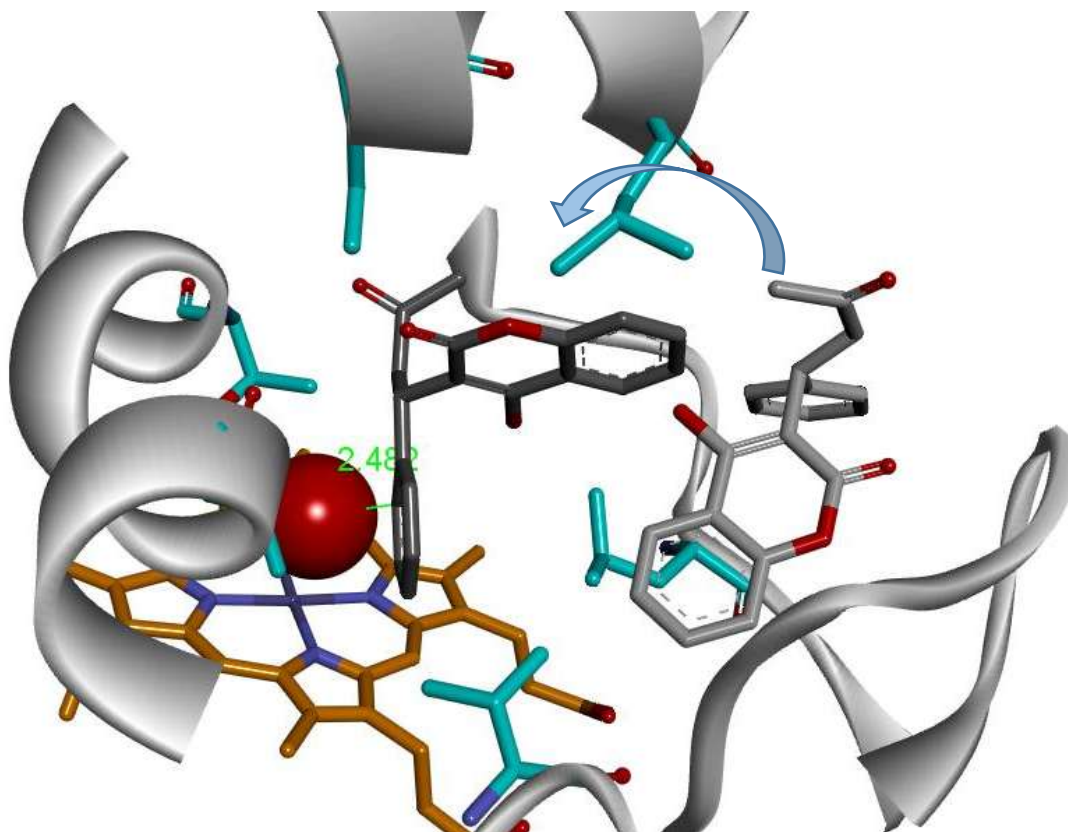


Figura 30. Conformación resultante del ajuste molecular de WFN (gris) que permite la hidroxilación en C-2'. Se muestra en superposición de la posición de WFN (gris claro) en el trabajo de cristalización de 1OG5 [68] que fue usada como posición inicial en el trabajo de DM que describe las trayectorias de hidroxilación de los SoMs de WFN mediados por CYP2C9 [49], una flecha muestra la trayectoria hipotética que tendría que seguir para poderse colocar en la conformación de C-2'; se puede apreciar como L208 se encuentra en el camino de dicha trayectoria; se muestran otros aminoácidos (azul), el grupo hemo (naranja) y su liando distal (rojo) como referencia de la cavidad de CYP2C9. En verde se muestra la distancia (2.48 Å) entre el C-2' de WFN respecto al oxígeno ligando distal.

Para warfarina no se ha reportado, mediante trabajos experimentales, ni predicciones en trabajos *in-silico*, la producción del metabolito 2'-OH-PPC mediado por ningún CYP humano. Un acercamiento computacional sobre los patrones de hidroxilación que CYP2C9 tiene sobre SWF fue realizado por Seifert et al. en 2009 [49]; en él, mediante dinámica molecular (DM), se midió la frecuencia que los posibles SoMs se colocaban en geometría de hidroxilación, como se preveía los carbonos 6 y 7 fueron los únicos carbonos que adquirieron una distancia carbono-oxígeno ligando distal en la que se podría haber llevado a cabo la metabolización, siendo el carbono 7 el átomo que con mayor frecuencia se colocaba en posición para su actividad. Interesantemente, explican que, si bien el complejo adquirió conformaciones para la hidroxilación de C-4', nunca se colocó lo

suficientemente cerca del oxígeno distal debido a que la cavidad de CYP2C9 es muy estrecha para que este carbono pudiera colocarse en posición de metabolización. DM es una técnica computacional que está en función del tiempo, y por tanto las posiciones de los átomos dependen de las antiguas posiciones. La posición inicial de SWF en este trabajo fue la posición que se encuentra reportado en el cristal 1OG5 [68]; como consecuencia, no se encontró la trayectoria que permitiera colocar a warfarina desde su posición inicial para su hidroxilación en C-4' y mucho menos en C-2'. Sin embargo, estos resultados no denotan que exista condiciones estéricas desfavorables para que el C-2' sea accesible de un ataque electrofílico por parte del oxígeno coordinado con el hierro del hemo. Los resultados de obtenidos de AD4 empleando mecánica molecular (MM) revelan que la conformación para la hidroxilación de C-2' en SWF mediada por CYP2C9 si es asequible al no depender de estados anteriores ni de trayectorias. La trayectoria de la posición inicial a la posición de C-2' puede verse interrumpida por la repulsión que existe entre L208 y/o I205 y el grupo acetil de SWF (figura 30). Para PPC si se ha reportado su metabolito en C-4', la causa puede ser su grupo etilo más corto que el acetilo de WFN y con afinidad por grupos alifáticos como leucina e isoleucina que se encuentran en una trayectoria hipotética del sitio de entrada a la conformación para el metabolismo de C-2'; además, es probable que si la conformación para la hidroxilación de C-2' mediada por CYP2C9 es accesible para WFN, también lo sea para el sustrato de menor tamaño, y por tanto con menores impedimentos estéricos como lo es PPC, y que además se ha demostrado la hidroxilación en un carbono del grupo fenil C-4'. Este resultado permite inferir que no existe impedimento estérico para que PPC, siendo más pequeño, sea metabolizado en la posición C-2'.

Habiendo realizado las pruebas control con los complejos de CYP2C9 con flurbiprofeno y warfarina se procedió a efectuar el acoplamiento molecular automatizado con AD4 de los ligandos a estudio (tabla 4) en CYP2C9 para correlacionar su afinidad de unión con los rendimientos experimentales. Los resultados del acoplamiento molecular fueron agrupados según un RMSD de 2.5 Å, y las soluciones clasificadas con menor energía de interacción y con la geometría de hidroxilación reportada por trabajos experimentales [15, 16, 8, 45, 48] fueron seleccionadas para el refinamiento energético con el campo de fuerza que contempla los parámetros de las interacciones metálicas. YetiFF es una extensión del campo de fuerza AMBER e incluye los parámetros del átomo de hierro del grupo hemo [119]. El refinamiento de los complejos obtenidos en el acoplamiento molecular con el campo de fuerza Yeti obedece a la precisión de cálculo y el efecto que la interacción metálica pueda tener en los complejos CYPs; de este modo, las posiciones finales se modelaron con una configuración octaédrica natural del hierro en estado férrico y los resultados del refinamiento

(cálculo y posiciones finales) reportados de dicha conformación son obtenidos de Yeti. Se llevó a cabo la inspección y evaluación de las posiciones del ligando en la cavidad de CYP2C9 derivadas del refinamiento. La geometría de las conformaciones resultantes del acoplamiento molecular aceptados se compararon con las geometrías de unión observados en las estructuras cristalinas del complejo de alcanfor hidroxilado con el CYP450 bacteriano [16].

Mediante el acoplamiento molecular asistido con el programa AD4 se lograron predecir las posiciones de todos los metabolitos de PPC y de los sustratos para la hidroxilación de todos los SoMs, incluyendo una posición que deja accesible al C-9. Se destaca que las posiciones para la hidroxilación de C-2' y C-10 son posiciones diferentes según los resultados de AD4, y no la misma posición según se podría inferir por los resultados del acoplamiento molecular automatizado de WFN en CYP2C9 y del acoplamiento molecular manual de PPC en CYP2C9. Las posiciones resultantes del acoplamiento molecular asistido con AD4 fueron refinadas con el uso del campo de fuerza Yeti que contempla los parámetros de hierro. Los cálculos con el programa Yeti de las energías de interacción proteína-ligando de PPC en geometría de hidroxilación para cada SoM a estudio y sus respectivos metabolitos en la cavidad de CYP2C9 fueron comparados con los datos de hidroxilación reportados en el trabajo de Kammerer [81] con el fin de investigar si existe alguna correlación entre la producción de dichos metabolitos y la afinidad (energía de interacción de las posiciones acoplados) que cada metabolito hidroxilado tiene hacia CYP2C9 (tabla 12). Al analizar las energías de interacción de las posiciones finales se puede observar que no existe una clara correlación entre los metabolitos con mejores rendimientos de producción y sus energías de interacción proteína-ligando, de hecho no se aprecia evidencia entre las preferencias (R, S) sobre alguno de los dos enantiómeros.

Tabla 12. Correlación entre cantidades presentes en sangre de pacientes [81] y energía de interacción con CYP2C9 de PPC pre- y post-catálisis. Sí/No se refiere a si la posición de PPC posee la geometría de hidroxilación (tabla 10). El círculo de la primera columna señala el metabolito etiquetado en figura 2 de [81]. En el caso del círculo 3, se desconoce la identidad del metabolito etiquetado, por tal motivo se muestran los resultados de las 4 formas de 10-OH-PPC (9R10S, 9R10S, 9S10R, 9S10S) y de las dos formas de 9-OH-PPC (R, S).

Figura 2 en [81]			
Accesibilidad (Sí / No) al sitio catalítico de hidroxilación y energía de interacción CYP-PPC. * Refleja un cambio en la accesibilidad del SoM			
Círculo / id del SoM (enantiómero)	ABC relativa estimada	PPC en geometría de hidroxilación (sí/no) con o sin grupo hidroxil en el SoM	Energía de interacción [Kcal / mol] por Yeti
1 / C4' (9S)	10 %	+OH Sí. –OH Sí.	+OH E = -254 –OH E = - 224
1 / C4' (9R)	20 %	+OH Sí –OH Sí.	+OH E = -252 –OH E = - 225
2 / C2' (9S)	90 %	+OH No. –OH (cambia a C4')*	+OH E = -228* –OH E = -214
2 / C2' (9R)	5 %	+OH No. –OH (cambia a C4')*	+OH E = -229* –OH E = -222
3 / C9 (9S)	1 %	+OH No. –OH No.	+OH E = -122* –OH E = -211*
3 / C9 (9R)	5 %	+OH No. –OH (cambia a C10)	+OH E = -238* –OH E = -220*
3 / C10 (9R,10S)	1 %	+OH No. –OH Sí.	+OH E = -238* –OH E = -224
3 / C10 (9R,10R)	5 %	+OH No. –OH Sí.	+OH E = -254* –OH E = -218
3 / C10 (9S,10S)	1 %	+OH No. –OH Sí.	+OH E = -235* –OH E = -225
3 / C10 (9S,10R)	5 %	+OH No. –OH (cambia a C10-S)	+OH E = -232* –OH E = -226
4 / C6 (9S)	20 %	+OH Sí. –OH Sí.	+OH E = -253 –OH E = -221
4 / C6 (9R)	5	+OH Sí. –OH Sí.	+OH E = -255 –OH E = -214
5 / C7 (9S)	20 %	+OH Sí. –OH Sí.	+OH E = -255 –OH E = -224
5 / C7 (9R)	100 %	+OH Sí. –OH Sí.	+OH E = -254 –OH E = -218

La accesibilidad para la hidroxilación de los principales SoMs se predijo con éxito a excepción del círculo 2, que después del refinamiento con el campo de fuerza Yeti, la posición predicha para el carbono 2' por AD4 no logro conservar su geometría de hidroxilación y fue cambiada dejando expuesto y en geometría valida al carbono 4', y la posición para C-9 que tampoco logro mantener geometrías de hidroxilación válidas. En el caso de los metabolitos 2', 10 y 9-OH-PPC, el proceso

de refinamiento con Yeti cambio su geometría de hidroxilación (tabla 12) haciendo que el oxígeno del grupo hidroxil no esté a distancia de coordinación con el hierro del grupo hemo; sin embargo, esto no es concluyente para decir que no es posible la producción ya que los respectivos PPC en forma de sustratos en posición de hidroxilación de C-10 aún conservan distancia de metabolización y los de C-2' cambia su posición para hacer accesible a C-4', la forma R-PPC para el metabolito de C-9 cambio su posición para dejar accesible a C-10 y su contra parte S-PPC se alejó del ligando distal. Esto puede ser fácilmente atribuido al efecto estérico provocado por la acción que el modelo de ajuste inducido puede tener en la rotación de las cadenas laterales o desplazamiento de la cadena principal de la enzima, el cual no puede ser modelado adecuadamente por el procedimiento de acoplamiento molecular con mecánica molecular que mantiene a la proteína rígida. Se identificaron zonas susceptibles a cambios tanto en su cadena lateral como en su cadena principal que facilitarían la hidroxilación en C-2': F100 y V113 se encuentran a los extremos del asa B-C, una zona de alta variabilidad conformacional debido al tipo de estructura secundaria que posee; L365 es otro residuo que podría permitir la hidroxilación en dicho SoM y se encuentra ubicada en un asa entre el α -hélice K y la hoja- β 1-4; por último, acercar tanto la cadena lateral como la principal al sitio activo de la enzima de F746 permitiría que 2'-OH-PPC mantuviera la geometría de hidroxilación y que su respectivo sustrato no cambiara a una posición que metabolice a C-4'.

Existe una cantidad limitada de plantillas con múltiples conformaciones/isoformas de CYP2C9, es decir, no hay a disposición una estructura cristalográfica con el adecuado escenario en forma de ajuste inducido que permita el correcto acoplamiento de todos los metabolitos de PPC reportados en la literatura, y esto da lugar a la mencionada identificación de F100, V113, L365 y F476 como aminoácidos que permitirían el adecuado modelado de los complejos faltantes.

Basándose en las energías de interacción resultantes del refinamiento con YetiFF, y la posición del ligando respecto al hierro y su ligando distal, se efectuaron algunas conclusiones (tabla 13) a fin de evaluar la regio-selectividad de CYP2C9 sobre PPC.

Tabla 13. Listado de átomos que se encuentran accesible para la hidroxilación por CYP2C9. El número del círculo en la primera columna se refiere al metabolito etiquetado mencionado en [81].

Círculo	Conclusión para la posición del número de C de PPC
1	La posición del anillo para- fenil (C-4') es accesible, pero su energía de interacción no refleja su rendimiento de producción.
2	La posición del anillo orto- fenil (C-2') es accesible. (Figuras 26 y 31).
3	El centro quiral (C-9) no se encontró accesible.
4	La posición C-6 es accesible, pero su energía de interacción no refleja su rendimiento de producción.
5	La posición C-7 es accesible, pero su energía de interacción no refleja su rendimiento de producción.

Respecto a la duda sobre la identidad del metabolito de PPC etiquetado como círculo 3 en [81] el cual no pudo ser asignado a alguna estructura, la posición para la hidroxilación de C-9 es claramente improbable debido la congestión espacial causada por las ramificaciones que PPC contiene en su estructura y a los resultados del proceso de refinamiento (tabla 12). Una prueba más de que los requerimientos estéricos son fundamentales para la regio-selectividad e improbabilidad de que el círculo 3 se tratase de 9-OH-PPC es que C-10 en S-WFN es hidroxilada por CYP3A4 [84] y no existe algún reporte de que el carbono quiral en estos anticoagulantes orales sea hidroxilado. El respectivo SoM C-10 de PPC se encontró que era la agrupación más poblada de la solución del acoplamiento molecular asistido por AD4. La probabilidad es más fuerte de que el pico que falta por ser identificado etiquetado como círculo 3 en la figura 2 y publicado en [81] constituye realmente que a la posición C-10 en PPC. Un acercamiento más profundo en los datos de la espectrometría de masas experimentales en [81] revelan que al ser mejor hidroxiladas las formas S-PPC siempre se encontraban en menor cantidad en la sangre de pacientes que sus contrapartes R-PPC, y que en los cromatogramas de la monitorización de reacción seleccionada obtenida en dicho experimento las formas R-PPC de los metabolitos aparecían antes que sus enantiómeros S-PPC con excepción de los picos relativos al círculo 3, donde se marca con menor ABC y, al contrario de los demás metabolitos, el primer pico en orden de aparición fue la forma S-PPC. Este hecho es interesante, ya que una hidroxilación en C-10 de PPC invierte la quiralidad con respecto a C-9; es decir, el sustrato S-PPC al ser hidroxilado en C-10 se transforma en 10-OH-R-PPC.

