



Universidad de Guanajuato

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Posgrado en Química

**Diseño *in silico* de nuevos compuestos orgánicos
con posible actividad anticancerígena**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctor en Química

Presenta:

Q. Luis Jesús Córdova Bahena

Asesor: Dr. Juvencio Robles García

Guanajuato, Gto. junio de 2017.

Artículos publicados o enviados relacionados con esta tesis

- 1) *Spirochromone-chalcone conjugates as antitubercular agents: synthesis, bio evaluation and molecular modeling studies*, M. Mujahid, P. Yogeewari, D. Sriram, U. M. V. Basavanag, Erik Diaz-Cervantes, **Luis Cordoba-Bahena**, Juvencio Robles, R. G. Gonnade, M. Karthikeyan, Renu Vyasa and M. Muthukrishnan, *RSC Adv.*, **5**, 106448–106460, (2015). DOI: 10.1039/c5ra21737g.
- 2) *In silico, synthesis and biological investigations of Pyrrolo-[3,4-c]pyrrole hydroxamic acid derivatives as potential anticancer agents*, by **Luis Bahena**, Carlos Cervantes, Karla J Soto-Arredondo, Minerva Martínez-Alfaro, Natanael Zarco, Marco A. García-Revilla, Yolanda Alcaraz-Contreras, Lourdes Palma Tirado, Miguel A. Vázquez, and Juvencio Robles*, *J. Mex. Chem. Soc.* (2017), submitted.

Trabajos relacionados con esta tesis presentados en Congresos:

- 1) *Acoplamiento molecular in silico de SAHA en HDAC. Planteamiento de una metodología computacional adecuada desde la mecánica molecular, pasando por métodos semiempíricos hasta la Teoría de Funcionales de la Densidad*; Luis Córdoba Bahena, Manuel Villanueva García, Marco Antonio García Revilla, Miguel Ángel Vázquez Guevara y **Juvencio Robles**, *XLVIII Congreso Mexicano de Química (SQM)*, 31 de agosto al 4 de septiembre de 2013, Guanajuato, Gto.
- 2) *Diseño in silico de fármacos contra el cáncer*, Luis Bahena, Miguel A. Vázquez, Marco Revilla, Minerva Martínez-Alfaro y **Juvencio Robles**, *II Encuentro Anual de Estudiantes: Investigación e Innovación en la DCNE 2015*, 28-30 octubre 2015, Guanajuato, GTO.
- 3) *Cribado Virtual: Fármacos contra Cáncer*, Luis Bahena, Marco Revilla, Miguel A. Vázquez, Minerva Martínez-Alfaro y **Juvencio Robles**, *III Encuentro Anual de Estudiantes: Innovación e Investigación en la DCNE*, 26-27 octubre 2016, Guanajuato, GTO.
- 4) *Cribado in silico: Fármacos contra cáncer*, L. Bahena, M.A. García-Revilla, M. Martínez-Alfaro, M. A. Vázquez-Guevara, y **Juvencio Robles**, *XV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica*, 17 al 19 de noviembre de 2016, Mérida, Yuc.

Jurado asignado

1. DR. MIGUEL ANGEL VÁZQUEZ GUEVARA. (Presidente)
2. DR. MARCO ANTONIO GARCÍA REVILLA (Secretario)
3. DRA. LUZ MARIA RODRIGUEZ VALDEZ (Vocal, Fac. de Ciencias Químicas, UACH)
4. DRA. MINERVA MARTÍNEZ ALFARO (Vocal).
5. DR. ERIK DIAZ CERVANTES (Vocal, IF-UASLP).
6. DR. GUSTAVO CRUZ JIMÉNEZ (Suplente).

DR. AGUSTÍN RAMÓN URIBE RAMÍREZ
DIRECTOR
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO.

Por medio de la presente hago de su conocimiento que el trabajo de TESIS DE DOCTORADO intitulado "*Diseño in silico de nuevos compuestos orgánicos con posible actividad anticancerígena*" que presenta el **Q. Luis Jesús Córdova Bahena**, fue realizado bajo mi supervisión en mi laboratorio en esta DCNE y confirmo que es un trabajo de investigación original, por lo que considero que reúne los requisitos académicos para obtener el **GRADO DE DOCTOR EN QUIMICA** y no tengo inconveniente en autorizar su defensa oral.

Agradeciéndole de antemano la atención que se sirva brindar a la presente, quedo de usted,

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"

DR. JUVENCIO ROBLES GARCIA
PROFESOR TITULAR "C".

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Proyecto del Dr. Juvencio Robles: CB-2011/168474). Agradezco la beca otorgada por CONACYT (265238) para realizar el doctorado. También agradecemos al Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y de Estructura Molecular (UG-UAA-CONACYT, Proyecto 123732) por el tiempo de cómputo facilitado (CLUSTER SUPERCÓMPUTO “PIPILA”). Agradecemos la donación de las líneas celulares a la Dra. Minerva Martínez, donadas por la Dra. Carmen Aceves del INB-UNAM, Juriquilla. También agradecemos la asistencia técnica del Ing. Adán Bazan, Evelyn Flores y Nydia Hernández.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera formaron parte de este Proyecto:

Dra. Alexandra Carvalho, Lic. Carlos Cervantes, Dr. Erik Díaz, Dr. Gustavo Cruz, Profesora Lynn Kamerlin, Dr. Manuel Villanueva, Dr. Marco Revilla, Dra. Luz María Rodríguez, Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara, Dra. Minerva Martínez Alfaro y Dr. Juvencio Robles.

Esta Tesis está dedicada a Manuel Villanueva, porque todavía podemos decir una vez más.

Índice.

Índice.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	X
Índice de esquemas.....	X
Índice de gráficas.....	XI
Tabla de abreviaturas.....	XI
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XVI
CAPÍTULO 1.- Introducción.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Genética del cáncer.....	1
1.1.1.1 Epigenética.....	2
1.1.1.2 Histonas.....	3
1.1.1.2.1 Acetiltransferasas de Histonas y Desacetilasas de Histonas.....	3
1.1.1.2.2 Desacetilasas de Histonas.....	4
1.1.1.2.3 Localización subcelular.....	5
1.1.1.2.4 Mecanismo de acción de los Inhibidores de Desacetilasas de Histonas.....	5
1.2 Química Teórica y Computacional.....	9
1.2.1 Química Teórica.....	9
1.2.1.1 Química Computacional.....	10
1.2.2 Diseño de fármacos.....	12
1.2.3 Diseño Racional de Fármacos.....	12
1.2.4 Diseño de fármacos basado en el receptor.....	13
1.2.5 Interacciones moleculares proteína - fármaco.....	13
1.2.6 Mecánica Molecular.....	14
1.2.7 Simulación de Dinámica Molecular.....	15
1.2.8 Generación de Farmacóforo.....	16
1.2.9 Acoplamiento Moleculares (<i>Docking</i>).....	16
1.2.10 Algoritmo de búsqueda y Función de evaluación.....	17
CAPÍTULO 2.- Hipótesis y Objetivos.....	20
2.1 Hipótesis.....	20
2.2 Objetivo.....	20

2.3 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 3.- Metodología	21
3.1 Simulaciones de Dinámica Molecular.....	21
3.2 Generación de farmacóforo.....	23
3.3 Acoplamiento moleculares <i>in silico</i>	24
CAPÍTULO 4.- Resultados y Discusión	26
4.1 Simulaciones de Dinámica Molecular.....	26
4.1.1 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC2	26
4.1.2 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC4	30
4.1.3 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC7	34
4.1.4 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC8	38
4.2 Generación de modelos de Farmacóforo.....	42
4.2.1 Modelo de Farmacóforo de HDAC2.....	42
4.2.2 Modelo de farmacóforo de HDAC4.....	44
4.2.3 Modelo de farmacóforo de HDAC7.....	46
4.2.4 Modelo de farmacóforo de HDAC8.....	48
4.3 Acoplamiento Moleculares <i>in silico</i> (Docking).....	50
4.3.1 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC2, HDAC2i.....	50
4.3.2 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC4, HDAC4i.....	56
4.3.3 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC7, HDAC7i.....	62
4.3.4 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC8, HDAC8i.....	68
4.4 Acoplamiento moleculares <i>in silico</i> para definir la selectividad.....	75
4.5 Acoplamiento <i>in silico</i> de una serie de 3 moléculas PAB y comparación con SAHA. ...	77
CAPÍTULO 5.- Conclusiones.....	82
CAPÍTULO 6.- Perspectivas	83
CAPÍTULO 7.- Bibliografía.....	84
APÉNDICE A.....	89
APÉNDICE B.....	91
APÉNDICE C.....	93