Se realizó el procedimiento descrito con anterioridad de acoplamiento molecular y posterior refinamiento y cálculo de la energía de interacción con el programa Yeti

de las posiciones de los tres principales metabolitos de PPC (4', 6 y 7-OH-PPC) con las 4 enzimas CYPs (CYP2C9, 2C8, 2C19 y 3A4) que son capaces de hidroxilarlo [80]; esto con el propósito de evaluar las diferencias en la capacidad metabólica de estas enzimas sobre este sustrato. La tabla 14 muestra el análisis comparativo y resultados del cálculo de energía de interacción entre cada una de las cuatro enzimas los 3 metabolitos principales de PPC y sus respectivas posiciones en forma de sustrato, así como una resta numérica entre la energía de interacción de la forma de metabolito y la forma de sustrato.

Tabla 14. Comparación de la energía de interacción de los tres principales metabolitos de PPC tanto en su forma S- como R- y sus respectivas posiciones en formas de sustrato con las cuatro enzimas CYPs que son capaces de metabolizarlo.

Ligando	3A4			2C19			2C9			2C8		
	M	S	M-S	M	S	M-S	M	S	M-S	M	S	M-S
PPCs4	-302	-253	-49	-278	-227	-51	-254	-224	-30	-275	-221	-54
PPCr4	-297	-250	-47	-273	-231	-41	-252	-225	-27	-272	-227	-45
PPCs6	-304	-250	-54	-273	-232	-41	-253	-221	-32	-276	-224	-53
PPCr6	-296	-252	-44	-274	-232	-42	-255	-214	-31	-276	-230	-46
PPCs7	-301	-247	-53	-275	-231	-44	-255	-224	-31	-275	-227	-48
PPCr7	-302	-251	-51	-275	-229	-46	-254	-218	-36	-274	-222	-52

Al igual que en la tabla 12, la tabla 14 muestra que ninguna de las enzimas CYPs tenga alguna preferencia energética sobre algún metabolito de PPC ni tampoco sobre alguna de las dos formas enantiomérica R- o S-, no llegando a poder correlacionar la energía de interacción con su rendimientos de producción reportados en trabajos experimentales [80]. Estos resultados no son extraños si se miran a profundidad las conformaciones de los complejos CYP-sustratos resultantes del refinamiento con YetiFF (véase suplementos para posiciones finales del refinamiento y tabla de rendimientos de producción medidos experimentalmente); en ellos se puede observar que los ligandos guardan gran similitud entre las posiciones que ocupan en el sitio activo, lo que resulta en una

energía de interacción muy parecida. Las diferencias entre la máxima y mínima energía de interacción observadas entre cada metabolito no son superiores a un siete kilocalorías sobre Mol. Los resultados obtenidos hacen notar que la energía de interacción entre la enzima CYP y su sustrato es relativamente constante independientemente de su posición en la cavidad siempre y cuando el sustrato se encuentre en coordenadas de metabolización; es decir, que las energías de interacción son similares entre cada uno de los metabolitos con la enzima CYP que está formando el complejo, y no se le puede adjudicar al factor energético a las preferencias y regio-selectividad de la actividad metabólica que tienen los CYPs 450. Sin embargo, si se realiza un análisis detenido de las energías de interacción reportadas en esta tabla 14, podremos observar que la diferencia entre la energía de interacción del ligando en forma de metabolito y en forma de sustrato es menor en la enzima con mejores rendimientos de producción de las cuatro enzimas, CYP2C9. Esto puede explicarse en términos sencillos, la afinidad relativa de la enzima con el ligando en forma de sustrato es alta y en su forma de metabolito es baja. Estos cambios energéticos en la afinidad del sitio activo de una enzima por su sustrato podrían verse traducidos en una expulsión más eficaz de la forma procesada del ligando, para permitir el acceso a una nueva molécula que va a ser hidroxilada, lo que dará como resultado mayor procesividad de la enzima sobre dicho sustrato y mejores rendimientos de producción. En cambio, una enzima que tiene una alta afinidad en su sitio activo por la forma procesada de su sustrato dificultará la expulsión del metabolito e se verá impedida la entrada a una nueva molécula al sitio activo de la enzima. Estos resultados explican como a pesar de la similitud en su secuencia y estructura, CYP2C9 es capaz de hidroxilar de manera dos o tres veces más eficientes a PPC que su familiar más cercana CYP2C19. La composición química del sitio activo tiene un papel crucial en la actividad metabólica de una enzima al permitir que la colocación del sustrato y expulsión del metabolito sea lo más eficientemente posible. Esta conclusión se debe tomar con cuidado, ya que probablemente solo refleja el comportamiento catalítico (véase suplementos, rendimiento de producción) de un grupo de CYPs sobre el mismo sustrato y no de un CYP sobre distintos sustratos.

Para investigar cómo las preferencias de regio-selectividad de los CYPs sobre los distintos metabolitos de PPC puede ser explicada mayormente por el efecto estérico y los grados de libertad que dicho SoM tenga para ubicarse en geometría de hidroxilación, se ha diseñado el siguiente experimento. Si el rendimiento de producción de determinado metabolito está relacionada con la facilidad, o probabilidad, de que el átomo de carbono sujeto a ser metabolizado sea accesible al oxígeno ligando distal del grupo hemo, significa que existe una mayor cantidad de posiciones del sustrato en el sitio activo donde se permite la actividad enzimática sobre dicho SoM; es decir, que debe haber mayor cantidad de

posiciones que permiten la producción de 7-OH-PPC, que las que permiten la producción de los otros metabolitos de PPC. Habiendo obtenido las posiciones de los metabolitos principales, refinadas con el programa Yeti, se hizo girar al ligando sobre el eje que forma el enlace carbono-oxígeno del sustrato y del grupo hidroxil añadido (figura 31). Se obtuvo una posición nueva del metabolito en el sitio activo cada 24° , dando un total de 15 posiciones nuevas por cada uno de los tres metabolitos principales, estas nuevas posiciones fueron sometidas a un nuevo refinamiento con el programa Yeti (tabla 14).

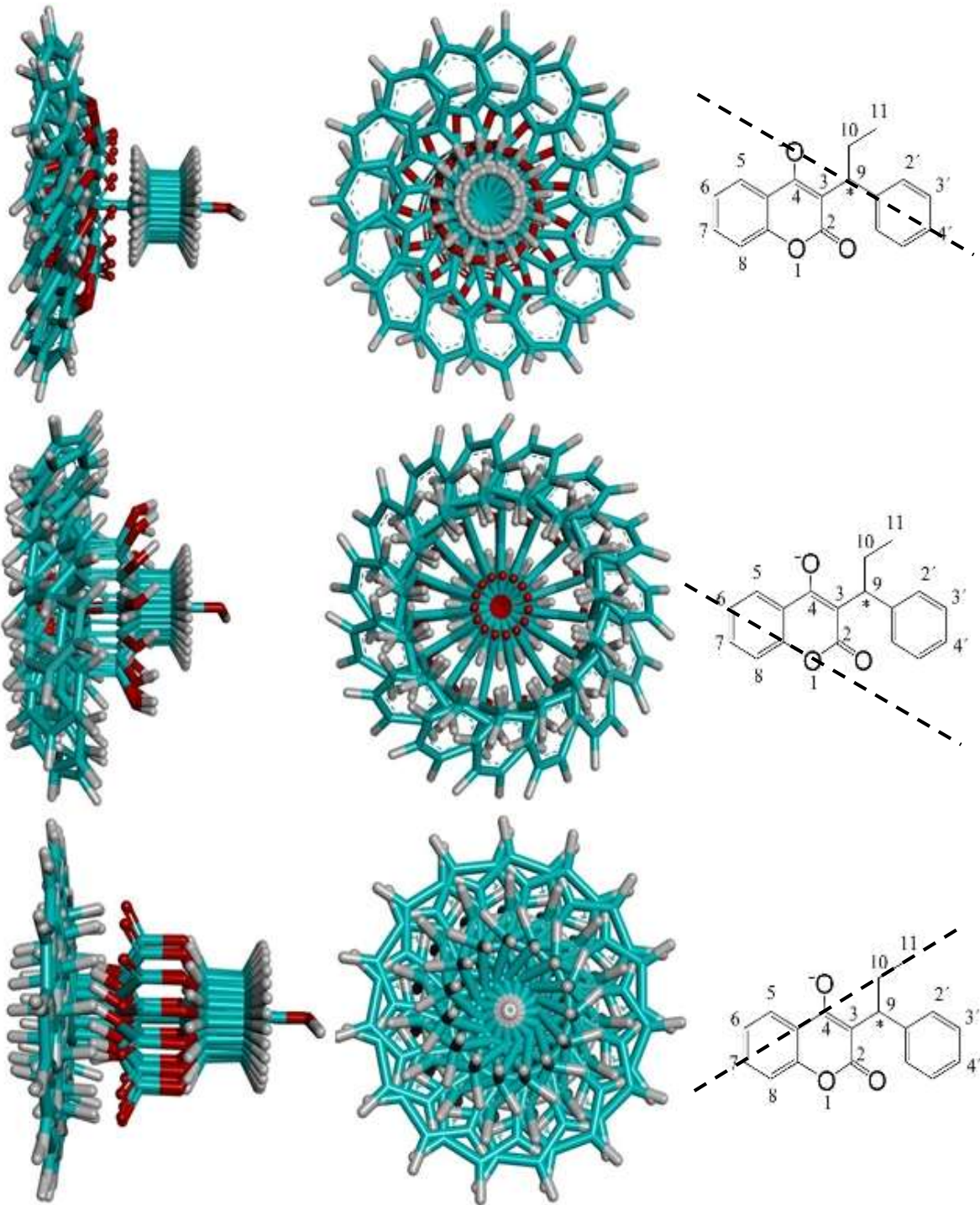


Figura 31. Superposición de las 15 posiciones del ligando correspondientes a la hidroxilación en C-4' (arriba), C-6 (en medio) y C-7 (abajo) tras hacer girar la posición final del refinamiento con YetiFF. A la derecha de cada superposición se muestra el eje sobre el que se hizo girar a la posición final del refinamiento de los tres metabolitos principales. El eje corresponde a la geometría del enlace C-OH del grupo hidroxilo agregado.

Tabla 14. Energía de interacción entre CYP2C9 y los principales metabolitos de PPC girados sobre su propio eje. **En verde** están subrayadas los resultados que conservan geometría de hidroxilación tras el refinamiento energético, **en rojo** están aquellas cuya posición no posee geometría de hidroxilación.

Ángulo de giro	C-7 +OH	C-7 -OH	C-6 +OH	C-6 -OH	C-4' +OH	C-4' -OH
0°	-255	-224	-253	-221	-254	-224
24°	-257	-214	-254	-221	-264	-214
48°	-258	-217	-246	-223	-262	-217
72°	-255	-216	-244	-223	-259	-216
96°	-255	-216	-246	-222	-250	-216
120°	-255	-224	-249	-231	-253	-224
144°	-256	-219	-257	-215	-256	-219
168°	-256	-222	574	568	-252	-222
192°	-257	-224	100	100	-260	-224
216°	-258	-218	-206	-217	-263	-218
240°	-228	-209	-217	-226	-263	-199
264°	-255	-211	-220	-220	-254	-211
288°	-246	-214	-255	-218	-254	-214
312°	-256	-222	-257	-220	-269	-222
336°	-256	-213	-254	-220	-264	-213

Los resultados de la tabla 14 muestran como los metabolitos de 4' y 7-OH-PPC son los que tienen mayor cantidad de posiciones que conservan geometrías de hidroxilación; estos dos son los metabolitos con mejores rendimientos de producción. No obstante, cuando se toma en cuenta las posiciones de sus respectivas posiciones en forma de sustrato se puede apreciar que existen mayor cantidad de posiciones que dejan asequible a C-7 que las que dejan a C-4'. Estos resultados confirman que existen un número mayor de posiciones favorables que permiten la producción de 7-OH-PPC que de ningún otro metabolito.

Cuando se superponen todos los metabolitos girados sobre el eje del enlace C-OH, podemos apreciar como los ligandos pertenecientes a la hidroxilación de C-7 son los que ocupan menor volumen en comparación con las metabolitos hidroxilados en C-6 y C4' (figura 31). En la cavidad de 2C9 existe espacio suficiente para que los diferentes posiciones rotados del ligando 7-OH-PPC en el sitio catalítico conserven afinidad y geometría de hidroxilación. Una razón que puede explicar por qué los metabolitos de 4'-OH-PPC conserven la geometría de hidroxilación pero sus correspondientes sustratos no, es debida a la estructura en "V" de la cavidad de la enzima. El ancho de la cavidad (el espacio en paralelo al grupo hemo) es suficientemente amplio para permitir el giro y la ubicación del cuerpo cumarínico de PPC en el sitio activo de la enzima y conservar la geometría

de hidroxilación; sin embargo, las limitaciones estéricas que provoca el techo de la cavidad limitado por el α -hélice F, y en específico el residuo de I205, y la pérdida de aproximadamente 1.5 Å (diferencia entre la geometría del sustrato y del metabolito) provoca que al necesitar el ligando en forma de sustrato mayor espacio para su colocación en geometría de hidroxilación, éste sea repelido a posiciones con mínimos energéticos más estables pero sin conservar una posición activa.

Otra observación destacable de los resultados reportados en la tabla 14 es que la energía de interacción proteína-ligando de las posiciones que conservan geometría de hidroxilación tanto en forma de metabolito con en forma de sustrato es relativamente constante. Esto quiere decir que una vez colocado el geometría de hidroxilación el ligando en la cavidad, la afinidad de la enzima sobre el ligando es independiente de su posición.

7-OH-PPC tiene más grados de libertad para colocarse en el sitio activo de CYP2C9, lo que se traduce en mayores probabilidades de llevarse a cabo la hidroxilación en dicho SoM y por consiguiente mayor rendimiento de producción. Es importante destacar que nuevamente el efecto estérico es observado como un factor vital para la regio-selectividad que CYP2C9 tiene sobre PPC.

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTICAS

Se realizó modelado computacional para obtener un panorama molecular en la bio-transformación de fenprocumón (PPC) mediado por el citocromo P450 2C9 y así poder explicar los patrones observados de su regio-selectividad de los metabolitos hidroxilados. Con este propósito, se llevó a cabo el acoplamiento molecular de PPC y compuestos relacionados estructuralmente (warfarina, cumarina, clopidrogel) en el modelo tridimensional de CYP2C9 y en isoformas relacionadas como un enfoque de estructuras múltiples o múltiples conformaciones para reflejar la posible flexibilidad en la cadena principal de los citocromos, es decir, simulando el modelo de ajuste inducido mediante el uso de más de una estructura proteica cristalizada. Las simulaciones de acoplamiento ligando basado en conceptos de mecánica molecular coinciden con las especificidades de cada CYP sobre el sustrato y las regio-selectividades observados experimentalmente. Se logró observar como el impedimento estérico es el elemento central que favorece e impide las posiciones finales de los sustratos. Las conformaciones finales de los ligandos en el sitio catalítico de las enzimas se correlación con el análisis espectrofotométrico de metabolitos identificados. El uso de múltiples estructuras (conformaciones) de la proteína en el acoplamiento molecular ofrece una visión conceptual sobre la naturaleza estérica

de los factores que guían el reconocimiento del sustrato. Por lo tanto, las conformaciones finales son resultado simplemente de los requisitos espaciales en el sitio activo de la enzima, dejando las sutiles diferencias electrónicas de mecánica cuántica para la descripción del ciclo redox catalítico para los complejos hemo-ligandos. Esta conclusión concuerda con los aspectos básicos que impulsan la adaptación evolutiva de las proteínas en los seres vivos; donde las presiones de selección natural favorecen los cambios en la secuencia de aminoácidos en regiones no funcionales en lugar de regiones con directa influencia sobre su actividad; es decir, mutaciones puntuales en aminoácidos del sitio activo podrían afectar directamente la actividad de las proteínas, modificando o incluso suprimiendo por completo dicha actividad, mientras que regiones no estructurales podría no ser evidente dicha mutación en la actividad de la enzima.

Modificaciones en la secuencia de aminoácidos cambian la topología de la cavidad, y con ella los requisitos estéricos para el reconocimiento de distintos xenobióticos como sustratos por diversos CYPs para su oxidación y posterior eliminación hidrofílico (vía urinaria). En contraste, el sitio catalítico de los CYPs, y con ellos las bases electrónicas del proceso de oxidación y sus múltiples etapas, se mantiene esencialmente con las mismas características químicas; por ejemplo, la cisteína presente en todos los CYPs se coordina con el hierro como ligando proximal se mantiene conservada en todos los CYPs, así mismo, la treonina en el α -hélice I, también altamente conservada y que forma un puente de hidrogeno con el metabolito hidroxilado y con el ligando distal, es un aminoácido del sitio catalítico indispensable para la actividad de estas enzimas.