Índice de figuras

Figura 1. Niveles de organización del cromosoma..	4
Figura 2. Modelo esquemático del sitio activo de HDAC8.	6
Figura 3. Cinco HDACi co-cristalizados en HDAC8..	7
Figura 4. Modelo de farmacóforo para inhibidores de Desacetilasas de Histonas.....	7
Figura 5. Diversos fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos para su empleo en linfoma cutáneo de células tipo T.	8
Figura 6. Residuos de interés presentes en el sitio activo de las isoformas seleccionadas.	23
Figura 7. Ligandos co-cristalizados experimentalmente en color blanco y mejor pose obtenida por medio de acoplamiento molecular <i>in silico</i> en color gris en cada una de las isoformas de HDAC seleccionadas.....	25
Figura 8. Residuos que componen el sitio activo de HDAC2.....	26
Figura 9. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 145 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 145 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.	27
Figura 10. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 208 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.	28
Figura 11. Distancias entre el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición para durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.	28
Figura 12. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.	29
Figura 13. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.....	30
Figura 14. Residuos que componen el sitio activo de HDAC4. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).	31
Figura 15. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 802 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 802 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.....	31
Figura 16. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 803 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 803 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.....	32
Figura 17. Distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado más cercano al esqueleto de la proteína de Arginina 798 y el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 870 (línea naranja), distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado más alejado del esqueleto de la proteína de Arginina	

803 y el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 870 (línea azul) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado y con carga de Arginina 798 y el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 870 (línea verde) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.	33
Figura 18. Distancias entre el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición para durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.	33
Figura 19. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 675 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 675 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.	34
Figura 20. Residuos que componen el sitio activo de HDAC7. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).	35
Figura 21. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.	35
Figura 22. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 670 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.	36
Figura 23. Distancias entre el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 679 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 en posición para durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.	37
Figura 24. Distancias entre uno de los átomos de Oxígeno de Aspartato 626 y el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 738 (línea naranja) y distancias entre otro de los átomos de Aspartato 626 y el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.	37
Figura 25. Residuos que componen el sitio activo de HDAC8. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).	38
Figura 26. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 142 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 142 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.	39
Figura 27. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 143 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 143 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.	40
Figura 28. Distancias entre el átomo de Carbono en posición para de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición para durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.	40
Figura 29. Distancias entre el primer átomo de Oxígeno de Aspartato 104 y el átomo de Carbono del esqueleto de la proteína de Fenilalanina 207 (línea naranja) y distancias entre el segundo átomo de Oxígeno de Aspartato 104 y el átomo de Carbono del esqueleto de la proteína de Fenilalanina 207 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.	41

Figura 30. Distancia entre los átomos de Oxígeno de Tirosina 100 y átomo de carbono del esqueleto de la proteína de Fenilalanina 207 durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.	41
Figura 31. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC2.....	43
Figura 32. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC4.....	45
Figura 33. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC7.....	47
Figura 34. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC8.....	49
Figura 35. Secciones del modelo de farmacóforo propuesto en el sitio activo de HDAC2.	51
Figura 36. Sitio y modo de unión de SAHA y moléculas 221 y 321 en HDAC2.....	56
Figura 37. Secciones del modelo de farmacóforo propuesto en el sitio activo de HDAC4.	57
Figura 38. Sitio y modo de unión de SAHA, moléculas PAB 11, 31, 41, 51 y ligando co-cristalizado en HDAC4.....	61
Figura 39. Secciones del modelo de farmacóforo propuesto en el sitio activo de HDAC7.	62
Figura 40. Sitio y modo de unión de SAHA y 11 moléculas PAB en HDAC7.	67
Figura 41. Secciones del modelo de farmacóforo propuesto en el sitio activo de HDAC8.	69
Figura 42. Sitio y modo de unión de SAHA y 4 moléculas PAB en HDAC8.	74
Figura 43. Molécula PAB 1311 acoplada en las isoformas HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8.	76
Figura 44. Moléculas PAB acopladas en 3 isoformas de HDAC.....	77
Figura 45. Modelo de farmacóforo basado en el ligando, incluye tres secciones.....	79
Figura 46. SAHA y 9c bloqueando el túnel que comprende el sitio activo de HDAC6.	79
Figura 47. Superficie de lipofilicidad del sitio activo de HDAC6.	80
Figura 48. Niveles de acetilación de la histona H3.	81

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros del Potencial Lineal a Tramos, PLP.	19
Tabla 2. Residuos con errores estructurales en las proteínas obtenidas de Protein Data Bank	21
Tabla 3. Datos sobre la preparación de los sistemas para la simulación de Dinámica Molecular. ...	22
Tabla 4. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de SAHA y 16 moléculas PAB acopladas en HDAC2.....	54
Tabla 5. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de SAHA y 16 moléculas PAB acopladas en HDAC4.....	59
Tabla 6. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de SAHA y 16 moléculas PAB acopladas en HDAC7.....	65
Tabla 7. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de SAHA, TSA y 16 moléculas PAB acopladas en HDAC8.	72
Tabla 8. Energías de interacción (kcal / mol) de 4 moléculas PAB acopladas en 4 Isoformas de HDAC.	75
Tabla 9. Energías* del acoplamiento entre moléculas 9a , 9b , 9c y SAHA en 5 isoformas de HDAC.	80
Tabla 10. Concentraciones inhibitorias al 50 % de SAHA y 9c en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MD-MB-231.	81

Índice de esquemas

Esquema 1. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC2.....	53
Esquema 2. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC4.....	59
Esquema 3. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC7.....	64
Esquema 4. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC8.....	70

Índice de gráficas

Gráfica 1. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC2. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC2, mientras que las barras en color naranja oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la energía de interacción de las moléculas PAB. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC2, mientras que las barras en color naranja claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB.	55
Gráfica 2. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC4. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC4, mientras que las barras en color azul oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 7 representan la energía de interacción de las moléculas PAB, la de la columna 8 corresponde al ligando co-cristalizado. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC4, mientras que las barras en color azul claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 7 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB, la de la columna 8 corresponde al ligando co-cristalizado.....	60
Gráfica 3. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC7. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC7, mientras que las barras en color azul oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la energía de interacción de las moléculas PAB. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC7, mientras que las barras en color azul claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB.	66
Gráfica 4. Energías de acoplamiento y Eficiencias del ligando normalizadas de SAHA, TSA y las moléculas PAB propuestas en HDAC8. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC8, mientras que las barras en color verde oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 18 representan la energía de interacción de las moléculas PAB y TSA. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC8, mientras que las barras en color verde claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 18 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB y TSA.	74

Tabla de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DM	Dinámica Molecular
EFC	Energía del Fragmento Cubierta
EFE	Energía del Fragmento Espaciador
EFQ	Energía del Fragmento Quelante
EH	Enlaces de Hidrógeno
EL	Eficiencia del Ligando
ELN	Eficiencia del Ligando Normalizada
ET	Energía Total
ETN	Energía Total Normalizada
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FC	Grupo de Cubierta
FE	Grupo Espaciador
FQ	Grupo de Coordinación
GF	Generación de Farmacóforo
GROMACS	<i>GRoningen MACHine for Chemical Simulations</i>
GEMDOCK	<i>Generic Evolutionary Method for Molecular Docking</i>
HAT	Histona Acetil Transferasa
HDAC	Desacetilasas de Histonas
HDACi	Inhibidores de Desacetilasas de Histonas
H3	Histona 3
Hd	Enlaces de Hidrógeno dirigidos
Hnd	Enlaces de Hidrógeno no dirigidos
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50 %
IE	Interacciones Electrostáticas
PM3	<i>Parameterized Model number 3</i>
pH	Potencial de Hidrógeno
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> , Desviación Cuadrática Media

SAHA	Ácido suberoilánilida Hidroxámico
TSA	Tricostatin A
TFD	Teoría de Funcionales de la Densidad
Zn	Zinc
9a	2-(1,3-dioxo-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrol[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxiacetanamida
9b	4-(1,3-dioxo-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrol[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxiбутanamida
9c	6-(1,3-dioxo)-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrol[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxihexanamida
Asp	Ácido Aspártico
Arg	Arginina
His	Histidina
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

Resumen

El equilibrio entre las proteínas Histona Acetiltransferasas y las proteínas Desacetilasas de Histonas juega un papel crítico en la expresión génica. Desde el punto de vista de la Epigenética, la familia de proteínas Desacetilasas de Histonas (HDAC), es uno de los blancos biológicos más atractivos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. En 2006 se aprobó por la FDA el uso del Ácido Suberoilánilida Hidroxámico (SAHA) para el tratamiento de linfomas cutáneos de células T y a partir de entonces ha sido aprobado el uso de otros fármacos derivados de ácidos hidroxámicos. El mecanismo de SAHA y otros inhibidores de HDAC (HDACi) derivados de ácidos hidroxámicos es conocido, actúan bloqueando el sitio activo de las distintas isoformas de HDAC a través de una coordinación con el átomo de zinc que se encuentra en el túnel que compone el sitio activo. Las estructuras tridimensionales de al menos 4 de las 10 isoformas de HDAC se encuentran disponibles en la base de datos *Protein Data Bank*.

La combinación de las metodologías computacionales con la información estructural de los blancos biológicos ha permitido dirigir el diseño de fármacos en aras de aumentar las probabilidades de éxito. En este proyecto hemos implementado una metodología computacional para generar modelos de farmacóforo basados en el receptor y hemos obtenido modelos de farmacóforo para cuatro isoformas de HDAC: HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8. Además, hemos propuesto una serie de 23 moléculas con probable actividad biológica como HDACi, también se ha comparado su sitio y modo de unión con el de SAHA. Cuatro de las moléculas propuestas son selectivas hacia la isoforma HDAC8.

Durante el desarrollo de este proyecto se realizó un proceso de cribado virtual en el cuál se emplearon como filtros los modelos de farmacóforo propuestos y posteriormente los acoplamientos moleculares *in silico* de las moléculas que quedaban en cada una de las isoformas disponibles de HDAC. Las moléculas utilizadas para este proceso fueron sintetizadas por el grupo de Química Orgánica liderado por el Dr. Vázquez-Guevara y evaluadas por la Dra. Martínez-Alfaro, ambos investigadores de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. El resultado más sobresaliente de esta colaboración ha sido la selección de la molécula 6-(1,3-dioxo)-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrolo[3,4-c]pirrol-2(1H)-il-N-hidroxi hexanamida (**9c**), que fue evaluada en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MD-MB-231 con resultados que confirman que la metodología computacional utilizada fue exitosa en su capacidad predictiva.

Uno de los métodos más usados para medir la supervivencia y proliferación celular son los ensayos MTT, que se basan en la reducción de un compuesto de Bromuro a formazano, realizada por una

enzima mitocondrial. Los resultados de los ensayos MTT muestran que la concentración inhibitoria al 50 % (IC_{50}) de **9c** es del mismo orden de magnitud que la de SAHA en la línea celular MCF7. El valor de IC_{50} de SAHA en MCF7 es igual a 2.1 ± 0.3 y el valor de IC_{50} de **9c** es igual a 7.6 ± 0.7 , mientras que en la línea celular MD-MB-231 el valor de IC_{50} de SAHA es igual a 3.1 ± 0.3 y el valor de IC_{50} de **9c** es igual a 1.6 ± 0.2 . En otras palabras, **9c** es un inhibidor de HDAC, el doble de potente que el fármaco comercial SAHA en el caso de la línea celular MD-MB-231. Además, se midió la acetilación de la histona 3 (H3) en presencia de SAHA, en presencia de **9c** y en ausencia de las drogas como control para corroborar que el mecanismo de acción de **9c** fuera el mismo que el de SAHA. Los resultados apoyan este mecanismo de acción para **9c**, dado que los niveles de acetilación de H3 son elevados en presencia de SAHA y mayores aún en presencia de **9c**, mientras que para el grupo de control son muy bajos (ver Figura I).

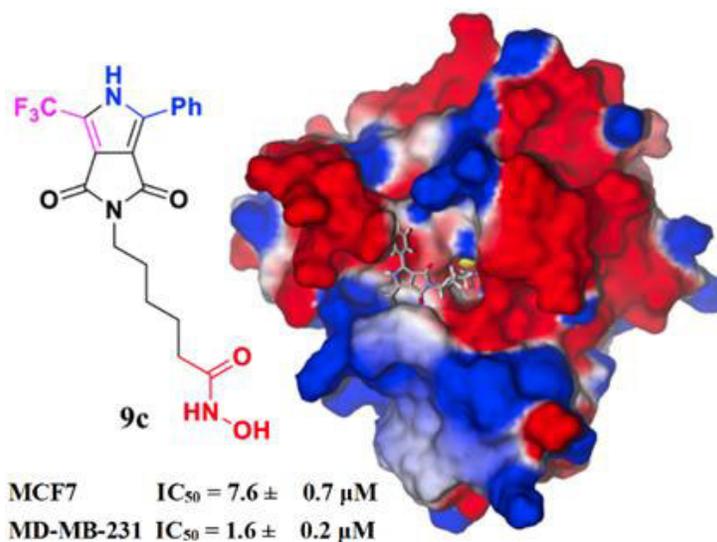


Figura I. **9c** en HDAC8.

Abstract

The balance between Histone Acetyltransferases and Histone Deacetylase proteins play a critical role in gene expression. From the point of view of Epigenetics, the family of histone deacetylases (HDAC) proteins is one of the most attractive biological targets for the treatment for cancer, the reason is that proteins are overexpressed in different kinds of cancer. The suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) was the first histone deacetylase inhibitor approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of cutaneous T cell lymphoma CTCL on October of 2006. The mechanism of SAHA and other HDAC inhibitors (HDACi) derived from hydroxamic acids is known, it acts by blocking the active site of the various HDAC isoforms by the chelation of the zinc atom found in the tunnel that makes up the active site. The three-dimensional structures of at least 4 of the 10 HDAC isoforms are available in the *Protein Data Bank*.

The combination of computational methodologies with the structural information of biological targets has led to the design of drugs in order to increase the chances of success. In this project we have implemented a computational methodology to generate pharmacophore models based on the receptor and have obtained pharmacophore models for four HDAC isoforms: HDAC2, HDAC4, HDAC7 and HDAC8. In addition, we have proposed a series of 23 molecules with probable biological activity as HDACi and compared their site and mode of union with that of SAHA. Four of the proposed molecules are selective towards the HDAC8 isoform.

During the development of this project a virtual screening process was carried, in that process pharmacophore models and molecular docking in the available HDAC isoforms were used as filters. The molecules used for this process were synthesized by the group of Organic Chemistry led by Dr. Vázquez-Guevara and evaluated by Dr. Martínez-Alfaro, both researchers of the División de Ciencias Naturales y Exactas of the University of Guanajuato. The most outstanding result of this collaboration was the selection of the 6-(1,3-dioxo)-4-phenyl-6-(trifluoromethyl)-3,5-dihydropyrrolo [3,4-c] pyrrol-2- 1H) -yl-N-hydroxyhexanamide (**9c**), which was evaluated in breast cancer cell lines MCF7 and MD-MB-231, the results confirms the computational methodology used was successful with predicting capability.

One of the most widely used methods for measuring cell survival and proliferation is the MTT assays, which rely on the reduction of a Bromide to a formazan compound, performed by a mitochondrial enzyme. The results of the MTT assays show that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of **9c** is on the same order of magnitude than SAHA in the MCF7 cell line. The SAHA IC_{50} value in MCF7 is equal to 2.1 ± 0.3 and the IC_{50} value of **9c** is equal to 7.6 ± 0.7 , while in the cell line MD-

MD-MB-231 the SAHA IC_{50} value is equal to 3.1 ± 0.3 and the IC_{50} value of **9c** is equal to 1.6 ± 0.2 . In other words, **9c** is an HDAC inhibitor, twice as potent as the commercial drug SAHA in the case of the MD-MB-231 cell line. In addition, the acetylation of histone 3 (H3) was measured in the presence of SAHA and **9c** and in the absence of the drugs as a control to corroborate that the mechanism of action of **9c** was the same as that of SAHA. The results support this mechanism of action for **9c**, since H3 acetylation levels are elevated in the presence of SAHA and even higher in the presence of **9c**, whereas for the control group they are very low (see Figure I).

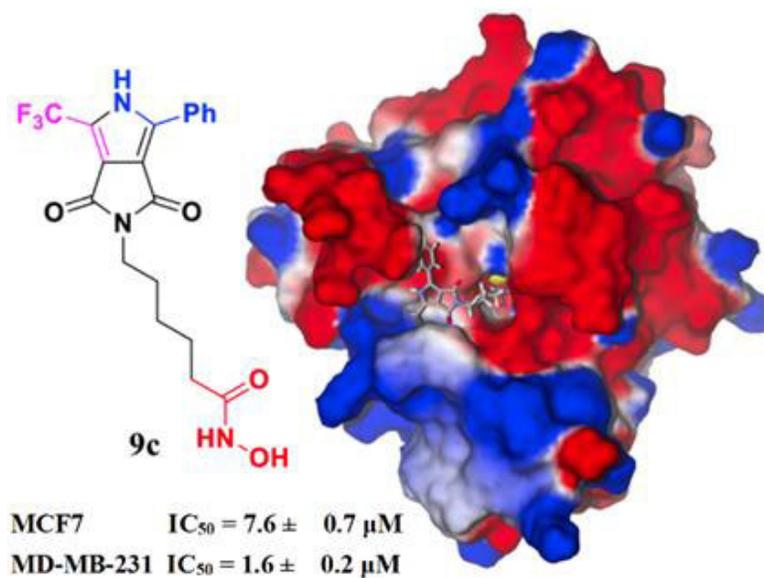


Figure I. **9c** in HDAC8.

Diseño *in silico* de nuevos compuestos orgánicos con posible actividad anticancerígena.

«La diferencia entre genética y epigenética probablemente puede compararse con la diferencia que existe entre escribir y leer un libro. Una vez que el libro ha sido escrito, el texto (los genes o la información almacenada en el ADN) será el mismo en todas las copias que se distribuyan entre los lectores. Sin embargo, cada lector podría interpretar la historia del libro de una forma ligeramente diferente, con sus diferentes emociones y proyecciones que pueden ir cambiando a medida que se desarrollan los capítulos. De una forma muy similar, la epigenética permitiría diferentes interpretaciones de un molde fijo (el libro o código genético) y resultaría en diferentes lecturas, dependiendo de las condiciones variables en las que se interprete el molde.»

Thomas Jenuwein.

CAPÍTULO 1 - Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de causas múltiples, que se caracteriza por: reproducción incontrolada de las células, falta de diferenciación celular y metástasis. Es causado por alteraciones genéticas y epigenéticas provocadas por factores hereditarios y ambientales. Estas alteraciones desregulan las vías de reproducción y diferenciación celular que provoca el desarrollo de cáncer. Otros términos aceptados para referirse a este grupo de enfermedades son tumor maligno, carcinogénesis y neoplasma (WHO, 2015).

Cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 se presentaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes a consecuencia de ello. Se prevé que el número de casos anuales de cáncer aumentará un 70 % en las próximas dos décadas (WHO, 2014).

1.1.1 Genética del cáncer

A nivel molecular, el desarrollo neoplásico tiene su origen en la acumulación de mutaciones que producen distintas alteraciones en la regulación del ciclo celular, el procesamiento del ácido desoxirribonucleico, (ADN), dañado y los mecanismos de apoptosis. Los cambios genéticos que

contribuyen al desarrollo de cáncer, afectan principalmente tres tipos de genes: proto oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN (NCI, 2016).

Los protooncogenes son genes cuyos productos promueven el crecimiento y división de la célula. Cuando las células dejan de dividirse, los protooncogenes son inactivados por genes supresores. En algunas células cancerosas, uno o más protooncogenes están alterados de manera tal que su actividad no puede ser controlada. Cuando un protooncogén está mutado o se expresa incorrectamente, y contribuye al desarrollo de cáncer, se denomina oncogén (gen que causa cáncer) (Khan *et al.*, 2006).

Un gen supresor tumoral es un gen que reduce la probabilidad de que una célula se transforme en cancerosa. En las células sanas, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño al ADN o a señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular. Cuando los genes supresores de tumores están mutados o son inactivos, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular, o son incapaces de realizar la apoptosis si el daño del ADN es demasiado importante (Weinberg, 1996).

Los genes reparadores de ADN no contribuyen directamente al crecimiento ni a la división celular, sino que actúan de manera indirecta, corrigiendo los errores que se producen durante el proceso de división celular. Las mutaciones en los genes reparadores de ADN provocan un déficit del mantenimiento de la estabilidad del genoma. Si los errores en la secuencia de ADN introducidos accidentalmente durante la replicación o como consecuencia del daño oxidativo o radicales libres no se reparan, se producen mutaciones que pueden recaer sobre los propios genes supresores de tumores. Se ha asociado la mutación de estos genes con diversas enfermedades y ciertos tipos de cáncer (Epstkin *et al.*, 1966; Goto, 1997).

Otra forma de producir alteraciones en las secuencias de ADN (alteraciones genéticas), es el daño al ADN. Factores ambientales (radiaciones ionizantes y UV, sustancias tóxicas) o endógenos (metilaciones) pueden producir daños al ADN, por ejemplo: oxidación de bases, rupturas simples y dobles, aductos en el ADN, etcétera. Estas lesiones son generalmente reparadas por varias proteínas. Algunas reconocen el daño, otras desenrollan el ADN, otras rompen las bases y algunas sintetizan el ADN. Se han encontrado alteraciones genéticas en familias con predisposición a diferentes tipos de cáncer que tienen alteraciones en estos genes, como son el cáncer de seno con alteraciones en el gen BRCA, o el síndrome de ataxia-telangiectasia con predisposición al cáncer y mutación en gen ATM.

1.1.1.1 Epigenética

La epigenética estudia los factores que alteran la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN. La mayoría de estas alteraciones epigenéticas corresponden a modificaciones de la cromatina (acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones) que pueden ser causadas por el ambiente y que se piensa son la forma de regulación en la que el ambiente influye en la expresión génica. La epigenética es el área de estudio que se ocupa de los cambios reversibles del ADN o alguna de sus proteínas asociadas. Por consiguiente, la información epigenética no afecta la secuencia de bases del ADN (genoma). En otras palabras, los cambios epigenéticos influyen en el fenotipo sin alterar el genotipo (Lewin, 2004).

El inicio y progreso del cáncer, tradicionalmente visto como una enfermedad genética, es ahora entendido también como consecuencia de una serie de alteraciones epigenéticas (Sharma *et al.*, 2010).

Los cambios epigenéticos pueden darse por modificaciones covalentes al ADN o a alguna de sus proteínas asociadas, por ejemplo, la adición de grupos funcionales metilo, acetilo o fosfato. Estos cambios tienen repercusiones en la regulación transcripcional, tales como la activación, inhibición o modificación de la expresión de genes, contribuyendo a patologías como el cáncer.

En los últimos años se ha despertado un interés creciente por el estudio de los procesos epigenéticos en búsqueda de dianas terapéuticas (Moss and Wallrath, 2007; Rodenhiser and Mann, 2006; Sigalotti *et al.*, 2007).

1.1.1.2 Histonas

El ADN humano tiene una longitud de 1.8 metros, para confinar el material genético en el núcleo, las células emplean unas proteínas llamadas histonas, alrededor de las cuales se enrolla el ADN. Las histonas son proteínas pequeñas que contienen una hebra rica en grupos amino terminales con carga positiva que interacciona con el ADN (Lenfant *et al.*, 1996). Las histonas se organizan en octámeros. Cada octámero de histonas se denomina nucleosoma (Luger *et al.*, 1997). Estos nucleosomas, a su vez, se disponen en una estructura compacta llamada cromosoma. El ADN en forma compacta debe soltarse de las histonas para poder darse la traducción a la proteína necesaria. De este modo, las histonas juegan un papel que va más allá de una simple función estructural. En realidad, se convierten en reguladores de la transcripción, a través de modificaciones postraduccionales. Las proteínas histonas desacetilasas son modificadores de la expresión génica, que no alteran ninguna secuencia de ADN. Pertenecen a los factores epigenéticos que pueden activar o reprimir secuencias de ADN. El ADN está estructurado en nucleosomas, formado por histonas que son modificadas covalentemente.

Una de las modificaciones más conocidas es la acetilación de histonas. Esta modificación está asociada a una activación de la transcripción. La acetilación está regulada por dos diferentes proteínas, las acetilasas y las desacetilasas.

1.1.1.2.1 Acetiltransferasas de Histonas y Desacetilasas de Histonas

Una de las modificaciones postraduccionales más importantes en las células eucariotas, es la acetilación y la desacetilación de residuos de lisina de las histonas y está regulada por dos familias de enzimas llamadas acetiltransferasas de histonas, HAT, y desacetilasas de histonas, HDAC (Mottet and Castronovo, 2008). En general, se puede decir que la desacetilación de histonas está relacionada en términos prácticos con la represión del gen, mientras que la acetilación se relaciona con los procesos contrarios, exhibición y transcripción de ADN, es decir, con la expresión del gen (ver **Figura 1**).

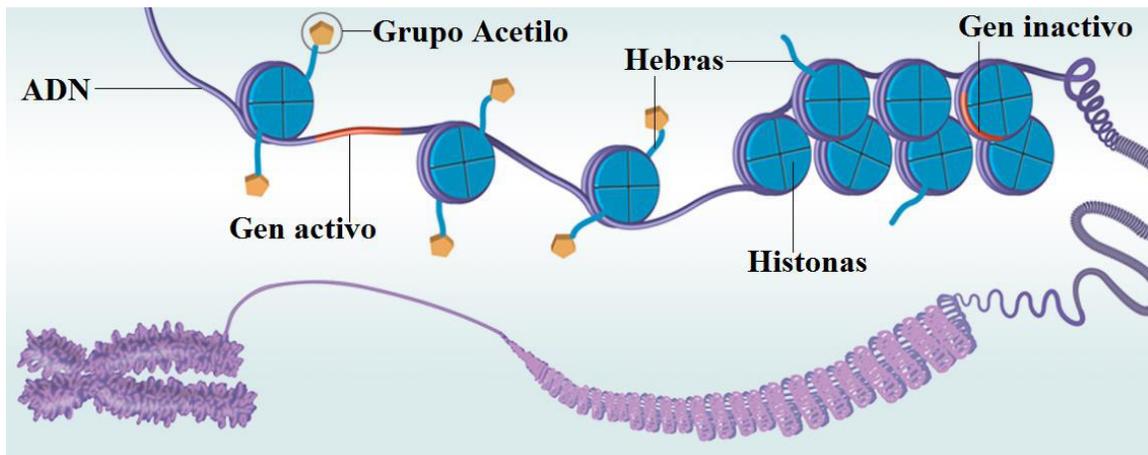


Figura 1. Niveles de organización del cromosoma. Puede notarse el equilibrio exhibición-compactación de ADN y su relevancia en la activación-inactivación de genes mediante la acetilación de las hebras de histonas. (http://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/2012/09/WP_Focus_2_Title_web.png)

La disminución de los niveles óptimos de acetilación de histonas puede deberse tanto a un descenso de la actividad de HAT como a un incremento de la actividad de HDAC. Las HDAC son también conocidas como lisinas desacetilasas, KDAC, con el fin de describir de un modo más preciso tanto su función como sus dianas, que incluyen numerosas proteínas no histonas (Choudhary *et al.*, 2009; Yang and Seto, 2007).