La actividad metabólica de los CYPs nos ofrecen un ejemplo muy ilustrativo de como las modificaciones en secuencia en regiones estructurares y no estructurales modifican la actividad de las proteínas. A pesar de la similitud en su secuencia y estructura con CYP2C19 y CYP2C8, CYP2C9 tiene mayor similitud en la actividad sobre PPC con CYP3A4; esto es debido a que comparten grandes semejanzas en la composición de aminoácidos en zonas relacionadas directamente con la actividad metabólica de estas enzimas y que en ambas, a pesar de que su estructura es muy diferente, no existe impedimento estérico para que se lleve a cabo la hidroxilación de forma similar en los SoM de PPC descritos en la literatura.

Las mayores diferencias metabólicas sobre PPC que tienen CYP2C9 y CYP2C8 no se encuentran en su estructura. Estas dos enzimas son las que conservan mayor similitud estructural de las cuatro enzimas que son capaces de metabolizar a PPC. Las diferencias en su actividad se encuentran directamente relacionadas con las pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos localizados en el

sitio activo de la enzima, el sitio de entrada y en el asa B-C; estas diferencias hacen que estos CYPs tengan preferencias sobre tipos distintos de sustrato.

CYP2C9 y CYP2C19 ofrecen un caso interesante, comparten grandes semejanzas en secuencia y estructura; sin embargo, CYP2C19 no es capaz de imitar la actividad que CYP2C9 tiene sobre PPC. La diferencia más notable se encuentra en la estructura del sitio activo; a pesar de poseer la misma composición de aminoácidos en este, los aminoácidos que interactúan con el sustrato no son los mismos y están colocados en distinta posición, lo que ocasiona que la afinidad energética por PPC sea distinta. Otras diferencias en zonas que tienen que ver con el reconocimiento del sustrato, como la parte externa de la α -hélice G, contribuyen a las diferencias en la actividad de estas enzimas

El balance estrecho que se establece entre estructura y composición química de regiones relacionadas directamente con su función provee a la enzima la capacidad de metabolizar algún sustrato. En este sentido la actividad metabólica de CYP2C9 sobre PPC se puede describir en algunos aspectos importantes que promueven su especificidad, regio-selectividad y rendimiento o actividad sobre el sustrato:

La composición de aminoácidos del sitio de entrada de la enzima, favorece la afinidad que los CYPs tienen sobre algún tipo específico de sustrato. En el sitio de entrada se encuentran los tipos de aminoácidos que permitirán el ingreso a determinados tipos de sustratos. Este es un factor que debe tomarse en cuenta cuando se habla de afinidad de la enzima por los tipos de sustratos y rendimientos sobre éstos. No debe perderse de vista la importancia de la composición de los aminoácidos de esta región.

Afinidad energética de sustrato y metabolito. Este es un factor importante para predecir los rendimientos de producción de un CYP determinado sobre su sustrato. Describe la facilidad con que un sustrato se colocara en geometría de hidroxilación y con la que el metabolito será expulsado del sitio activo para dar paso a un nuevo ciclo catalítico; en otras palabras, describe la eficiencia metabólica de un CYP sobre un posible sustrato. Este factor permitió dilucidar las razones de como dos enzimas tan parecidas en secuencia y estructura tienen actividades distintas sobre PPC. No obstante, la afinidad energética de la proteína sobre el sustrato no podrá predecir su regio-selectividad.

Estructura del sitio activo y la disposición que ésta otorga al sustrato de colocar accesibles los sitios de metabolización (SoMs) de la molécula. El efecto estérico es un factor sumamente importante que permite predecir si un determinado metabolito puede ser producido. Si no existen condiciones estéricas favorables

que permita la hidroxilación de un determinado átomo del sustrato, esta hidroxilación no podrá llevarse a cabo. Si la energía de interacción enzima sustrato describe que tan eficiente es un CYP para metabolizar un sustrato, el efecto estérico dictamina si dicha hidroxilación puede o no llevarse a cabo.

Probabilidad o grados de libertad de colocar un átomo de carbono del sustrato accesible para la hidroxilación. Mientras existan más posiciones favorables, energéticas y geométricas, para la hidroxilación de un SoM, existe una mayor posibilidad de que se lleve a cabo dicha hidroxilación en esa región del sustrato lo que dará como resultado mayor producción de ese metabolito. Los grados de libertad de la colocación del sustrato en geometría de hidroxilación explican las preferencias en la regio-selectividad de la actividad metabólica de esta enzima.

Por tal motivo, parece plausible la aplicación únicamente de técnicas basadas en mecánica molecular (puntuación/acoplamiento molecular), en lugar de utilizar mecánica cuántica para simular los datos experimentales sobre el reconocimiento del sustrato y la regio-selectividad de los miembros de la familia CYP. En el presente estudio, la combinación de los programas Autodock y Yeti explicó casi por completo las regio-selectividades de la enzima CYP2C9 por PPC. Los modelos fueron validados con estructuras cristalinas conocidas hasta ahora.

Las limitaciones de éxito de los actuales procedimientos de acoplamiento molecular se explican a la escasez de las estructuras cristalinas disponibles de CYP2C9 que permitan todas las hidroxilaciones observadas experimentalmente. Se evaluó las contribuciones en el reconocimiento del sustrato por los mecanismos de ajuste inducido entre ligando y la proteína investigando pares de isoformas CYP en su forma apoenzimática y en complejo. Para detallar, en el caso particular de C-2' se analizó que es necesario grandes cambios en la orientación de las cadenas principales y laterales de la enzima, lo que reflejaría conformaciones distintas de la estructura cristalina disponible, para que se lleve a cabo dicha hidroxilación.

La estero-selectividad sobre alguna forma tautomérica sobre estos fármacos no pudo ser descrita en este trabajo. Parece que no existe ninguna preferencia por parte de los CYPs para metabolizar alguna de las dos formas de PPC. Las diferencias estructurales entre la forma R- y S-PPC son muy sutiles (aún más que la de los enantiómeros de WFN), lo que provoca que la posición de los dos enantiómeros de PPC en el sitio catalítico de un CYP sean prácticamente las mismas con la única sustitución del grupo aril por el grupo alifático en PPC y viceversa. Probablemente estas preferencias en la estereoselectividad encuentra en el comportamiento implícito y características fisicoquímicas de las formas enantiomérica de PPC. La forma R-PPC es más inerte que su similar S-

PPC, interacciona menos con su proteína blanco (VKOR), y al mismo tiempo es más difícil metabolizarla [21]. Renko en 2014 midió que la estructura de la forma S-PPC es más estable y probablemente esto facilite su interacción con otras biomoléculas [70].

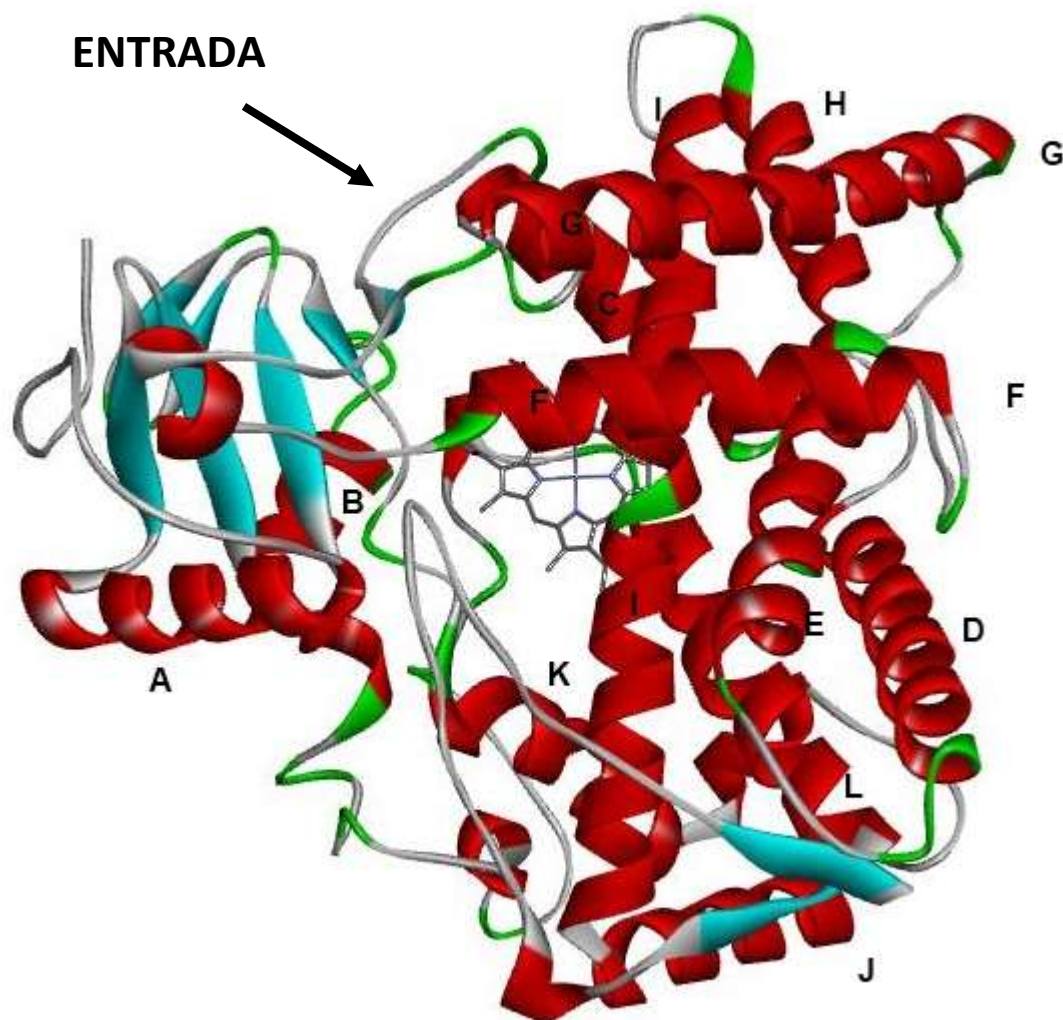
El diseño de este estudio permitió observar los factores fundamentales que determinan la regio-selectividad que los CYPs bajo investigación mantienen sobre su sustrato y permitió comparar de manera precisa como dichos factores intervienen en la actividad metabólica de CYP2C9; de esta manera, se analizaron las características primordiales que distinguen a esta enzima de las otras isoformas CYP en cuanto a estructura y función.

Como perspectiva se pueden realizar simulaciones para predecir la afinidad, actividad y regio-selectividad que incluyan el vestíbulo exterior de proteínas CYP; es decir, la parte externa de la superficie proteica cerca de las membranas simulando del retículo endoplásmico y el proceso de inserción del xenobiótico a la cavidad metabólica de los CYPs. Este escenario podría describir el papel de pre-selectividad del sustrato en las células vivas, además de los factores de la lipofilidad molecular, forma y tamaño de las partículas participantes en este proceso. En otras palabras técnicas que simulen el escenario completo de entrada al CYP y su posterior excreción de la cavidad. También se podría crear un modelo matemático que tome en cuenta todos los factores que intervienen en la actividad metabólica de un CYP (afinidad energética, composición de regiones de interacción molecular, grados de libertad, etc.) y que permita predecir rendimientos de producción de un determinado metabolito por su enzima que lo metaboliza.

La naturaleza ha proveído en los CYPs 450 un laboratorio para el estudio relacionado con la estructura, secuencia y actividad de las enzimas. Estas enzimas realizan básicamente la misma actividad metabólica; y algunas que son tan diferentes en su secuencia de aminoácidos pueden tener similar afinidad y actividad sobre las mismas clases de sustratos, lo que las convierte a los CYPs en un buen campo de estudio sobre la evolución de las enzimas y su actividad relacionada con su estructura.

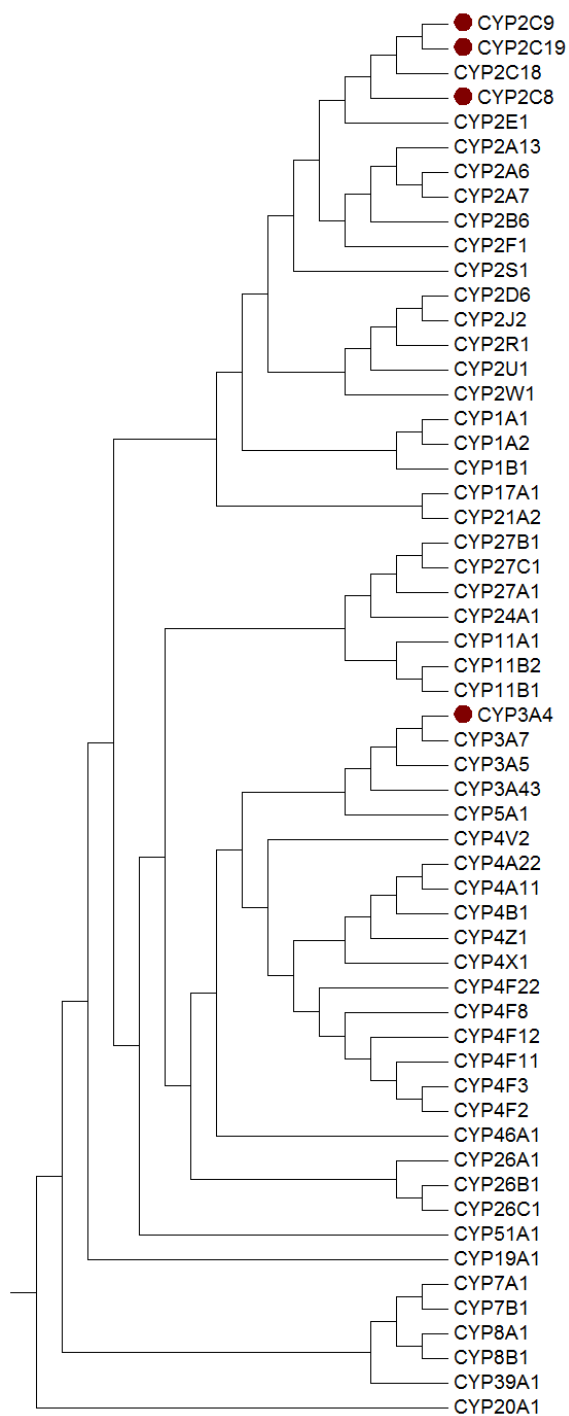
6 SUPLEMENTOS

6.1 Representación de la estructura terciaria de CYP2C9



CYP2C9 con la identidad de sus alfa-hélices marcadas. Basado en el trabajo cristalográfico con código PDB 1R9O. Las hélices están esquematizadas de color rojo, las hojas beta de color azul, los giros verdes y las asas blanco. Al fondo se aprecia al grupo hemo (gris) que puede ser usado como referencia del sitio catalítico de la enzima. CYP2C9 tiene la estructura general de los CYP450 con 12 alfa-hélices fácilmente definidas y sub-alfa-hélices intermedias de las principales. Se señala con una flecha el sitio de entrada del sustrato a través del asa B-C.

6.2 Árbol filogenético de los CYPs humanos



Árbol filogenético resultante del alineamiento múltiple de secuencias de los CYPs humanos. Las enzimas capaces de metabolizar a PPC están marcadas con un círculo rojo. Las familias están correctamente agrupadas en clados.