1.1.1.2.2 Desacetilasas de Histonas

Se han reportado 18 isoformas en humanos de HDAC: HDAC1, HDAC2..., HDAC11, SIRT1, SIRT2..., SIRT6 y SIRT7 (Dokmanovic *et al.*, 2007). Estas a su vez son clasificadas en cuatro grupos o clases. Las isoformas pertenecientes a las clases I y II contienen como cofactor, a un átomo de zinc, Zn^{2+} , en su sitio activo, mientras que aquellas pertenecientes a la clase III presentan una molécula de Nicotinamida adenina dinucleótido, NAD^+ , como cofactor (Sengupta and Seto, 2004) (Barneda-Zahonero and Parra, 2012). La isoforma de la clase IV es considerada atípica, ya que únicamente se asemeja a las otras tres clases por la similitud de la secuencia de ADN que reconoce (Yang and Seto, 2008). La actividad de las isoformas pertenecientes a las clases I y II puede ser inhibida por derivados de ácidos hidroxámicos, mientras que las pertenecientes a la clase III no (Imai *et al.*, 2000).

1.1.1.2.3 Localización subcelular

Las HDAC 1, 2 y 8 se encuentran localizadas principalmente en el núcleo, mientras que las HDAC 3, 4, 5, 7 y 9 entran y salen del núcleo al citoplasma en función de la señal que reciban (De Ruijter *et al.*, 2003) (Longworth and Laimins, 2006), HDAC 6 y 10 se encuentran mayormente en el citoplasma. HDAC6 es una enzima asociada a microtúbulos, su función consiste en desacetilar la tubulina, la proteína Hsp90 y la cortactina, HDAC6 se encuentra implicada en diversos procesos biológicos no vinculados con la desacetilación de las histonas (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Se ha asociado el desarrollo de diversos tipos de cáncer con la sobreexpresión de alguna de las distintas isoformas de HDAC; HDAC2 en cáncer de estómago (Song *et al.*, 2005), HDAC3 en cáncer de ovario (Khabele *et al.*, 2007) y en cáncer de pulmón (Bartling *et al.*, 2005), HDAC4 en cáncer de próstata (Halkidou *et al.*, 2004), HDAC6 en cáncer de mama (Saji *et al.*, 2005), HDAC7 en cáncer de páncreas (Ouassiss *et al.*, 2008) y HDAC8 en cáncer de médula ósea (Balasubramanian *et al.*, 2008) entre otras. La acetilación de proteínas no histonas también favorece el desarrollo de cáncer, HDAC1 actúa sobre el factor supresor de tumores p53, que al ser acetilado, pierde sus funciones (Luo *et al.*, 2000) o HDAC6 que actúa sobre el factor supresor de metástasis BRM1, desestabilizándolo (Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2008).

El conocimiento de los efectos de la sobreexpresión de las isoformas de la familia de HDAC ha motivado a la comunidad científica a considerarlos como dianas biológicas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer y buscar inhibidores efectivos contra estas. En los últimos años, los inhibidores de HDAC han cobrado suma importancia para su aplicación en el tratamiento contra el cáncer (Grozinger and Schreiber, 2002; Villar-Garea and Esteller, 2003; Villar-Garea and Esteller, 2004).

Los inhibidores de HDAC, HDACi, inducen la apoptosis de células cancerosas. Las células sanas son menos susceptibles que las alteradas al efecto antiproliferativo de los HDACi. Se ha observado una baja toxicidad del empleo de HDACi en ensayos clínicos (Glaser, 2007; Glaser *et al.*, 2003).

1.1.1.2.4 Mecanismo de acción de los Inhibidores de Desacetilasas de Histonas

El dominio catalítico de las HDAC está compuesto por un túnel con alrededor de 20-25 aminoácidos y un átomo de zinc al fondo. La remoción de los grupos acetilo ocurre vía un sistema de relevo de carga consistente en dos residuos de histidina adyacentes, dos residuos de ácido aspártico y un residuo de tirosina. Un componente esencial de este sistema es la presencia del ion Zn^{2+} , localizado en términos prácticos al fondo del túnel (ver **Figura 2**. Modelo esquemático del sitio activo de HDAC8.).

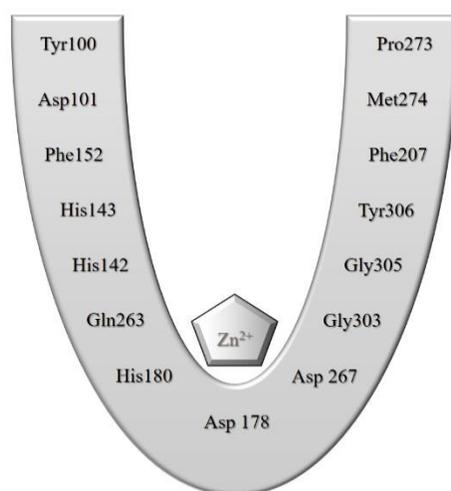


Figura 2. Modelo esquemático del sitio activo de HDAC8.

Los HDACi se unen al ion zinc (proceso de quelación) bloqueando el sitio activo de HDAC y por ende inhibiendo su actividad (Marks *et al.*, 2001). Una de las primeras evidencias sobre la dependencia del zinc para el modo de acción de HDAC, fue obtenida al aislar la estructura cristalina de una desacetilasa de histona de la bacteria *Aquifex aelicus*, con derivados de ácidos hidroxámicos formando un complejo con dichas enzimas (Finnin *et al.*, 1999). Este modo de acción fue confirmado años después, por dos grupos de investigación por separado que publicaron estructuras co-cristalizadas de HDAC8 de humano con cinco diferentes inhibidores, mostrando resultados similares a los reportados previamente (Somoza *et al.*, 2004; Vannini *et al.*, 2004) (ver **Figura 3**).

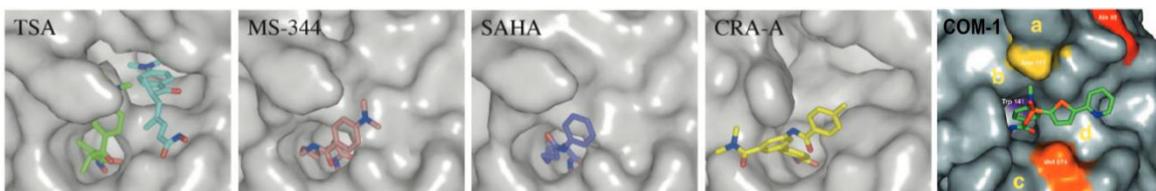


Figura 3. Cinco HDACi co-cristalizados en HDAC8, todos ellos derivados de ácidos hidroxámicos. Cabe destacar que es precisamente el grupo hidroxámico, el que se orienta hacia el interior del sitio activo (Somoza *et al.*, 2004; Vannini *et al.*, 2004).

La exposición de células cancerosas a HDACi ha dado como resultado la inhibición de la proliferación celular, inducción de la apoptosis, inducción de la diferenciación, inhibición de la invasión y migración, inhibición del efecto clonogénico e incluso efectos antiangiogénicos de una variedad de cultivos de células cancerosas (Schwab, 2011).

Existen diversas estructuras moleculares que funcionan como HDACi, sin embargo, los ácidos hidroxámicos son aquellos que han mostrado tener una mejor eficiencia terapéutica. En uno de los modelos de farmacóforo clásicos, la estructura de los HDACi se compone de tres secciones que le confieren eficiencia biológica (Kapustin *et al.*, 2003). Una de las secciones es denominada quelante y justo tiene la finalidad de fungir como agente quelante del átomo de zinc (coordinarse con él), otra de las secciones debe servir para anclar la molécula a la superficie de HDAC y es denominada tapa (*capping*), mientras que la tercera sección tiene la finalidad de unir a las otras dos y por tanto se denomina conector (*linker*). Es determinante que cada fragmento estructural sea el adecuado, es decir que el grupo quelante sea específico para el ion Zn^{2+} , con el fin de no favorecer la unión con otro tipo de metales que existen en diferentes enzimas, también lo es que la tapa o grupo que debe anclarse a la superficie de la enzima tenga la capacidad de adherirse formando interacciones fuertes y que el grupo conector tenga las características estéricas para poder entrar en el sitio activo de HDAC (ver **Figura 4**).

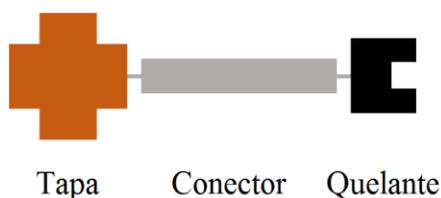


Figura 4. Modelo de farmacóforo para inhibidores de Desacetilasas de Histonas.

En este sentido se han realizado diferentes estudios biológicos con un gran número de moléculas orgánicas, donde se ha evaluado el efecto de distintos grupos en cada una de las secciones de HDACi mencionadas (Haggarty *et al.*, 2003; Heltweg *et al.*, 2004; Kozikowski *et al.*, 2008; Pontiki and Hadjipavlou-Litina, 2012; Sternson *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010).

En octubre de 2006, la agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration*), FDA por sus siglas en inglés, aprobó el uso del Ácido suberoilánilida Hidroxámico (suberanilohydroxamic acid), SAHA por sus siglas en inglés para el tratamiento de linfoma T-celular cutáneo (Mann *et al.*, 2007). Vorinostat® es el nombre comercial de este fármaco. La lista de HDACi derivados de ácidos hidroxámicos ha ido en aumento, en 2014 la FDA aprobó el uso de Belinostat (Lee *et al.*, 2015) y Pracinostat (Ganai, 2016) y en 2015 el uso de Panobinostat (Cheng *et al.*, 2015) mientras que Abexinostat (Saillard *et al.*, 2016) es aún una droga experimental. Incluso Tricostatina A, TSA, que originalmente fue usado como antimicótico es también un buen inhibidor de la actividad de HDAC (Vanhaecke *et al.*, 2004) (ver **Figura 5**).

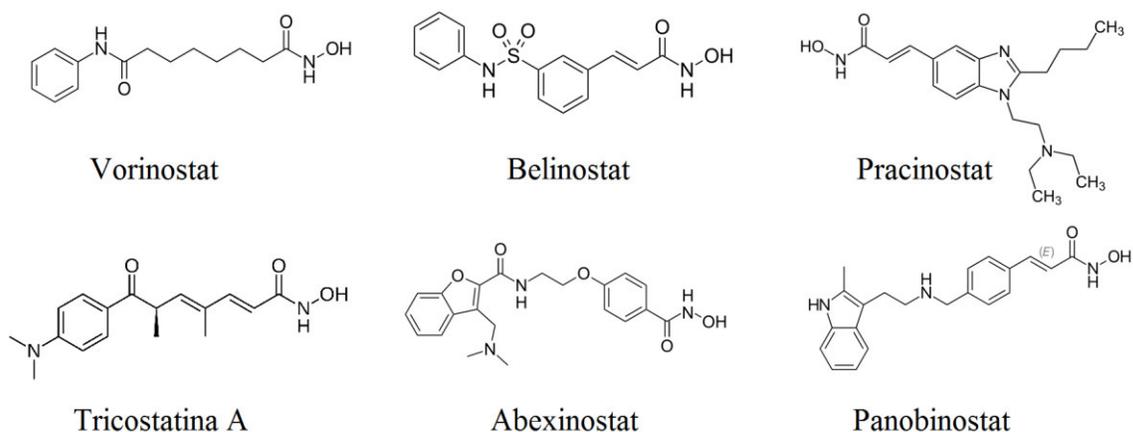


Figura 5. Diversos fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos para su empleo en linfoma cutáneo de células tipo T.

«Las leyes físicas fundamentales que son necesarias para la teoría matemática de una gran parte de la física y la totalidad de la química son pues completamente conocidas, y la dificultad es únicamente que la aplicación exacta de estas leyes lleva a ecuaciones demasiado complicadas como para ser resolubles.»

Paul Dirac.

1.2 Química Teórica y Computacional

1.2.1 Química Teórica

La Química Teórica tiene como uno de sus principales pilares la interconexión de la estructura molecular y las propiedades de los sistemas químicos, emplea leyes físicas y modelos matemáticos para explicar conformaciones espaciales y predecir propiedades termodinámicas o cinéticas, entre otras características. En el sentido más general, es la explicación de fenómenos químicos a través de la Física Teórica por medio de modelos matemáticos. Con esta herramienta se pueden estudiar propiedades de la estructura electrónica de átomos y moléculas para entender y explicar conceptos que surgieron de manera empírica, tales como electronegatividad o dureza entre otras, además de la reactividad de las especies químicas.

El estudio teórico de la estructura electrónica de las moléculas se puede realizar a través de dos formulaciones: una basada en la Mecánica Cuántica y la solución de la ecuación de Schrödinger para obtener la función de onda del sistema (Levine, 2009) y otra basada en la Teoría de Funcionales de la Densidad, TFD, que emplea a la densidad electrónica como la variable básica de un funcional de la energía (Parr, 1980).

La aplicación de los postulados de la Mecánica Cuántica a los sistemas químicos para obtener una descripción matemática del comportamiento de los electrones y los núcleos en tales sistemas es conocida como Química Cuántica. En Química Cuántica, el sistema se describe por una función de onda, la cual se encuentra resolviendo la ecuación de Schrödinger del sistema (ver Ec. (1)). Esta ecuación relaciona los estados estacionarios del sistema y sus energías al operador Hamiltoniano, que al ser aplicado a la función de onda permite obtener la energía asociada con la función de onda que describe las posiciones de los núcleos y los electrones en la molécula.

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

En la práctica, la ecuación de Schrödinger no puede ser resuelta de manera analítica para átomos distintos al átomo de Hidrógeno y se tienen que usar métodos aproximados o numéricos para intentar

resolverla. La Química Cuántica puede ser descrita como el conjunto de aproximaciones para resolver la ecuación de Schrodinger con una precisión tal que sea posible describir fenómenos químicos, ya sea cualitativamente o inclusive con una precisión tal que el resultado sea comparable con una propiedad experimental, así como el conjunto de herramientas que permiten relacionar cantidades físicas provenientes de la mecánica cuántica con propiedades y conceptos químicos provenientes del empirismo.

La primera aproximación es llamada *ab initio*, que significa «a primeros principios». En esta aproximación los cálculos están basados solamente en principios teóricos y no se hace uso de información empírica, excepto para las constantes fundamentales como la velocidad de la luz, las masas y cargas de los electrones y núcleos y la constante de Planck.

Uno de los primeros tipos de cálculos *ab initio* son los llamados cálculos Hartree-Fock, en los cuales la aproximación empleada para el átomo de Hidrógeno es la aproximación del campo central, para los sistemas poliatómicos se incluyen fundamentalmente 2 aproximaciones: 1) La función de onda se describe como un producto antisimetrizado de funciones de onda, y con esto 2) los electrones no interactúan instantáneamente, un electrón experimenta la presencia de los demás como si fueran densidades de carga uniformes en el espacio. El hecho de que sea antisimétrica hace que se cumpla el principio de exclusión de Pauli y se obtiene un término de intercambio que baja la energía. Esto significa que la repulsión electrón-electrón no se considera de manera específica. En este tipo de cálculos la energía obedece a un principio variacional, y las energías calculadas son iguales o mayores que la energía exacta del estado basal.

Los métodos tradicionales dentro de las teorías de la estructura electrónica de la materia, en particular la teoría de Hartree-Fock y los derivados de este formalismo, se basan en una función de onda multielectrónica (Levine *et al.*, 2009). Si bien esta resolución aproximada de la ecuación de Schrödinger permite describir de forma muy precisa el comportamiento de los sistemas muy pequeños, su capacidad de predicción se ve limitada por el hecho de que sus ecuaciones son demasiado complejas para resolver numéricamente y menos aún analíticamente.

La Teoría del Funcional de la Densidad, TFD, (Parr and Yang, 1989) reformula el problema para ser capaz de obtener, por ejemplo, la energía y la distribución electrónica del estado fundamental, trabajando con el funcional de la densidad electrónica en vez de con la función de onda. La función de onda de un sistema de N electrones depende de $3N$ variables, mientras que la densidad electrónica sólo depende de 3 variables. Una ventaja es que la densidad electrónica es una función mucho más simple que la función de onda y por lo tanto más fácil de calcular, en la práctica son accesibles

sistemas mucho más complejos. Una desventaja es que, salvo los casos más simples, no se conoce de manera exacta el funcional que relaciona esta densidad con la energía del sistema.

Los orígenes de la TFD se encuentran en un modelo desarrollado por Llewellyn Thomas y Enrico Fermi (Fermi, 1927; Thomas, 1927) a finales de los años 1920. Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 1960 cuando las contribuciones de Pierre Hohenberg, Walter Kohn y Lu Sham establecieron el formalismo teórico en el que se basa el método usado actualmente. En la mecánica cuántica estándar, los observables son calculados a partir de la función de onda de muchos cuerpos. El método de la TFD fue sometido a un tratamiento riguroso (Hohenberg and Kohn, 1964) demostrándose que, para el estado fundamental, existe una relación uno a uno entre la densidad electrónica y el potencial externo, $v(\vec{r})$. Esto quiere decir que la densidad electrónica en el estado fundamental contiene la información de un sistema electrónico.

En particular, Hohenberg y Kohn mostraron que la energía es un funcional de la densidad a través de la relación:

$$E[\rho] = F[\rho] + \int \rho(\vec{r}) v(\vec{r}) d\vec{r} \quad (2)$$

Donde $F[\rho]$ representa al funcional universal que contiene a la energía cinética y la interacción electrón-electrón.

1.2.1.1 Química computacional

La química computacional es una rama de la química teórica en la que se resuelven numéricamente sus ecuaciones, para lo que se han implementado métodos de cálculo numérico en una computadora. Utiliza resultados de la química teórica, incorporados en algún programa para calcular estructuras y propiedades de moléculas. De esta manera, es posible obtener información molecular como energías relativas, momentos dipolares y frecuencias de vibración entre muchas otras (Cuevas and Cortés, 2003).

Mientras que la química teórica puede ser definida como una descripción matemática de la química, el término química computacional es usualmente empleado cuando un método matemático está lo suficientemente desarrollado como para ser automatizado mediante su implementación en un programa computacional.

Diversos estudios computacionales pueden llevarse a cabo con la finalidad de discernir de entre una gran cantidad de moléculas, aquellas con una mayor probabilidad de éxito como fármacos. Estos estudios computacionales permiten modelar la síntesis del fármaco ideado, su estabilidad, reactividad e inclusive su modo de acción biológico sobre blancos terapéuticos dados.