6.3 Categorización de aminoácidos y composición del asa B-C

Agrupación de los aminoácidos en una categoría dependiendo de sus propiedades químicas, para el estudio de composición de aminoácidos del asa B-C

Categorías	Aminoácidos
Alifáticos o Fenilalanina	F, L, V, I, A, M, C, P, G
Polares	T, S, W, Y, Q, N
Ionizados	D, E, H, R, K

Detalle de la composición de aminoácidos del asa B-C de los CYPs a estudio

Aminoácido	2C8 (R97- S114)	%	2C9 (R97- F114)	%	2C19(R97- F114)	%	3A4(R 105- A121)	%	2D6(R 101- A122)	%
F	0	0%	3	17%	3	17%	2	12%	2	9%
L	1	6%	1	6%	1	6%	0	0%	2	9%
V	0	0%	1	6%	1	6%	1	6%	2	9%
I	4	22%	2	11%	1	6%	2	12%	2	9%
A	0	0%	2	11%	2	11%	2	12%	1	5%
M	0	0%	0	0%	0	0%	1	6%	0	0%
C	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
P	1	6%	1	6%	1	6%	2	12%	4	18%
G	3	17%	3	17%	3	17%	2	12%	3	14%
T	1	6%	0	0%	0	0%	0	0%	1	5%
S	3	17%	0	0%	0	0%	2	12%	1	5%
W	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Y	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Q	1	6%	1	6%	0	0%	0	0%	0	0%
N	1	6%	0	0%	1	6%	0	0%	2	9%
D	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
E	0	0%	1	6%	1	6%	0	0%	0	0%
H	0	0%	0	0%	1	6%	0	0%	0	0%
R	2	11%	3	17%	3	17%	2	12%	2	9%
K	1	6%	0	0%	0	0%	1	6%	0	0%
Total	18	100%	18	100%	18	100%	17	100%	22	100%

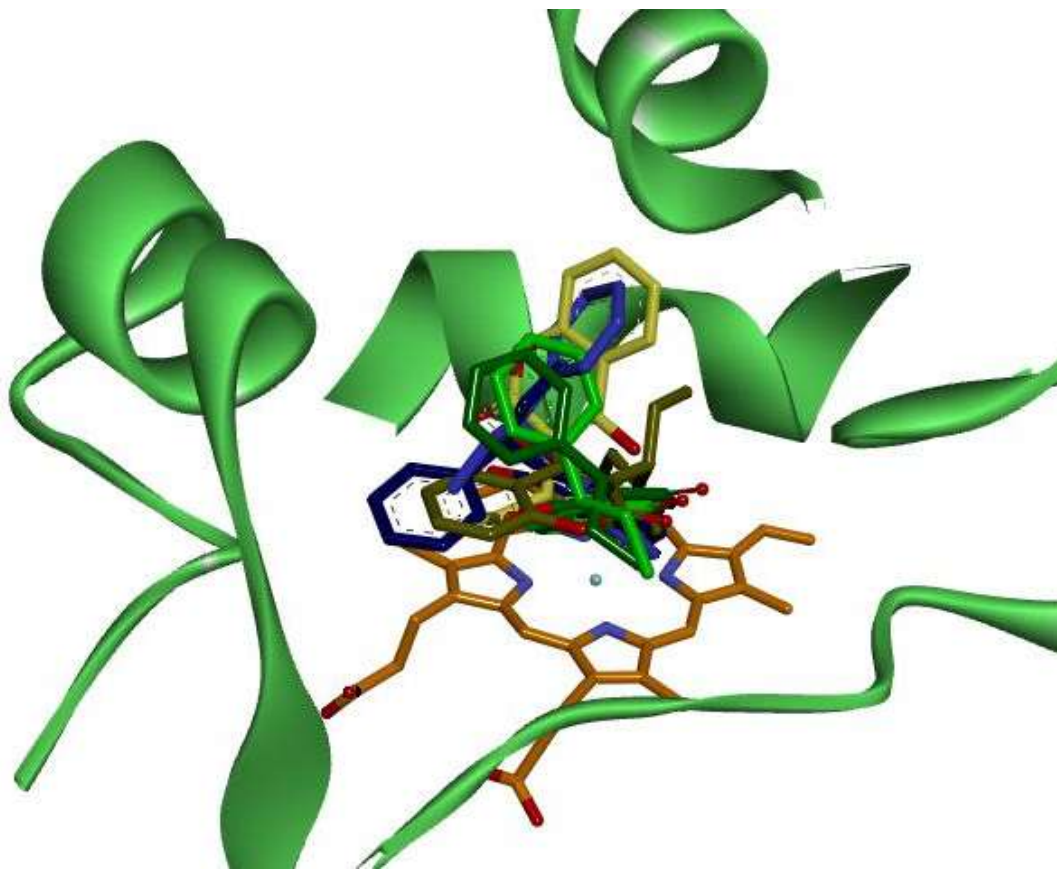
6.4 Redimiendo de producción de metabolitos de WFN y PPC

El redimiendo de producción se tomó como la división de Vmax (pmol/nmolcyp450*min) sobre KM (microM) los datos experimentales se extrajeron de [79] y [80]. La X marca que existe metabolismo en cantidades muy bajas

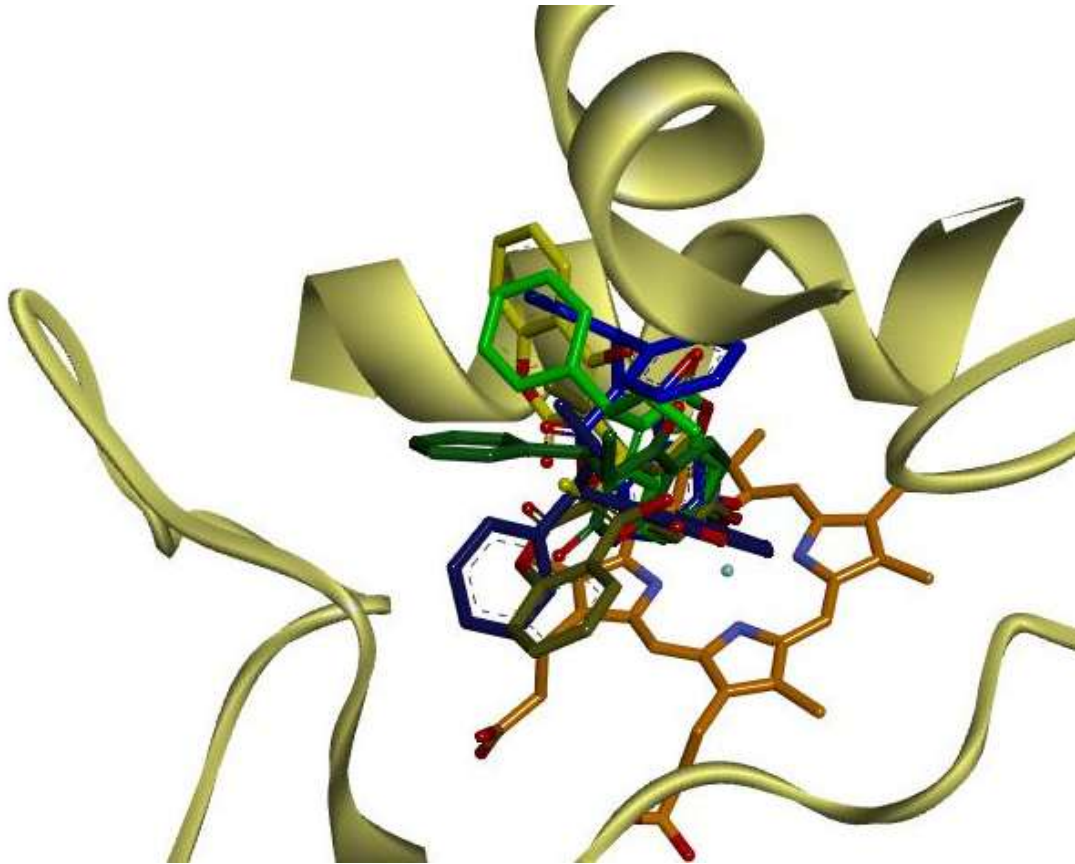
S-PPC	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	7.14	8.09	0.12	2.18	58.05%	66%	1%	18%
6-OH	0	3.25	0.31	0.65	0.00%	26%	3%	5%
7-OH	0	12.3	4.78	3.82	0.00%	100%	39%	31%
R-PPC	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	0	2.61	0.11	1.27	0.00%	21%	1%	10%
6-OH	0	2.05	0.96	0.22	0.00%	17%	8%	2%
7-OH	0	1.22	3.3	0.71	0.00%	10%	27%	6%
S-WFN	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	X	0	X	0	1%	0%	1%	0%
6-OH	0	30.5	0	0	0%	29%	0%	0%
7-OH	0	105.25	0	0	0%	100%	0%	0%
8-OH	0	0	0	0	0%	0%	0%	0%
R-WFN	2C8	2C9	2C19	3A4	2C8	2C9	2C19	3A4
4'-OH	0	0.010534 65	0	0	0%	1%	0%	0%
6-OH	0	0	0	0	0%	0%	0%	0%
7-OH	X	0	0	0	1%	0%	0%	0%
8-OH	0	0	45.75	87.5	0%	0%	43%	83%

6.5 Acoplamiento molecular de los metabolitos de PPC en los CYPs que lo biotransforman

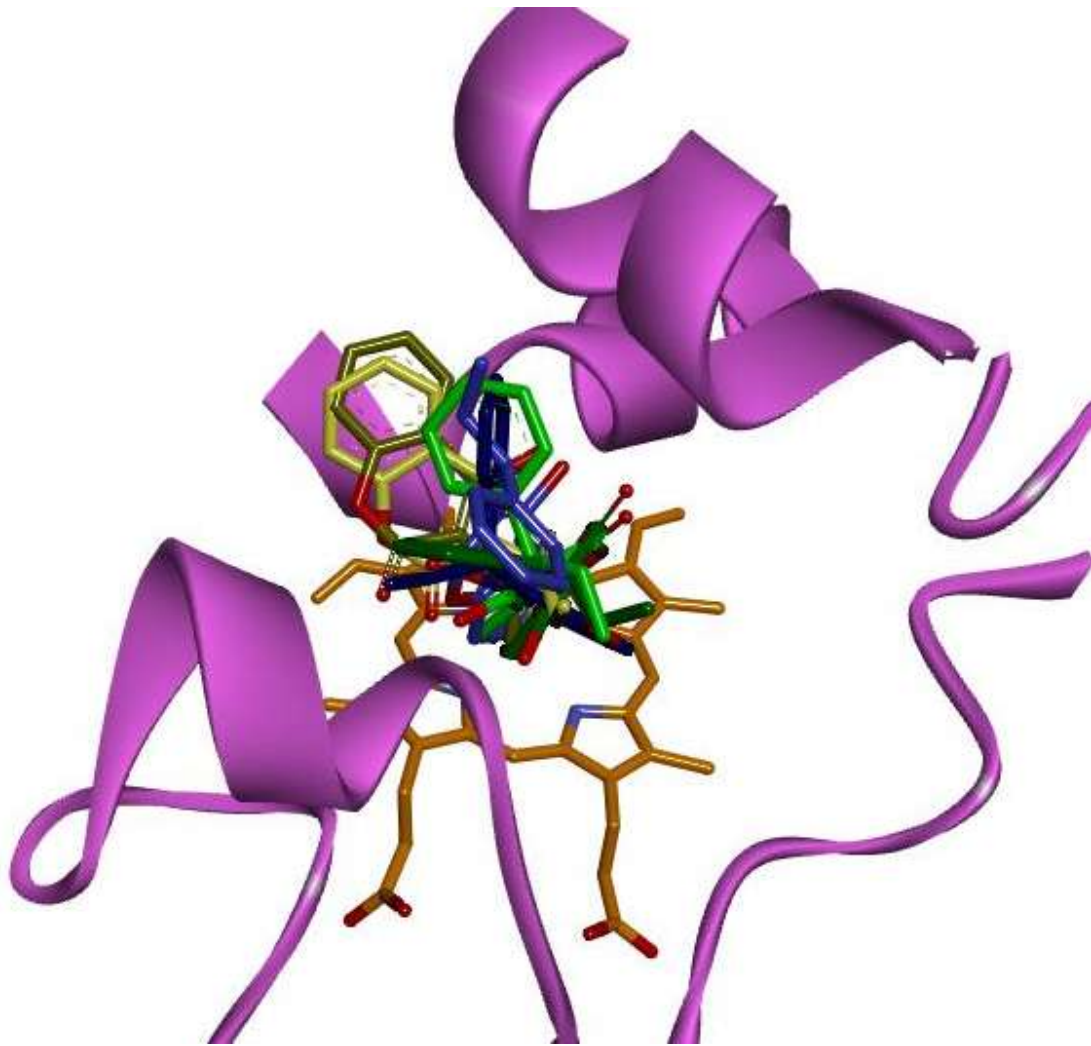
A continuación se muestra una serie de figuras resultado del refinamiento de los tres principales metabolitos de PPC (7-OH-PPC en verde, 6-OH-PPC en azul y 4'-OH-PPC en amarillo) en ambas formas enantiomérica R-(oscuro) y S-(claro) en la cavidad de las cuatro enzimas CYPs que los producen (CYP2C8 en verde, CYP2C9 en amarillo, CYP2C19 en magenta y CYP2C9 en azul). Los aminoácidos de la proteína se muestran del color del ligando con el cual tiene interacción. El grupo hemo se muestra siempre de referencia en color naranja.



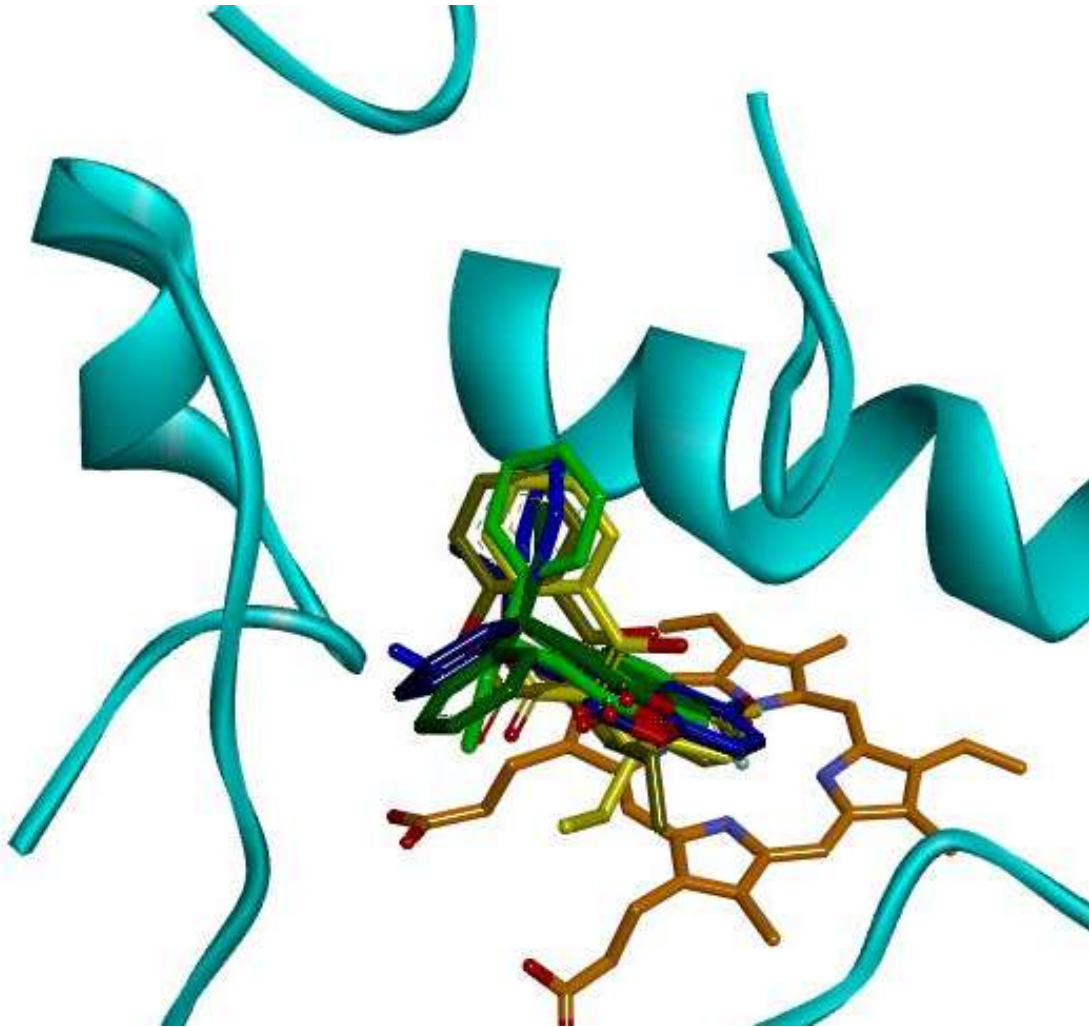
CYP2C8 y la superposición de los seis metabolitos principales resultantes del refinamiento