«Una compañía farmacéutica necesita a un químico computacional para el diseño de fármacos, así como los químicos orgánicos necesitan un equipo de RMN. No resolverá todos los problemas, pero es mucho mejor tenerlo que carecer de él.»

David Young.

1.2.2 Diseño de fármacos

A pesar de los avances tecnológicos y el entendimiento de los procesos biológicos, el descubrimiento de fármacos sigue siendo un proceso largo, costoso e ineficiente con una baja tasa de nuevos descubrimientos terapéuticos (Anson *et al.*, 2009). En 2010, el costo de investigación y desarrollo de cada nuevo fármaco desarrollado, fue de aproximadamente 1800 millones de dólares americanos (Paul *et al.*, 2010). El costo total de introducir un nuevo fármaco al mercado es una cuestión muy controversial, normalmente las empresas farmacéuticas gastan decenas o cientos de millones de dólares para ello (Sertkaya *et al.*, 2016). Las cifras son controvertidas, ya que las compañías farmacéuticas deben justificar el precio de venta de los medicamentos, sin embargo, también pueden variar mucho debido a múltiples factores durante el proceso de desarrollo del fármaco. En un análisis de costos de desarrollo de fármacos para 98 empresas durante una década, el costo promedio por fármaco desarrollado y aprobado por una compañía farmacéutica fue de 350 millones de dólares (Herper, 2013). Sin embargo, el costo total por fármaco introducido al mercado de las compañías para las que sólo fueron aprobados entre ocho y trece fármacos durante el mismo periodo fue de 5500 millones de dólares (Herper, 2013).

Un método común en la industria farmacéutica es sintetizar tantos derivados como sea posible de una molécula, dentro de una familia de compuestos y llevar a cabo una serie de pruebas biológicas. En un proyecto determinado, la aplicación de estrategias de cómputo depende de la información disponible del sistema y de los objetivos específicos del estudio. A la fecha, los métodos computacionales han contribuido, entre otras aplicaciones, al análisis eficiente de datos, al filtrado de colecciones de compuestos para seleccionar moléculas para evaluación experimental, a la generación de hipótesis para ayudar a entender el mecanismo de acción de fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas.(Saldívar-González *et al.*, 2016).

1.2.3 Diseño racional de fármacos

A diferencia del método histórico del descubrimiento de fármacos basado en ensayo y error, donde factores como la serendipia y el azar juegan un papel muy relevante, el diseño racional de fármacos

parte del conocimiento de las rutas bioquímicas implicadas en los procesos biológicos de interés y la adaptación de combinaciones de estos para un perfil terapéutico adecuado.

El rápido desarrollo de las tecnologías de cómputo ha incrementado notablemente las posibilidades y confiabilidad de la Química Computacional. Sus propios métodos y soluciones, además de la información experimental de la que se dispone (por ejemplo estructuras cristalográficas de los blancos biológicos) la han convertido en una disciplina necesaria para el estudio e investigación de moléculas con potencial actividad farmacológica (Zhang, 2011).

1.2.4 Diseño de fármacos basado en el receptor

Cuando se conoce la estructura tridimensional del blanco biológico, es posible emplear técnicas basadas en la estructura del receptor (Mandal *et al.*, 2009). Las moléculas propuestas pueden ser acopladas *in silico* dentro de una cavidad en particular del blanco biológico, normalmente el sitio activo, con la finalidad de estudiar las interacciones entre la molécula propuesta y los residuos que componen la cavidad en cuestión (Bultinck *et al.*, 2003). Dentro de un modelo conceptual “llave-cerradura”, el blanco biológico es la “cerradura” y el fármaco o ligando es la “llave”. En este sentido, existen diversas técnicas computacionales recomendadas para ser empleadas en el diseño racional de fármacos como son Simulaciones de Dinámica Molecular, DM, Generación de Farmacóforo, GF, y Acoplamiento Molecular (*Docking in silico*, AM). Las técnicas DM y AM, basadas en la mecánica molecular.

1.2.5 Interacciones intermoleculares proteína – fármaco

Entre las principales interacciones de tipo no covalente que existen entre los fármacos y las proteínas que fungen como blancos biológicos se encuentran los enlaces de hidrógeno de tipo donador y de tipo aceptor, las interacciones de tipo apilamiento (*stacking*) y las interacciones electrostáticas y estéricas.

Los enlaces de hidrógeno de tipo donador son aquellos que se forman entre un átomo de hidrogeno unido covalentemente entre un átomo del fármaco y un heteroátomo de la proteína. Los enlaces de hidrógeno de tipo aceptor son aquellos que se forman entre un heteroátomo del fármaco y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un heteroátomo de la proteína. La energía de interacción de los enlaces de hidrógeno depende básicamente de la distancia a la que se encuentran el átomo de hidrógeno y el heteroátomo con el que se forma el enlace y el ángulo que se forma entre el heteroátomo al que está unido covalentemente el átomo de hidrógeno, el átomo de hidrógeno y el heteroátomo con el que se forma el enlace de hidrógeno.

Las interacciones de tipo apilamiento son aquellas que ocurren entre nubes electrónicas aromáticas, aunque los efectos debidos a la presencia de orbitales pi son solo una fuente de tales interacciones. Se ha reportado el apilamiento entre anillos aromáticos fusionados y el fullereno (Sygula *et al.*, 2007) así como las contribuciones energéticas en el apilamiento de las bases en los ácidos nucleicos (Parker *et al.*, 2013) poniendo de relieve la importancia de las interacciones de tipo apilamiento. Diversos estudios muestran las energías de los dímeros formados con un par de anillos de benceno durante los apilamientos cara-cara, cara-cara desplazada y apilamiento tipo T (Parker *et al.*, 2013; Sinnokrot *et al.*, 2002; Tsuzuki *et al.*, 2002).

1.2.6 Mecánica Molecular

La mecánica molecular es un método computacional empleado para el modelado de moléculas. La energía obtenida mediante cálculos de mecánica molecular es de tipo conformacional (Box, 1997, 2004), al no ser cálculos cuánticos no producen información sobre propiedades electrónicas, por lo que resulta adecuada para calcular la energía de interacción con otra molécula. La descripción exacta viene dada por la solución de la ecuación de Schrödinger de la mecánica cuántica, sin embargo, ese tipo de cálculos son demasiado costosos como para emplearlos en sistemas bioquímicos, mientras que la mecánica molecular provee una descripción relativamente simple, pero adecuada en términos de practicidad y precisión para calcular energías de interacción (Shirts *et al.*, 2003), para el diseño de fármacos.

La ecuación (3) que nos da la energía total de una molécula y se resuelve por la mecánica molecular, es una suma de términos que calculan la energía de unión debida a enlaces, ángulos de flexión, ángulos de torsión, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y atracción y/o repulsión electrostática entre otros. Este conjunto de parámetros y ecuaciones que se emplean recibe el nombre de «campo de fuerza».

$$V = E_{\text{Total}} = E_{\text{enlaces}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{diedros}} + E_{\text{enlaces de hidrógeno}} + E_{\text{electrostáticos}} + E_{\text{van der Waals}} \quad (3)$$

Con $E_{\text{enlaces}} = \sum K_r (r - r_{\text{eq}})$, $E_{\text{ángulos}} = \sum K_{\theta} (\theta - \theta_{\text{eq}})$, $E_{\text{diedros}} = \sum K_{\omega} [1 - \cos(n\omega - \delta)]$,

$\sum_{i < j} = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \dots$ donde se pone de manifiesto que las contribuciones energéticas

vienen de la mecánica clásica y se obtienen con potenciales armónicos u otros potenciales como el de Lenard Jones que se obtienen de cálculos o valores experimentales.

La mecánica molecular es base de otros métodos como simulaciones de dinámica molecular y acoplamientos moleculares (*Docking in silico*), y comprender las debilidades y fortalezas de los diversos campos de fuerza es necesario para utilizar eficazmente dichas técnicas.

Las dos principales formas de simular el solvente en un cálculo de mecánica molecular son las siguientes: Calcular nuestra molécula de interés en una colección de moléculas de agua, logrando así una solvatación explícita, o bien hacer una descripción del solvente como un continuo definido por una constante dieléctrica. En las simulaciones de dinámica molecular suele optarse por la primera opción, mientras que en acoplamientos moleculares *in silico* se prefiere la segunda.

No existe un campo de fuerzas que funcione para todos los sistemas. En el campo del diseño de fármacos se recomienda seleccionar el que mejor corresponda a las necesidades particulares del ambiente donde el fármaco ejercerá su acción (Young, 2009).

1.2.7 Simulación de Dinámica Molecular

Simulación de Dinámica Molecular, (DM), es una técnica computacional que modela el movimiento de átomos y moléculas en un intervalo de tiempo dado. En su versión más simple, las trayectorias de los átomos y moléculas pueden ser determinadas empleando métodos numéricos para la resolución de las ecuaciones de movimiento de la mecánica Newtoniana, para un sistema de partículas interactuantes, donde las fuerzas intermoleculares y energías potenciales son calculadas usando potenciales interatómicos y campos de fuerza de la mecánica molecular. Originalmente, este método fue desarrollado en el campo de la física teórica alrededor de los años 60's (Alder and Wainwright, 1959; Rahman, 1964), pero al día de hoy es ampliamente usado para modelar el movimiento de biomoléculas. Una DM genera como resultados, las posiciones y velocidades de cada átomo en una molécula para cada instante en el tiempo discreto, a esto se le llama «trayectoria».