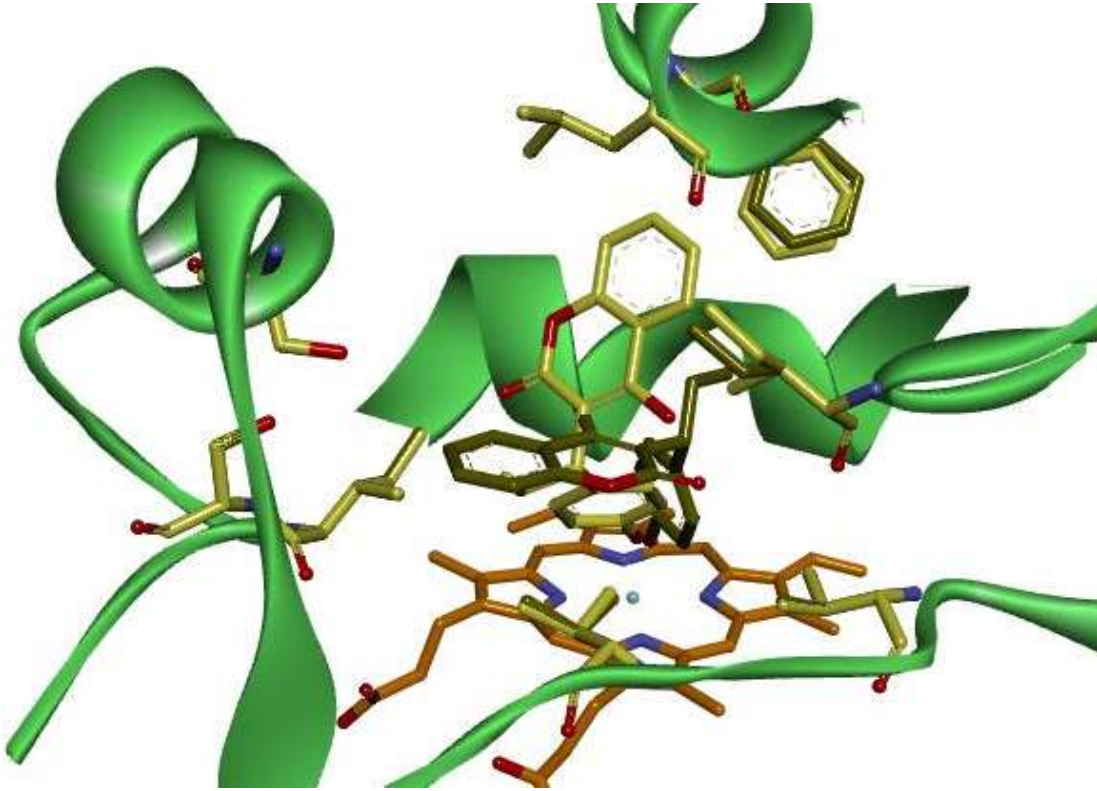
CYP2C9 y la superposición de los seis metabolitos principales resultantes del refinamiento



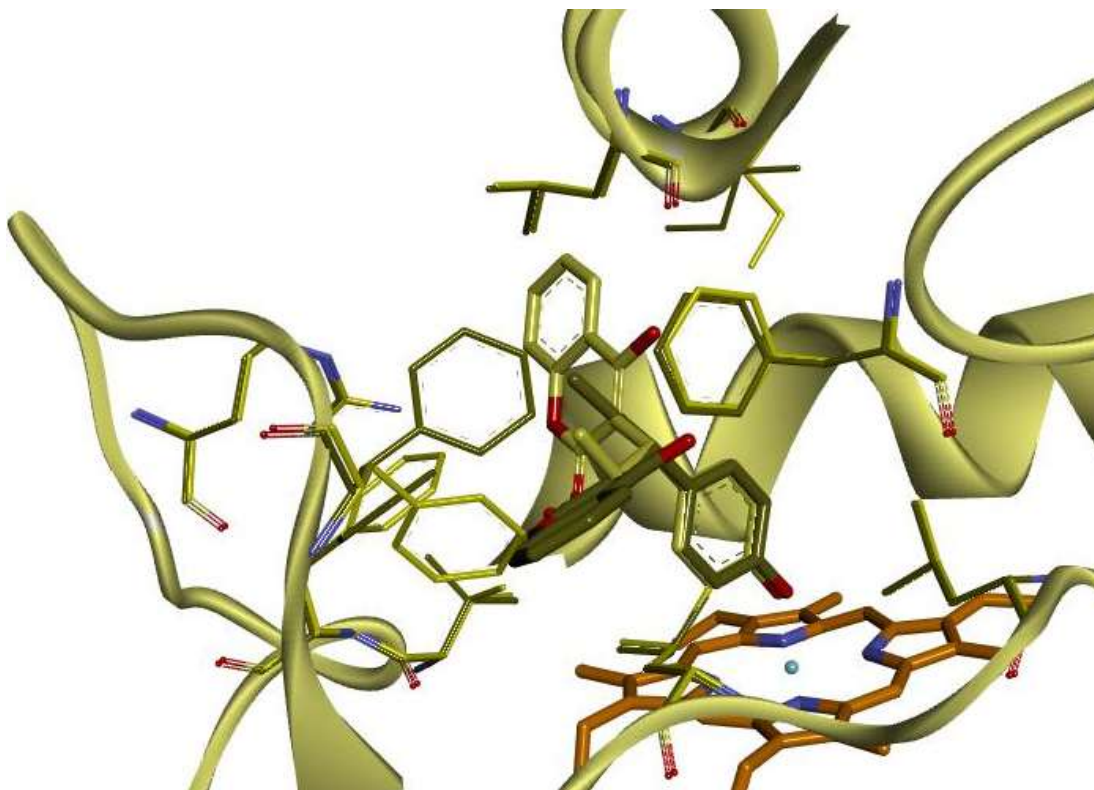
CYP2C19 y la superposición de los seis metabolitos principales resultantes del refinamiento



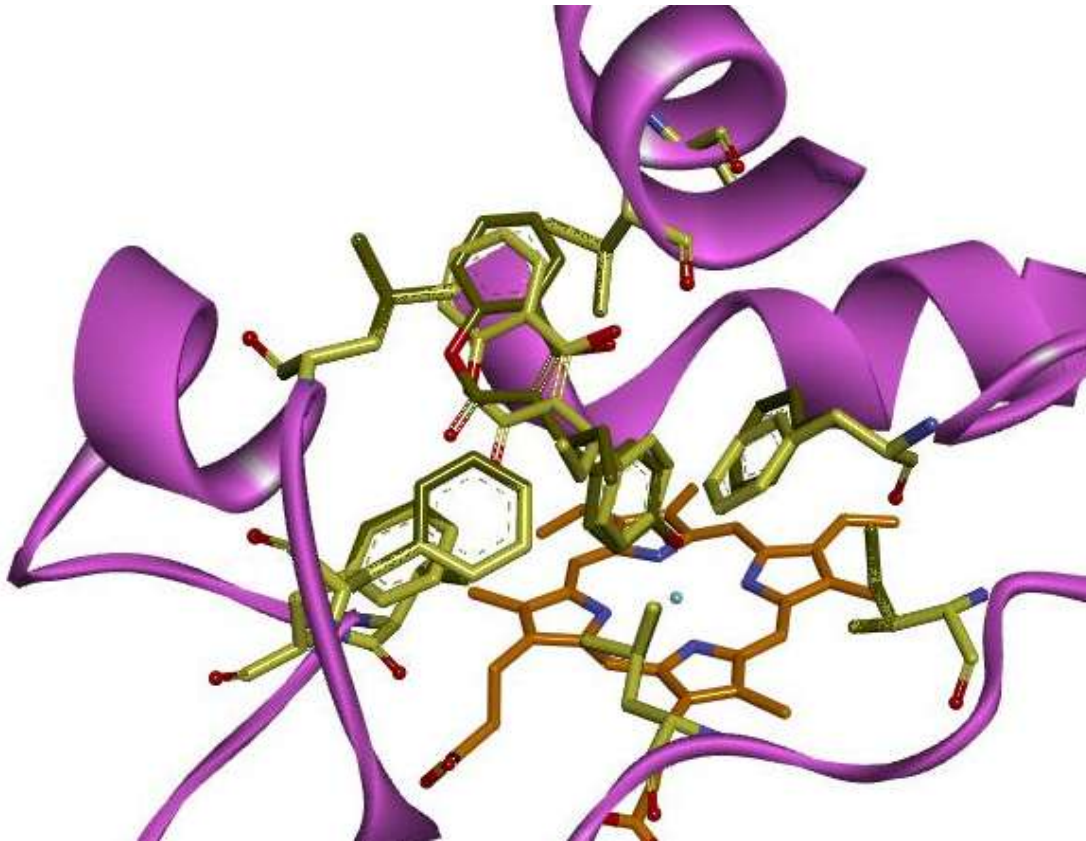
CYP3A4 y la superposición de los seis metabolitos principales resultantes del refinamiento



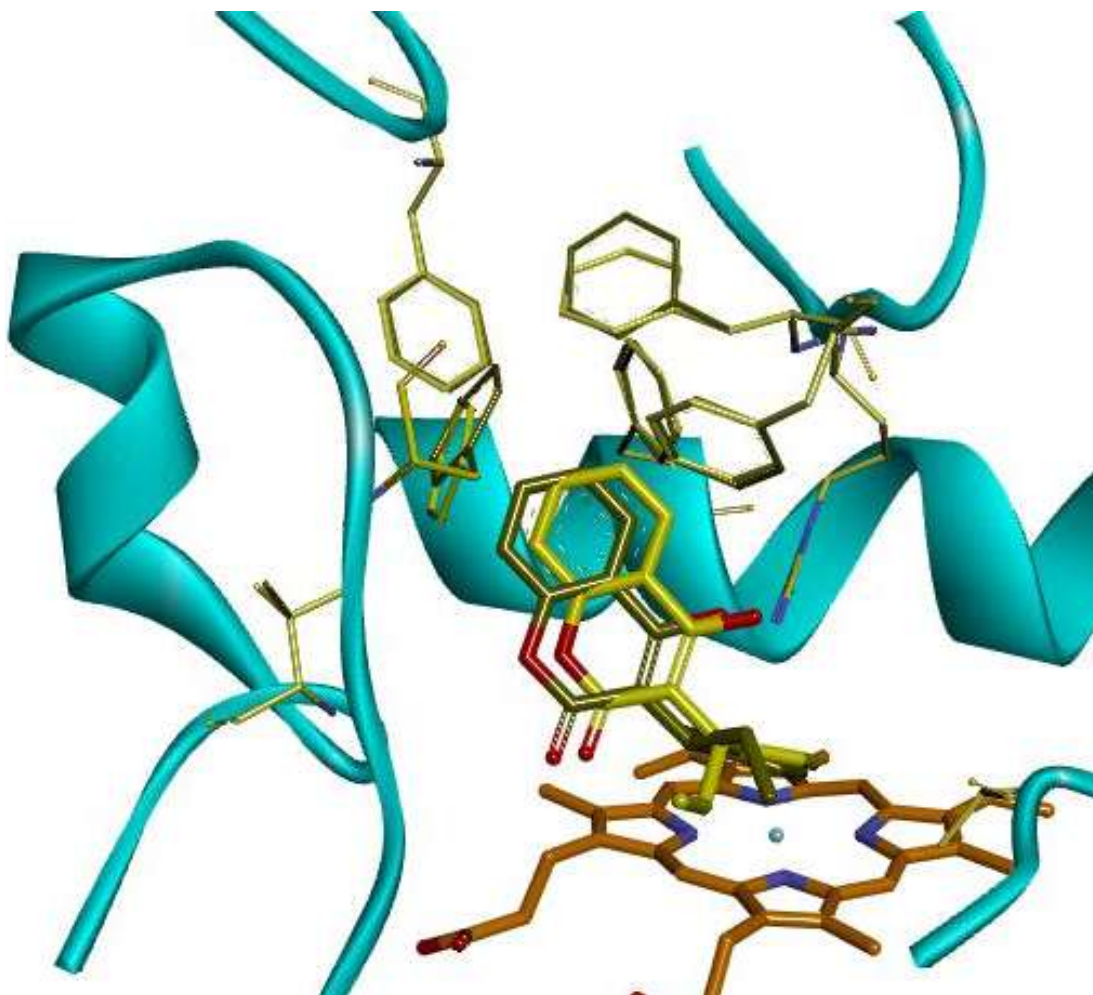
CYP2C8 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 2'-OH-PPC resultantes del refinamiento



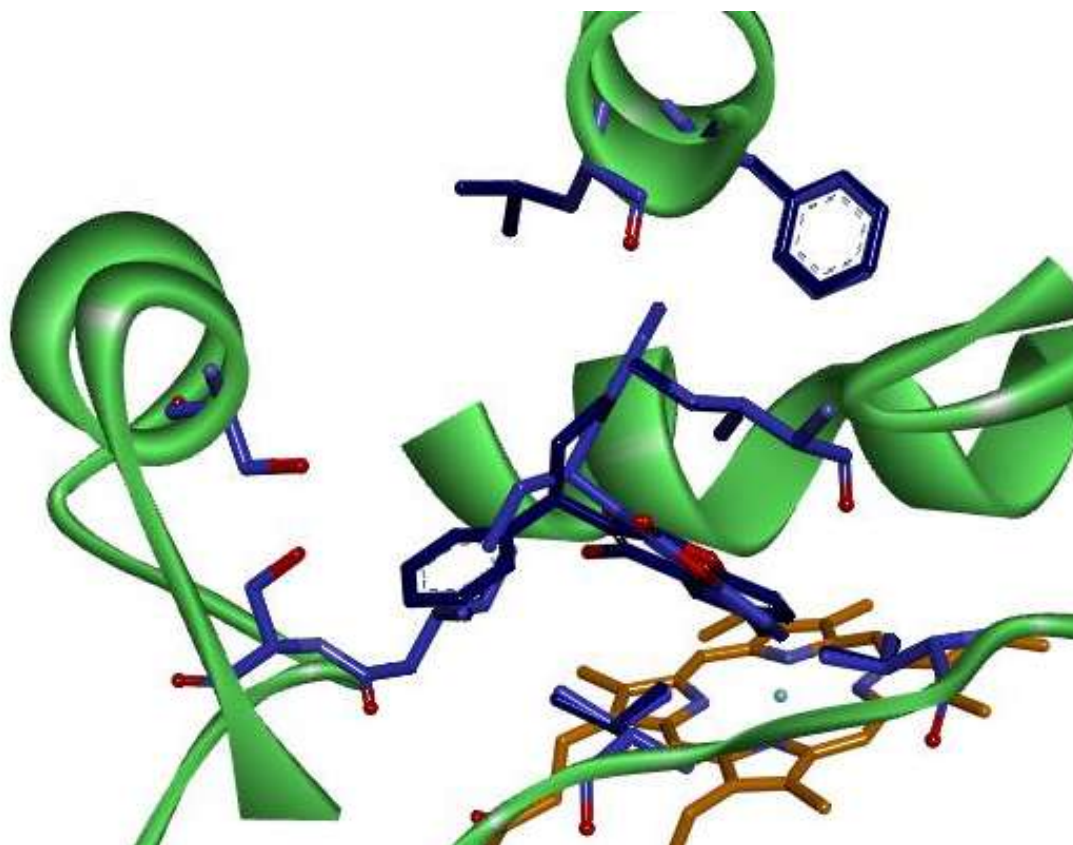
CYP2C9 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 2'-OH-PPC resultantes del refinamiento



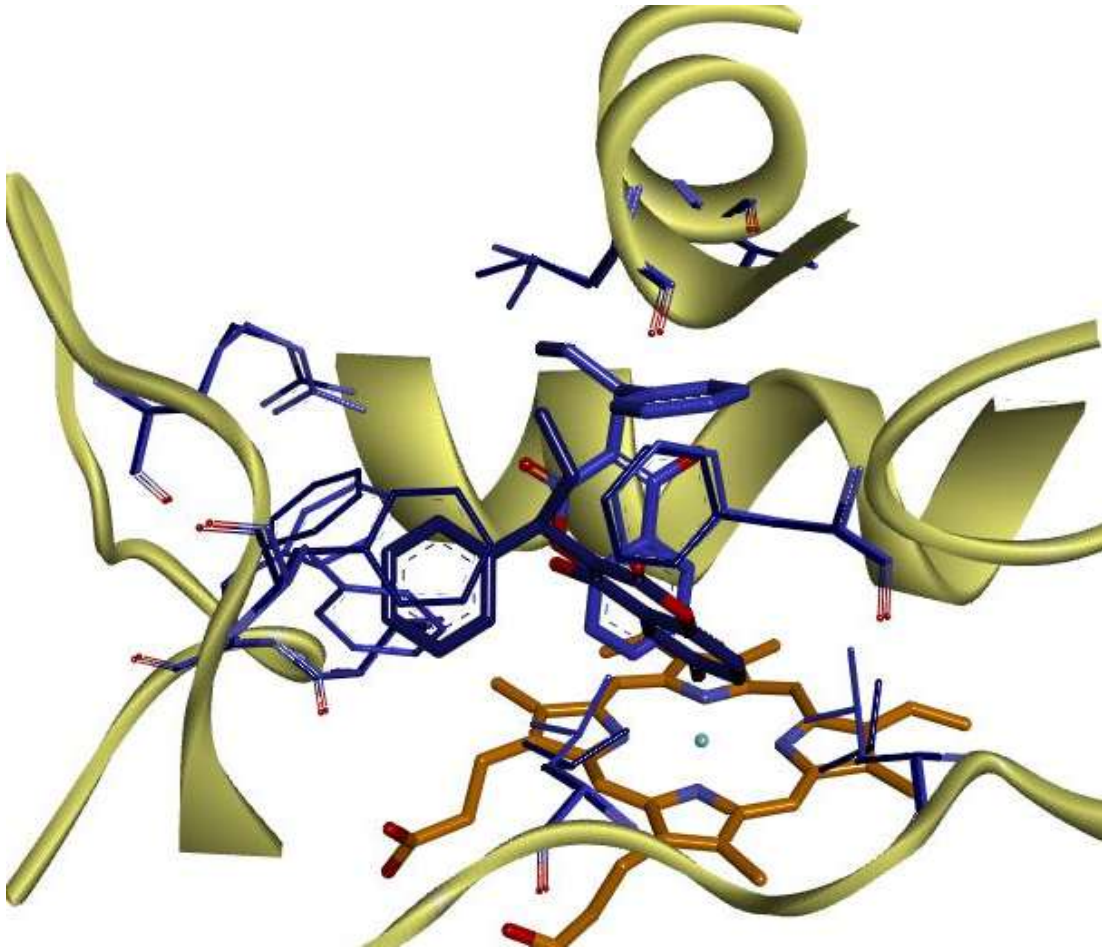
CYP2C19 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 2'-OH-PPC resultantes del refinamiento



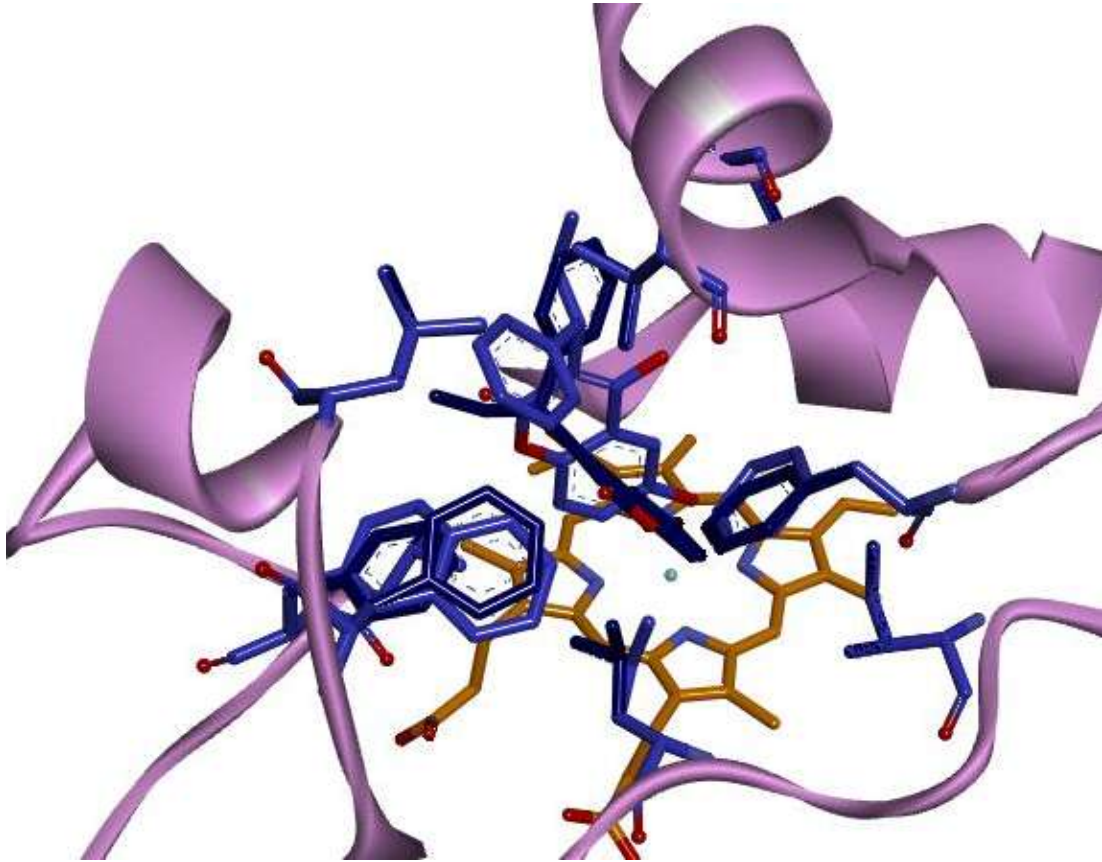
CYP3A4 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 2'-OH-PPC resultantes del refinamiento



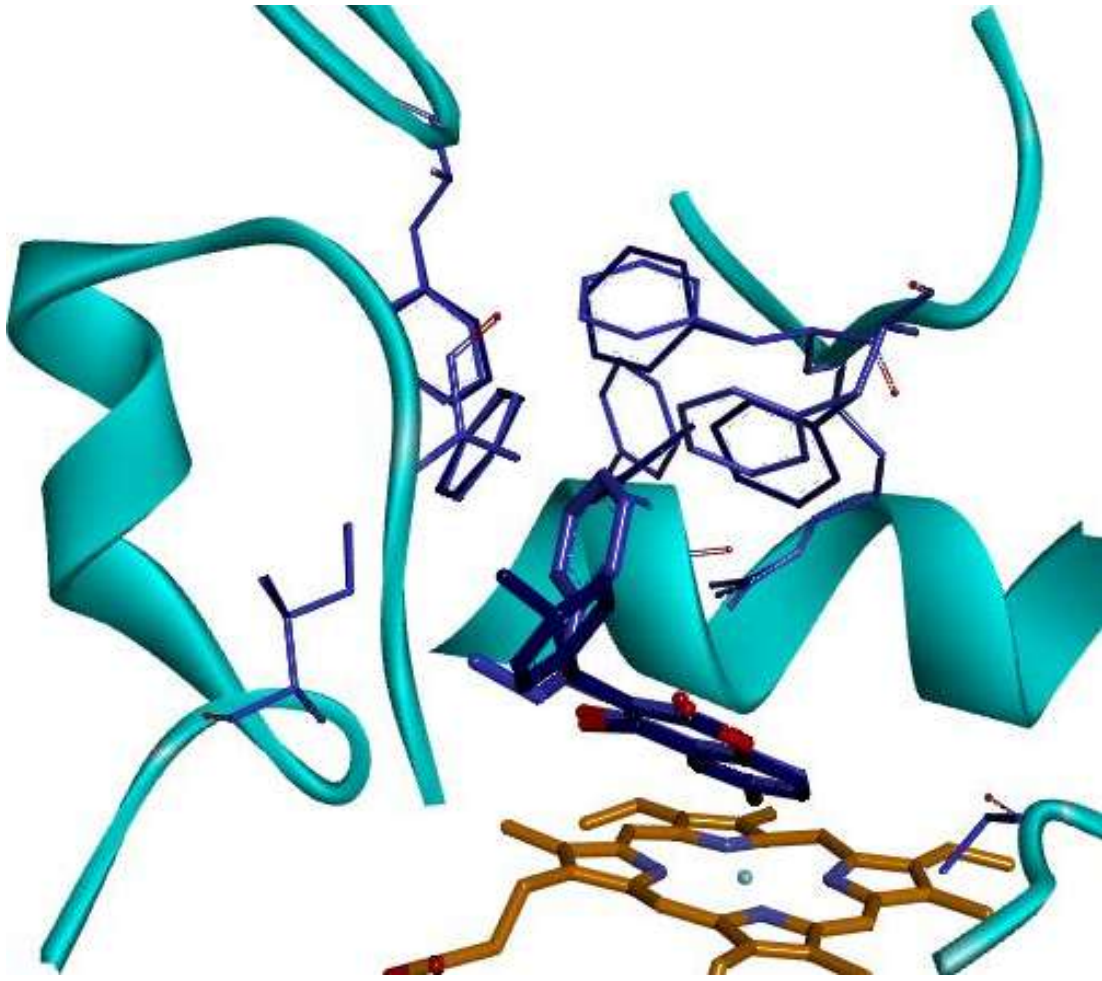
CYP2C8 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 6-OH-PPC resultantes del refinamiento



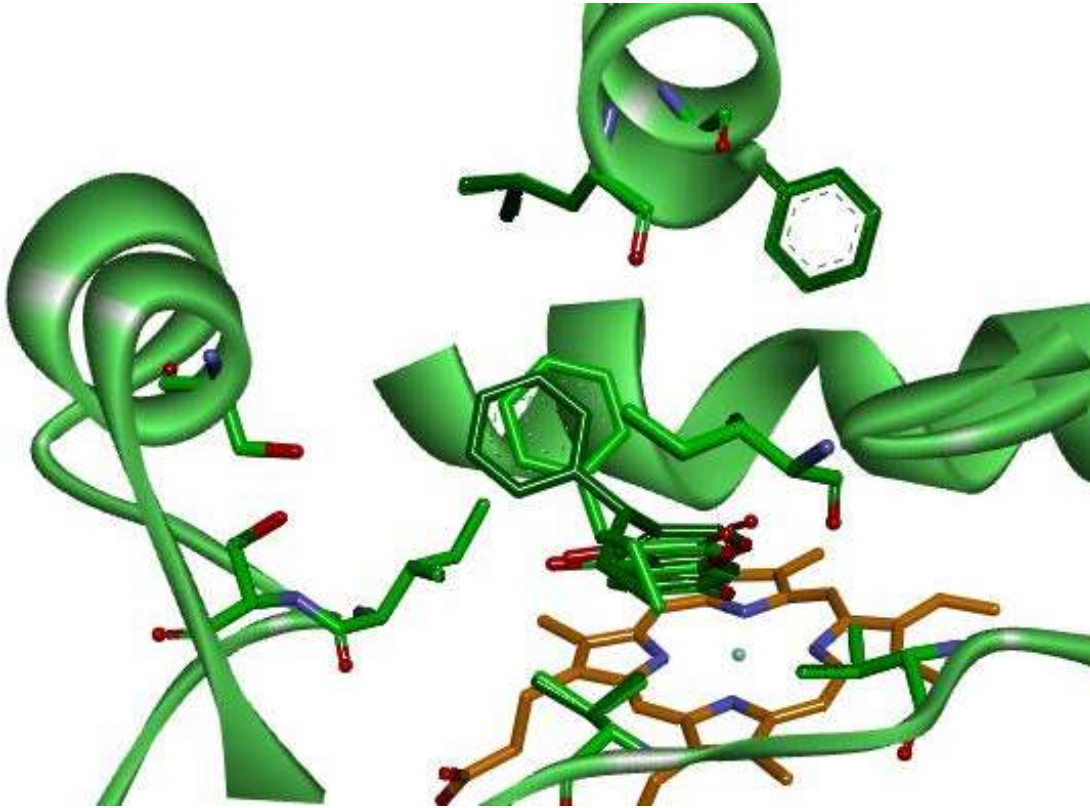
CYP2C9 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 6-OH-PPC resultantes del refinamiento



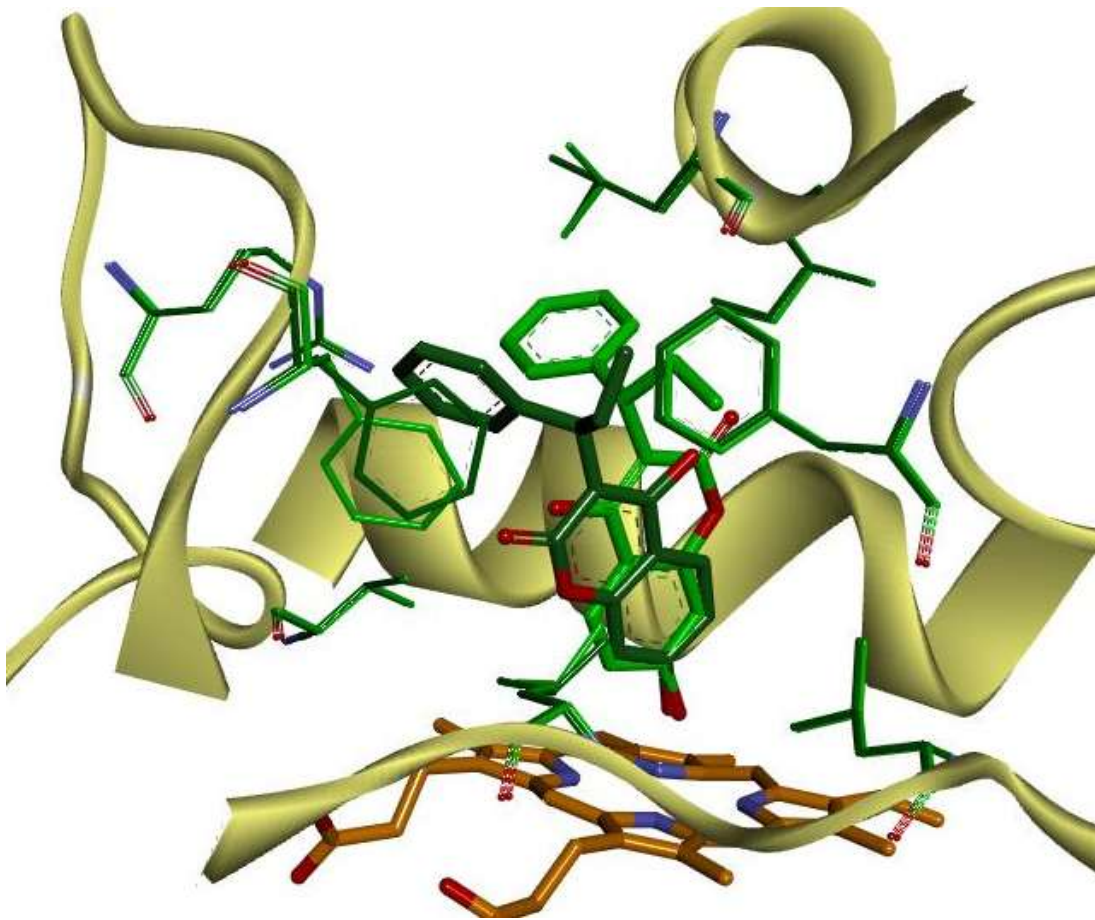
CYP2C19 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 6-OH-PPC resultantes del refinamiento



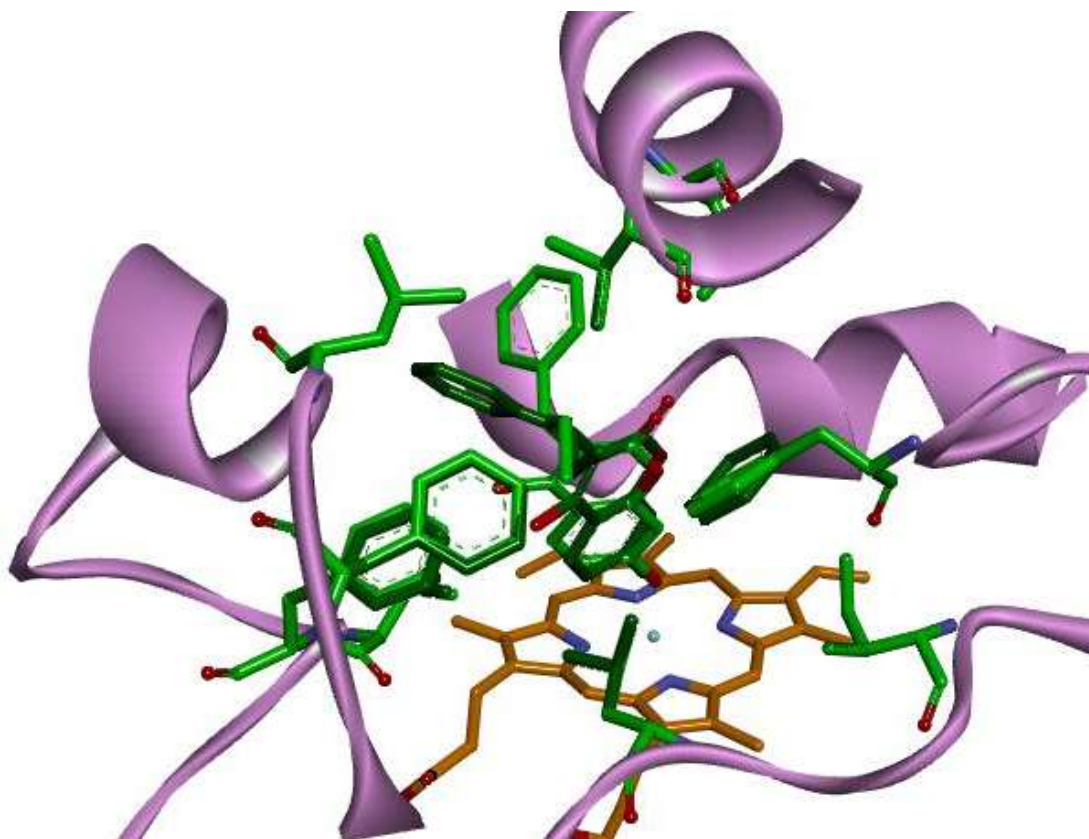
CYP3A4 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 6-OH-PPC resultantes del refinamiento



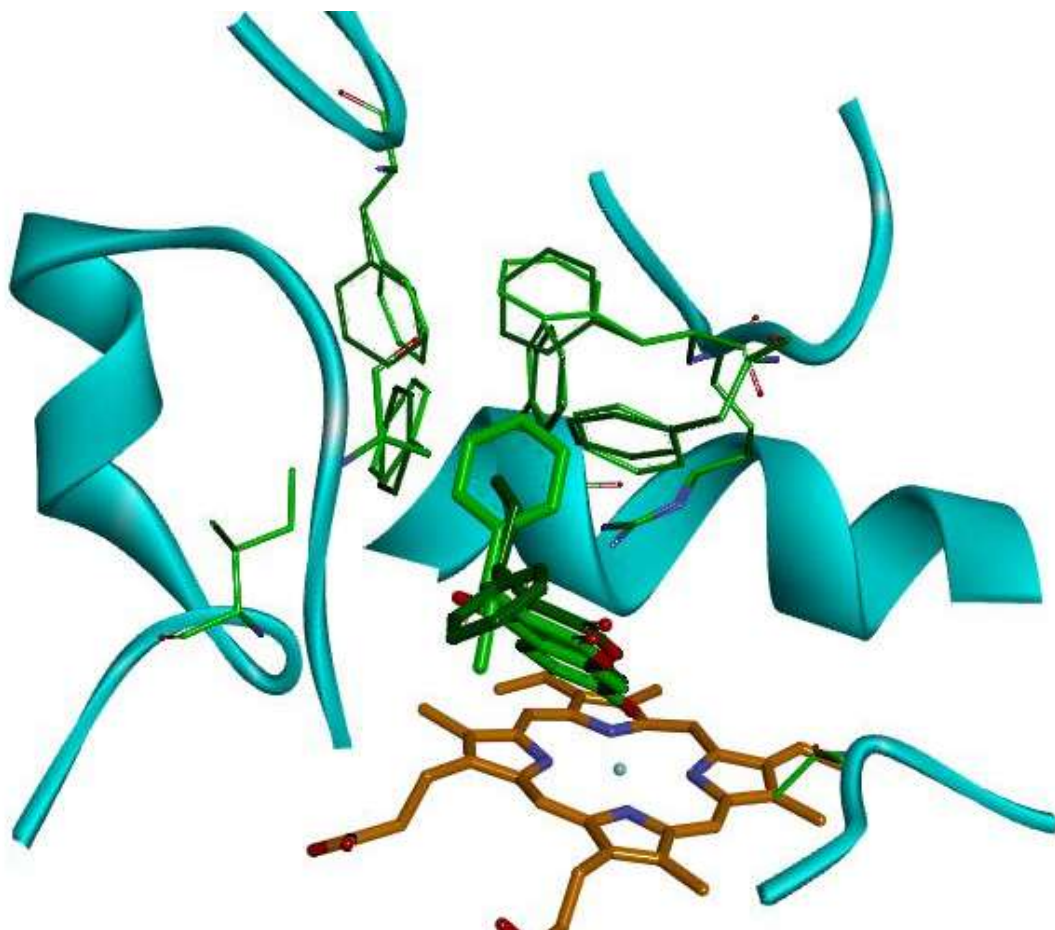
CYP2C8 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 7-OH-PPC resultantes del refinamiento



CYP2C9 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 7-OH-PPC resultantes del refinamiento



CYP2C19 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 7-OH-PPC resultantes del refinamiento



CYP3A4 y la superposición de ambas formas enantiomérica R-, S- de metabolito 7-OH-PPC resultantes del refinamiento

6.5 Energías de interacción del metabolito 7-OH-S-PPC al ser girado en la cavidad de CYP2C9 y CYP3A4

El grupo de 15 ligandos girados sobre el eje del enlace O-C del grupo hidroxil añadido fuer refinado con YetiFF. Los resultados en verde son aquellos en los que el ligando mantuvo geometría de hidroxilación tras el refinamiento.

Ángulo de giro	CYP2C9		CYP3A4	
	C-7 +OH	C-7 -OH	C-7 +OH	C-7 -OH
0°	-2.57E+002	-2.15E+002	-2.93E+002	-2.44E+002
24°	-2.57E+002	-2.14E+002	-2.95E+002	-2.43E+002
48°	-2.58E+002	-2.17E+002	-2.91E+002	-2.47E+002
72°	-2.55E+002	-2.16E+002	-3.02E+002	-2.49E+002
96°	-2.55E+002	-2.16E+002	-2.77E+002	-2.58E+002
120°	-2.55E+002	-2.24E+002	-2.72E+002	-2.53E+002
144°	-2.56E+002	-2.19E+002	-2.91E+002	-2.55E+002
168°	-2.56E+002	-2.22E+002	-2.34E+002	-2.49E+002
192°	-2.57E+002	-2.24E+002	-2.30E+002	-2.56E+002
216°	-2.58E+002	-2.18E+002	-2.96E+002	-2.49E+002
240°	-2.28E+002	-2.09E+002	-2.94E+002	-2.51E+002
264°	-2.55E+002	-2.11E+002	-2.96E+002	-2.48E+002
288°	-2.46E+002	-2.14E+002	-2.88E+002	-2.52E+002
312°	-2.56E+002	-2.22E+002	-2.85E+002	-2.49E+002
336°	-2.56E+002	-2.13E+002	-2.75E+002	-2.50E+002

7 REFERENCIAS

- [1] P. Danielson, "The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug," *Current Drug Metabolism*, vol. 3, no. 6, pp. 561-597, 2002.
- [2] S. Wöll, S. H. Kim, H. J. Greten and T. Efferth, "Animal plant warfare and secondary metabolite evolution," *Natural products and bioprospecting*, vol. 3, no. 1, pp. 1-7, 2013.
- [3] E. D. Brodie, B. J. Ridenhour and E. D. Brodie, "The evolutionary response of predators to dangerous prey: hotspots and coldspots in the geographic mosaic of coevolution between garter snakes and newts," *Evolution*, vol. 56, no. 10, pp. 2067-2082, 2002.
- [4] C. Handschin and U. A. Meyer, "Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors," *Pharmacological reviews*, vol. 55, no. 4, pp. 649-673, 2003.
- [5] F. J. Gonzalez and R. H. Tukey, "Drug metabolism," in *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11 ed., New York, McGraw-Hill, 2006, pp. 71-91.
- [6] L. Gan, L. L. von Moltke, L. A. Trepanier, J. S. Harmatz and D. J. Greenblatt, "Role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome-b5/NADH-b5 reductase in variability of CYP3A activity in human liver microsomes," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 37, no. 1, pp. 90-96, 2009.
- [7] S. Yamano, J. Tatsuno and F. J. Gonzalez, "The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes," *Biochemistry*, vol. 29, no. 5, pp. 1322-1329, 1990.
- [8] T. L. Poulos and E. F. Johnson, "Structures of Cytochrome P450 Enzymes," in *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, P. R. O. De Montellano, Ed., New York, Springer Science & Business Media, 2005, pp. 87-114.
- [9] D. Korolev, K. V. Balakin, Y. Nikolsky, E. Kirillov, Y. A. Ivanenkov, N. P. Savchuk and T. Nikolskaya, "Modeling of human cytochrome P450-mediated drug metabolism using unsupervised machine learning approach," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 46, no. 17, pp. 3631-3643, 2003.
- [10] J. Zaretski, C. Bergeron, P. Rydberg, T. W. Huang, K. P. Bennett and C. M. Breneman, "RS-Predictor: A new tool for predicting sites of cytochrome P450-mediated metabolism applied to CYP 3A4," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 51, no. 7, pp. 1667-1689, 2011.
- [11] P. R. Ortiz de Montellano, "Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes,"

- Chemical reviews*, vol. 110, no. 2, pp. 932-948, 2009.
- [12] D. R. Nelson, "The cytochrome p450 homepage," *Human genomics*, vol. 4, no. 1, pp. 59-65, 2009.
- [13] F. P. Guengerich, "Cytochrome p450 and chemical toxicology," *Chemical research in toxicology*, vol. 21, no. 1, pp. 70-83, 2007.
- [14] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity," *The AAPS journal*, vol. 8, no. 1, pp. E101-E111, 2006.
- [15] T. L. Poulos, B. C. Finzel and A. J. Howard, "High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam," *Journal of molecular biology*, vol. 195, no. 3, pp. 87-700, 1987.
- [16] R. Raag and T. L. Poulos, "Crystal structure of the carbon monoxide-substrate-cytochrome P-450CAM ternary complex," *Biochemistry*, vol. 28, no. 19, pp. 7586-7592, 1989.
- [17] M. He, K. R. Korzekwa, J. P. Jones, A. E. Rettie and W. F. Trager, "Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 372, no. 1, pp. 16-28, 1999.
- [18] C. Bathelt, R. D. Schmid and J. Pleiss, "Regioselectivity of CYP2B6: homology modeling, molecular dynamics simulation, docking," *Molecular modeling annual*, vol. 8, no. 11, pp. 327-335, 2002.
- [19] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. Prazeres, V. Vojinović, J. M. Cabral and L. P. Fonseca, "Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology," *Biotechnology annual review*, vol. 9, pp. 199-247, 2003.
- [20] X. He and P. R. Ortiz de Montellano, "Radical rebound mechanism in cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks α - and β -thujone," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 38, pp. 39479-39484, 2004.
- [21] M. Ufer, "Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 44, no. 12, pp. 1227-1246, 2005.
- [22] M. Fischer, M. Knoll, D. Sirim, F. Wagner, S. Funke and J. Pleiss, "The Cytochrome P450 Engineering Database: a navigation and prediction tool for the cytochrome P450 protein family," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 15, pp. 2015-2017, 2007.
- [23] S. B. Nabuurs, M. Wagener and J. De Vlieg, "A flexible approach to induced fit docking," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 50, no. 26, pp. 6507-6518, 2007.

- [24] A. Seifert and J. Pleiss, " Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: A systematic analysis of the substrate recognition site 5," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 74, no. 4, pp. 1028-1035, 2009.
- [25] J. A. Pavon, MECHANISM OF OXYGEN ACTIVATION AND HYDROXYLATION BY THE AROMATIC AMINO ACID HYDROXYLASES, Doctoral dissertation ed., Texas A&M University, 2009.
- [26] D. Sirim, M. Widmann, F. Wagner and J. Pleiss, " Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases," *BMC structural biology*, vol. 10, no. 1, pp. 34-46, 2010.
- [27] L. Zhang, Heme Biology: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes, 1 ed., Singapore: World Scientific, 2011.
- [28] P. Vasanthanathan, J. Lastdrager, C. Oostenbrink, J. N. Commandeur, N. P. Vermeulen, F. S. Jørgensen and L. Olsen, "Identification of CYP1A2 ligands by structure-based and ligand-based virtual screening," *MedChemComm*, vol. 2, no. 9, pp. 853-859, 2011.
- [29] A. Cecil, C. Rikanovic, K. Ohlsen, C. Liang, J. Bernhardt, T. Oelschlaeger, T. Gulder, G. Bringmann, U. Holzgrabe, M. Unger and T. Dandekar, " Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and human cells," *Genome Biol*, vol. 12, no. 3, pp. R24-R42, 2011.
- [30] E. Meléndez, "Metallocenes as target specific drugs for cancer treatment," *Inorganica chimica acta*, vol. 393, pp. 36-52, 2012.
- [31] K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, The porphyrin handbook, Singapore: World Scientific, 2012.
- [32] V. B. Urlacher and M. Girhard, "Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application," *Trends in biotechnology*, vol. 30, no. 1, pp. 26-36, 2010.
- [33] A. Seifert and J. Pleiss, " Identification of selectivity determinants in CYP monooxygenases by modelling and systematic analysis of sequence and structure," *Current drug metabolism*, vol. 13, no. 2, pp. 197-202, 2012.
- [34] J. Kirchmair, M. J. Williamson, J. D. Tyzack, L. Tan, P. J. Bond, A. Bender and R. C. Glen, " Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, no. 3, pp. 617-648, 2012.

- [35] K. H. Tiong, N. A. M. Yunus, B. C. Yiap, E. L. Tan, R. Ismail and C. E. Ong, "Inhibitory Potency of 8-Methoxypsoralen on Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) Allelic Variants CYP2A6* 15, CYP2A6* 16, CYP2A6* 21 and CYP2A6* 22: Differential Susceptibility Due to Different Sequence Locations of the Mutations," *PLoS one*, vol. 9, no. 1, p. e86230, 2014.
- [36] Ł. Gricman, C. Vogel and J. Pleiss, "Conservation analysis of class-specific positions in cytochrome P450 monooxygenases: Functional and structural relevance," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 82, no. 3, pp. 491-504, 2014.
- [37] A. E. Shilov and G. B. Shul'pin, "Activation of CH bonds by metal complexes," *Chemical Reviews*, vol. 97, no. 8, pp. 2879-2932, 1997.
- [38] K. Czarnecki, S. Nimri, Z. Gross, L. M. Proniewicz and J. R. Kincaid, "Direct Resonance Raman Evidence for a Trans Influence on the Ferryl Fragment in Models of Compound I Intermediates of Heme Enzymes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, no. 12, pp. 2929-2935, 1996.
- [39] C. Crocoll, *Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme*, Jena: der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, 2011.
- [40] K. Schwetlick, *Organikum*, Berlin: V. E. B. Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1977.
- [41] J. W. Daly, D. M. Jerina and B. Witkop, "Arene oxides and the NIH shift: the metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds," *Experientia*, vol. 28, no. 10, pp. 1129-1149, 1972.
- [42] F. P. Guengerich, "Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 409, no. 1, pp. 59-71, 2003.
- [43] H. Li, S. Narasimhulu, L. M. Havran, J. D. Winkler and T. L. Poulos, "Crystal structure of cytochrome P450cam complexed with its catalytic product, 5-exo-hydroxycamphor," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 23, pp. 6297-6299, 1995.
- [44] D. Batabyal and T. L. Poulos, "Crystal structures and functional characterization of wild-type CYP101D1 and its active site mutants," *Biochemistry*, vol. 52, no. 49, pp. 8898-8906, 2013.
- [45] M. R. Wester, J. K. Yano, G. A. Schoch, C. Yang, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 34, pp. 35630-35637, 2004.
- [46] L. Perić-Hassler, E. Stjernschantz, C. Oostenbrink and D. P. Geerke, "CYP 2D6 binding affinity

predictions using multiple ligand and protein conformations," *International journal of molecular sciences*, vol. 14, no. 12, pp. 24514-24530, 2013.

- [47] T. Scior, M. Verhoff, I. Gutierrez-Aztatzi, H. P. Ammon, S. Laufer and O. Werz, "Interference of Boswellic Acids with the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 54, no. 3, pp. 978-986, 2014.
- [48] M. R. Wester, E. F. Johnson, C. Marques-Soares, S. Dijols, P. M. Dansette, D. Mansuy and C. D. Stout, " Structure of mammalian cytochrome P450 2C5 complexed with diclofenac at 2.1 Å resolution: evidence for an induced fit model of substrate binding," *Biochemistry*, vol. 42, no. 31, pp. 9335-9345, 2003.
- [49] A. Seifert, S. Tatzel, R. D. Schmid and J. Pleiss, "Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 64, no. 1, pp. 147-155, 2006.
- [50] J. Skopalík, P. Anzenbacher and M. Otyepka, "Flexibility of human cytochromes P450: molecular dynamics reveals differences between CYPs 3A4, 2C9, and 2A6, which correlate with their substrate preferences," *The journal of physical chemistry B*, vol. 112, no. 27, pp. 8165-8173, 2008.
- [51] C. A Sotriffer, "Accounting for induced-fit effects in docking: what is possible and what is not?," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 11, no. 2, pp. 179-191, 2011.
- [52] X. Yu, V. Cojocar and R. C. Wade, "Conformational diversity and ligand tunnels of mammalian cytochrome P450s," *Biotechnology and applied biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 134-145, 2013.
- [53] D. E. Koshland Jr, "Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 44, no. 2, p. 98, 1958.
- [54] E. Fischer, "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme," *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, vol. 27, no. 3, pp. 2985-2993, 1894.
- [55] P. H. Hünenberger, M. A. E. and W. F. Van Gunsteren, "Fluctuation and cross-correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations," *Journal of molecular biology*, vol. 252, no. 4, pp. 492-503, 1995.
- [56] Y. Sheng, Y. Chen, L. Wang, G. Liu, W. Li and Y. Tang, "Effects of protein flexibility on the site of metabolism prediction for CYP2A6 substrates," *Journal of Molecular Graphics and*

Modelling, vol. 54, pp. 90-99, 2014.

- [57] I. C. Gray, C. Nobile, R. Muresu, S. Ford and N. K. Spurr, " A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24," *Genomics*, vol. 28, no. 2, pp. 328-332, 1995.
- [58] A. E. Rettie and J. P. Jones, "Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, vol. 45, pp. 477-494, 2005.
- [59] A. Mancy, P. Broto, S. Dijols, P. M. Dansette and D. Mansuy, "The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling," *Biochemistry*, vol. 34, no. 33, pp. 10365-10375, 1995.
- [60] S. F. Zhou, Z. W. Zhou, L. P. Yang and J. P. Cai, "Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development," *Current medicinal chemistry*, vol. 16, no. 27, pp. 3480-3675, 2009.
- [61] S. L. Mo, Z. W. Zhou, L. P. Yang, M. Q. Wei and S. F. Zhou, " New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1075-1126, 2009.
- [62] S. L. Mo, Z. W. Zhou, L. P. Yang, M. Q. Wei and S. F. Zhou, "New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9. Part II," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1127-1150, 2009.
- [63] J. Sridhar, J. Liu, M. Foroozesh and C. L. K. Stevens, "Insights on cytochrome p450 enzymes and inhibitors obtained through QSAR studies," *Molecules*, vol. 17, no. 8, pp. 9283-9305, 2012.
- [64] D. Van Booven, S. Marsh, H. McLeod, M. W. Carrillo, K. Sangkuhl, T. E. Klein and R. B. Altman, "Cytochrome P450 2C9-CYP2C9," *Pharmacogenetics and genomics*, vol. 20, no. 4, p. 277, 2010.
- [65] M. Pirmohamed and B. K. Park, "Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions," *Toxicology*, vol. 192, no. 1, pp. 23-32, 2003.
- [66] C. R. Lee, J. A. Goldstein and J. A. Pieper, "Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 12, no. 3, pp. 251-263, 2002.
- [67] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov and P. E. Bourne, "The protein data bank," *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000.

- [68] P. A. Williams, J. Cosme, A. Ward, H. C. Angove, D. M. Vinković and H. Jhoti, "Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin," *Nature*, vol. 424, no. 6947, pp. 464-468, 2003.
- [69] G. Brändén, T. Sjögren, V. Schnecke and Y. Xue, "Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects," *Drug discovery today*, vol. 19, no. 7, pp. 905-911, 2014.
- [70] M. Remko, R. Broer and A. Remková, "A comparative study of the molecular structure, lipophilicity, solubility, acidity, absorption and polar surface area of coumarinic anticoagulants and direct thrombin inhibitors," *RSC Advances*, vol. 4, no. 16, pp. 8072-8084, 2014.
- [71] J. Oldenburg, M. Marinova, C. Müller-Reible and M. Watzka, "The vitamin K cycle," *Vitamins & Hormones*, vol. 78, pp. 35-62, 2008.
- [72] J. K. Tie, D. Y. Jin, D. L. Straight and D. W. Stafford, "Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells," *Blood*, vol. 117, no. 10, pp. 2967-2974, 2011.
- [73] H. Auterhoff, J. Knabe and H. D. Höltje, *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*, 12 ed., Stuttgart: Wissenschaftliche verlagsgesellschaft, 1991.
- [74] I. Sugiura, B. Furie, C. T. Walsh and B. C. Furie, "Propeptide and glutamate-containing substrates bound to the vitamin K-dependent carboxylase convert its vitamin K epoxidase function from an inactive to an active state," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 17, pp. 9069-9074, 1997.
- [75] Y. van Leeuwen, *Towards Improvement*, Primera ed., Enschede: Gildeprint, 2009.
- [76] R. Wallin, S. M. Hutson, D. Cain, A. Sweatt and D. C. Sane, "A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 13, pp. 2542-2544, 2001.
- [77] B. Plietker, *Iron catalysis in organic chemistry: reactions and applications*, Primera ed., Stuttgart: John Wiley & Sons, 2008.
- [78] W. Li, S. Schulman, R. J. Dutton, D. Boyd, J. Beckwith and T. A. Rapoport, "Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase," *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 507-512, 2010.
- [79] L. S. Kaminsky and Z. Y. Zhang, "Human P450 metabolism of warfarin," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 73, no. 1, pp. 67-74, 1997.

- [80] M. Ufer, J. O. Svensson, K. W. Krausz, H. V. Gelboin, A. Rane and G. Tybring, " Identification of cytochromes P 450 2C9 and 3A4 as the major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro," *European journal of clinical pharmacology*, vol. 60, no. 3, pp. 173-182, 2004.
- [81] B. Kammerer, R. Kahlich, M. Ufer, A. Schenkel, S. Laufer and C. H. Gleiter, "Stereospecific pharmacokinetic characterisation of phenprocoumon metabolites, and mass-spectrometric identification of two novel metabolites in human plasma and liver microsomes," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 383, no. 6, pp. 909-917, 2005.
- [82] T. H. Sullivan-Klose, B. I. Ghanayem, D. A. Bell, Z. Y. Zhang, L. S. Kaminsky, G. M. Shenfield, J. O. Miners, D. J. Birkett and J. A. Goldstein, "The role of the CYP2C9-Leu 359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 6, no. 4, pp. 341-349, 1996.
- [83] Z. Y. Zhang, M. J. Fasco, L. Huang, F. P. Guengerich and L. S. Kaminsky, "Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and-Val462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis," *Cancer research*, vol. 56, no. 17, pp. 3926-3933, 1996.
- [84] L. C. Wienkers, C. J. Wurden, E. Storch, K. L. Kunze, A. E. Rettie and W. F. Trager, "Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19," *Drug metabolism and disposition*, vol. 24, no. 5, pp. 610-614, 1996.
- [85] A. E. Rettie, K. R. Korzekwa, K. L. Kunze, R. F. Lawrence, A. C. Eddy, T. Aoyama, G. H. V., F. J. Gonzalez and W. F. Trager, "Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions," *Chemical research in toxicology*, vol. 5, no. 1, pp. 54-59, 1992.
- [86] D. Cairns, *Essentials of pharmaceutical chemistry*, Cuarta ed., Padstow: Pharmaceutical Press, 2012.
- [87] P. A. Williams, J. Cosme, V. Sridhar, E. F. Johnson and D. E. McRee, "Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity," *Molecular cell*, vol. 5, no. 1, pp. 121-131, 2000.
- [88] J. Kirchheiner, M. Ufer, E. C. Walter, B. Kammerer, R. Kahlich, C. Meisel, M. Schwab, C. H. Gleiter, A. Rane, I. Roots and J. Brockmüller, " Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R-and S-phenprocoumon in healthy volunteers," *Pharmacogenetics and Genomics*, vol. 14, no. 1, pp. 19-26, 2004.
- [89] M. Ufer, B. Kammerer, R. Kahlich, J. Kirchheiner, Ü. Yasar, J. Brockmüller and A. Rane, "Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C9 causing reduced phenprocoumon (S)-7-

- hydroxylation in vitro and in vivo," *Xenobiotica*, vol. 34, no. 9, pp. 847-859, 2004.
- [90] M. Spreafico, Mixed-model QSAR at the glucocorticoid and liver X receptors, Basel: University of Basel, 2009.
- [91] A. R. Leach, B. K. Shoichet and C. E. Peishoff, "Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, no. 20, pp. 5851-5855, 2006.
- [92] A. Vedani, M. Dobler and M. Smieško, "VirtualToxLab—A platform for estimating the toxic potential of drugs, chemicals and natural products," *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 261, no. 2, pp. 142-153, 2012.
- [93] J. E. Mendieta-Wejebe, M. C. Rosales-Hernández, H. Rios, J. Trujillo-Ferrara, G. López-Pérez, F. Tamay-Cach, R. Ramos-Morales and J. Correa-Basurto, "Comparing the electronic properties and docking calculations of heme derivatives on CYP2B4," *Journal of molecular modeling*, vol. 14, no. 6, pp. 537-545, 2008.
- [94] M. C. Rosales-Hernández, J. E. Mendieta-Wejebe, J. G. Trujillo-Ferrara and J. Correa-Basurto, "Homology modeling and molecular dynamics of CYP1A1 and CYP2B1 to explore the metabolism of aryl derivatives by docking and experimental assays," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 11, pp. 4845-4855, 2010.
- [95] E. J. Mendieta-Wejebe, J. Correa-Basurto, E. M Garcia-Segovia, G. Ceballos-Cancino and M. C. Rosales-Hernandez, "Molecular modeling used to evaluate CYP2C9-dependent metabolism: homology modeling, molecular dynamics and docking simulations," *Current drug metabolism*, vol. 12, no. 6, pp. 533-548, 2011.
- [96] M. Bello, J. E. Mendieta-Wejebe and J. Correa-Basurto, "Structural and energetic analysis to provide insight residues of CYP2C9, 2C11 and 2E1 involved in valproic acid dehydrogenation selectivity," *Biochemical pharmacology*, vol. 90, no. 2, pp. 145-158, 2014.
- [97] V. A. Payne, Y. T. Chang and G. H. Loew, "Homology modeling and substrate binding study of human CYP2C9 enzyme," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 37, no. 2, pp. 176-190, 1999.
- [98] D. F. Lewis, M. Dickins, B. G. Lake and P. S. Goldfarb, " Investigation of enzyme selectivity in the human CYP2C subfamily: homology modelling of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 from the CYP2C5 crystallographic template," *Drug metabolism and drug interactions*, vol. 19, no. 4, pp. 257-286, 2003.
- [99] L. Afzelius, Computational Modelling of Structures and Ligands of CYP2C9, Uppsala:

Computational Modelling of Structures and Ligands of CYP2C9, 2004.

- [100] R. R. Ayscue, Computer Modeling of Dapsone-mediated Heteroactivation of Flurbiprofen Metabolism by CYP2C9, Primera ed., Morgantown: ProQuest, 2008.
- [101] A. Belic, M. Temesvari, K. Kohalmy, R. Vrzal, Z. Dvorak, D. Rozman and K. Monostory, "Investigation of the CYP2C9 induction profile in human hepatocytes by combining experimental and modelling approaches," *Current drug metabolism*, vol. 10, no. 10, pp. 1066-1074, 2009.
- [102] A. Vedani and M. Smiesko, "In silico toxicology in drug discovery-concepts based on three-dimensional models," *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, vol. 37, no. 5, pp. 477-496, 2009.
- [103] M. W. Linder, M. B. Homme, K. K. Reynolds, B. F. Gage, C. Eby, N. Silvestrov and R. Valdes, "Interactive modeling for ongoing utility of pharmacogenetic diagnostic testing: application for warfarin therapy," *Clinical chemistry*, vol. 55, no. 10, pp. 1861-1868, 2009.
- [104] G. Rossato, B. Ernst, M. Smiesko, M. Spreafico and A. Vedani, "robing Small-Molecule Binding to Cytochrome P450 2D6 and 2C9: An In Silico Protocol for Generating Toxicity Alerts," *ChemMedChem*, vol. 5, no. 12, pp. 2088-2101, 2010.
- [105] R. C. Braga, V. M. Alves, C. A. Fraga, E. J. Barreiro, V. de Oliveira and C. H. Andrade, "Combination of docking, molecular dynamics and quantum mechanical calculations for metabolism prediction of 3, 4-methylenedioxybenzoyl-2-thienylhydrazone," *Journal of molecular modeling*, vol. 18, no. 5, pp. 2065-2078, 2012.
- [106] J. D. Tyzack, H. Y. Mussa, M. J. Williamson, J. Kirchmair and R. C. Glen, "Cytochrome P450 site of metabolism prediction from 2D topological fingerprints using GPU accelerated probabilistic classifiers," *Journal of cheminformatics*, vol. 6, no. 1, p. 29, 2014.
- [107] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field," *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 9, pp. 1157-1174, 2004.
- [108] V. Poltev, "Molecular Mechanics: Method and Applications," in *In Handbook of Computational Chemistry*, J. Leszczynski, Ed., Dordrecht, Springer , 2012, pp. 259-291.
- [109] A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard Iii and W. M. Skiff, "UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 114, no. 25, pp. 10024-10035, 1992.
- [110] M. Eisenstein and E. Katchalski-Katzir, "On proteins, grids, correlations, and docking,"

Comptes rendus biologies, vol. 327, no. 5, pp. 409-420, 2004.

- [111] T. R. M. Lengauer, "Computational methods for biomolecular docking," *Current opinion in structural biology*, vol. 6, no. 3, pp. 402-406, 1996.
- [112] E. C. Meng, B. K. Shoichet and I. D. Kuntz, "Automated docking with grid-based energy evaluation," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 13, no. 4, pp. 505-524, 1992.
- [113] A. D. van Dijk, R. Boelens and A. M. Bonvin, "Data-driven docking for the study of biomolecular complexes," *Febs Journal*, vol. 272, no. 2, pp. 293-312, 2005.
- [114] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, Segunda ed., Essex: Pearson Education, 2001.
- [115] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew and A. J. Olson, "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function," *Journal of computational chemistry*, vol. 19, no. 14, pp. 1639-1662, 1998.
- [116] S. F. Sousa, A. J. M. Ribeiro, J. T. S. Coimbra, R. P. P. Neves, S. A. Martins, N. S. H. N. Moorthy, P. A. Fernandes and M. J. Ramos, "Protein-ligand docking in the new millennium—a retrospective of 10 years in the field," *Current medicinal chemistry*, vol. 20, no. 18, pp. 2296-2314, 2013.
- [117] K. L. Haas and K. J. Franz, "Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology," *Chemical reviews*, vol. 109, no. 10, pp. 4921-4960, 2009.
- [118] A. Vedani, D. W. Huhta and S. P. Jacober, "Metal-coordination, hydrogen-bond network formation, and protein-solvent interactions in native and complexed human carbonic anhydrase I: a molecular mechanics study," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 111, no. 11, pp. 4075-4081, 1989.
- [119] A. Vedani and D. W. Huhta, "A new force field for modeling metalloproteins," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 12, pp. 4759-4767, 1990.
- [120] J. Hénin, J. Gumbart and C. Chipot, "In silico alchemy: A tutorial for alchemical free-energy perturbation calculations with NAMD," 2014.
- [121] C. D. Christ, A. E. Mark and W. F. Van Gunsteren, "Basic ingredients of free energy calculations: a review," *Journal of computational chemistry*, vol. 31, no. 8, pp. 1569-1582, 2010.
- [122] A. Pohorille, C. Jarzynski and C. Chipot, "Good practices in free-energy calculations," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, no. 32, pp. 10235-10253, 2010.

- [123] N. Guex and M. C. Peitsch, "SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling," *Electrophoresis*, vol. 18, no. 15, pp. 2714-2723, 1997.
- [124] A. Pedretti, L. Villa and G. Vistoli, "VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 21, no. 1, pp. 47-49, 2002.
- [125] Studio, D. , *version 4.0*, San Diego: Accelrys. Inc, 2009.
- [126] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *Journal of computational chemistry*, vol. 30, no. 16, pp. 2785-2791, 2009.
- [127] A. Vedani, "Biograf3R," [Online]. Available: <http://www.biograf.ch/>.
- [128] A. Vedani and D. W. Huhta, "Algorithm for the systematic solvation of proteins based on the directionality of hydrogen bonds," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, no. 15, pp. 5860-5862, 1991.
- [129] J. Gasteiger and M. Marsili, " Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges," *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, pp. 3219-3228, 1980.
- [130] J. K. Yano, M. H. Hsu, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen," *Nature structural & molecular biology*, vol. 12, no. 9, pp. 822-823, 2005.
- [131] S. C. Gay, A. G. Roberts, K. Maekawa, J. C. Talakad, W. X. Hong, Q. Zhang, C. D. Stout and J. R. Halpert, "Structures of cytochrome P450 2B4 complexed with the antiplatelet drugs ticlopidine and clopidogrel," *Biochemistry*, vol. 49, no. 40, pp. 8709-8720, 2010.
- [132] J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 37, pp. 38091-38094, 2004.
- [133] R. L. Reynald, S. Sansen, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structural Characterization of Human Cytochrome P450 2C19 active site differences between P450s 2C8, 2C9, AND 2C19," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 53, pp. 44581-44591, 2012.
- [134] G. A. Schoch, J. K. Yano, S. Sansen, P. M. Dansette, C. D. Stout and E. F. Johnson, " Determinants of cytochrome P450 2C8 substrate binding structures of complexes with montelukast, troglitazone, felodipine, and 9-cis-retinoic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 25, pp. 17227-17237, 2008.

- [135] S. Y. Yang, "Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances," *Drug discovery today*, vol. 15, no. 11, pp. 444-450, 2010.
- [136] R. Jäger, "Quantification and localization of molecular hydrophobicity," Technischen Universität Darmstadt, Darmstadt, 2000.
- [137] S. Preissner, K. Kroll, M. Dunkel, C. Senger, G. Goldsobel, D. Kuzman and R. Preissner, "SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 1, pp. D237-D243, 2010.
- [138] G. A. Schoch, J. K. Yano, M. R. Wester, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson, "Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8 Evidence for a peripheral fatty acid binding site," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 10, pp. 9497-9503, 2004.
- [139] I. F. Sevrioukova and T. L. Poulos, "Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 43, pp. 18422-18427, 2010.
- [140] G. N. Kumar, A. D. Rodrigues, A. M. Buko and J. F. Denissen, "Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 277, no. 1, pp. 423-431, 1996.
- [141] D. W. Cameron, M. Heath-Chiozzi, S. Danner, C. Cohen, S. Kravcik, C. Maurath, E. Sun, R. Henry, R. Rode, A. Potthoff, J. Leonard and A. H. D. R. S. Group, "Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease," *The Lancet*, vol. 351, no. 9102, pp. 543-549, 1998.