Si el sistema se encuentra aislado: el volumen, V , no se altera y no intercambia masa, es decir número de átomos, N , ni energía, E , con el entorno. Un sistema con N partículas con coordenadas X y velocidades V , puede ser planteado con el siguiente par de ecuaciones diferenciales de primer orden:

$$F(X) = -\nabla U(X) = MV'(t) \quad (4)$$

$$X'(t) = V(t) \quad (5)$$

Donde $F(X)$ es la fuerza en función de la posición, X representa las coordenadas tridimensionales de cada uno de los átomos (x, y, z). $-\nabla U(X)$ es el gradiente del potencial. La función de energía potencial $U(X)$, incluye los efectos atractivos y repulsivos que sienten los átomos de las moléculas debido a los enlaces químicos, interacciones electrostáticas y de Van der Waals entre otras. Se elige un paso de tiempo suficientemente pequeño y para cada paso de tiempo se integra la posición X y la velocidad V . Dadas las posiciones iniciales de los átomos de una molécula (por ejemplo, las coordenadas de una proteína obtenidas por cristalografía de Rayos X) y las velocidades iniciales (pueden ser variables

gaussianas aleatorias) es posible calcular todas las posiciones y velocidades en el futuro. Generalmente se utiliza el conjunto o ensamble NVT o NPT en las simulaciones. La temperatura se mantiene alrededor de la media deseada. La temperatura instantánea del sistema no es constante, solo lo es el promedio.

En este proyecto utilizamos el programa de código abierto *GROMACS* (GRONingen MACHine for Chemical Simulations), originalmente desarrollado por Universidad de Groningen, aunque mejorado por muchos otros desarrolladores de distintas instituciones (Hess *et al.*, 2008; Kutzner *et al.*, 2007; Van Der Spoel *et al.*, 2005).

1.2.8 Generación de Farmacóforo

El concepto de farmacóforo fue originalmente definido en 1909 como «una unidad central molecular que contiene los rasgos esenciales responsables para la actividad biológica» de una droga (Ehrlich, 1909).

Farmacóforo es un conjunto de características electrónicas y estructurales necesarias para garantizar las interacciones supramoleculares óptimas con una diana biológica específica, para activar (o bloquear) la respuesta biológica (Wermuth *et al.*, 1998). Cabe mencionar que un farmacóforo no representa a una molécula real ni tiene una asociación con grupos funcionales específicos, es un concepto puramente abstracto empleado para tener en cuenta las capacidades de interacción molecular de un grupo de compuestos para con la estructura objetivo. Este conjunto de características incluye sitios con H para formar enlaces de hidrógeno donadores, sitios con electrones para formar enlaces de hidrógeno aceptores, centros de anillos, sitios para formar interacciones electrostáticas y puntos virtuales.

Cuando se conoce la diana biológica y se dispone de la estructura tridimensional es posible llevar a cabo la generación de un farmacóforo basado en el receptor. Teniendo en cuenta las características del sitio de unión con la molécula candidato a fármaco, se proponen elementos de farmacóforo complementarios. Si el sitio del blanco biológico donde se pretende unir a una molécula tiene aminoácidos cargados negativamente en las condiciones dadas (pH por ejemplo), valdrá la pena considerar como elemento del farmacóforo un sitio cargado positivamente para conseguir de esta manera, una interacción electrostática de atracción y, por ende, estabilizar el sistema. Si el sitio del blanco biológico donde se pretende unir a una molécula contiene anillos aromáticos, sería conveniente considerar a un sitio con orbitales pi como elemento del farmacóforo, con la intención de formar interacciones estabilizantes de tipo apilamiento o *stacking*.

1.2.9. Acoplamiento molecular (*Docking*)

Acoplamiento molecular o *Docking in silico* es una técnica que determina como se unirá un ligando candidato a fármaco al sitio activo de la proteína, o alguna variante de este proceso, por ejemplo, el acoplamiento de sustratos naturales en lugar de candidatos a fármacos o el acoplamiento en sitios diferentes del sitio activo, como los sitios alostéricos. En esta técnica, se incluyen también cálculos de alguna propiedad cuantificable que pueda correlacionarse con la actividad biológica, medida sobre todo en ensayos enzimáticos, propiedades como el cambio en la energía libre o formación de enlaces de hidrógeno son comúnmente reportadas (Abagyan and Totrov, 2001; Halperin *et al.*, 2002; Nissink *et al.*, 2002; Young, 2009).

Acoplamiento molecular *in silico* es, en el campo del modelado molecular, un método que predice la conformación preferida de una molécula al estar unida a otra con el fin de formar un complejo estable. El conocimiento de la orientación preferida puede ser a su vez usado para predecir la fuerza de la asociación o la afinidad de enlace entre dos moléculas (energía de interacción), (Lengauer and Rarey, 1996).

Acoplamiento molecular *in silico* es probablemente la técnica computacional más empleada en el diseño racional de fármacos.

Para poder calcular la energía de interacción de la molécula candidato a fármaco con la biomolécula es necesario tener la estructura tridimensional terciaria de la biomolécula, pero es muy demandante de recursos computacionales el intentar calcular el arreglo espacial de la estructura terciaria de una biomolécula, por ello resulta la mejor opción recurrir a su estructura cristalográfica si es que existe en una base de datos. El *Protein Data Bank*, PDB, (Banco de Datos de Proteínas) es una base de datos de la estructura tridimensional de proteínas (Berman *et al.*, 2000). Estos datos, generalmente obtenidos por Cristalografía de rayos X y Resonancia Magnética Nuclear, son depositados por cristalógrafos, biólogos y bioquímicos de todo el mundo. Son de dominio público y pueden ser usados libremente. Cuando se fundó, en el año 1971, el PDB contenía tan sólo 7 estructuras de proteínas. Desde entonces ha experimentado un crecimiento aproximadamente exponencial en el número de estructuras y nada parece indicar que el ritmo vaya a decaer (Berman *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2011).

1.3.0 Algoritmo de búsqueda y Función de Evaluación

Existen dos aspectos esenciales que deben contener los programas de acoplamiento molecular, y que definirán el éxito o fracaso de los mismos; el algoritmo de búsqueda y la función de evaluación.

Cada uno de los algoritmos automatizados de acoplamientos moleculares trata de probar diferentes orientaciones y conformaciones de la molécula candidato a fármaco, en algún sitio de interés particular de una biomolécula. Algunos algoritmos de búsqueda posicionan al ligando en el sitio seleccionado de la biomolécula manteniendo este sitio rígido y posteriormente permitiendo solo la movilidad del ligando con la intención de optimizar algunas de las interacciones relevantes que con relativa facilidad pueden cambiar, como son los enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas. Una de las líneas más prometedoras de la inteligencia artificial en el desarrollo de algoritmos es la de los algoritmos genéticos (Goldberg, 1989; Holland, 1975) y los algoritmos de búsqueda más exitosos en el ámbito de acoplamientos moleculares son precisamente genéticos.

Un algoritmo es una serie de pasos organizados que describe un proceso que se debe seguir. Los algoritmos genéticos tratan de imitar el proceso evolutivo mediante la manipulación de un conjunto de datos estructurales. Cada uno de estos conjuntos codifica una posible solución al problema del acoplamiento y es sujeto a una evaluación (Jones *et al.*, 1997). Estos algoritmos hacen evolucionar una población de individuos sometiéndola a acciones aleatorias semejantes a las que actúan en la evolución biológica (mutaciones y recombinaciones genéticas), así como también a una selección de acuerdo con algún criterio en función del cual se decide cuáles son los individuos más aptos, que sobreviven, y cuáles los menos aptos, que son descartados.

Al realizar acoplamientos moleculares *in silico* existen para cada ligando, grados de libertad de rotación, traslación, ángulos de enlace y ángulos diedros. La búsqueda del mejor acoplamiento comienza con la generación de una población inicial de posibles soluciones.

La función de evaluación (*scoring*) es un método matemático que se emplea para calcular la energía de interacción entre el ligando y el blanco biológico una vez llevado a cabo el acoplamiento molecular (Jain, 2006), es decir que calcula la energía debida a interacciones no covalentes presentes en el modo de acoplamiento encontrado por el algoritmo de búsqueda (Lensink *et al.*, 2007), en lo sucesivo nos referiremos a este modo de acoplamiento específico como «pose». La función de evaluación toma una pose como dato de entrada y devuelve un valor de energía que indica cuan favorable es la energía de la pose, si la energía de una pose es negativa entonces el sistema es estable y tiene una mayor probabilidad de llevar a cabo el acoplamiento en comparación con otra pose donde la energía sea positiva. Cuanto más negativa sea la energía de la pose, mayor será la probabilidad de que esta coincida con la conformación experimental.

La función de evaluación utilizada en este proyecto está implementada en el programa *Molegro Virtual Docker*, MVD y consta de dos términos: El primero de ellos sirve para calcular las

interacciones intermoleculares, es decir las existentes entre la molécula candidato a fármaco y el blanco biológico; El segundo de ellos sirve para calcular las interacciones intramoleculares, es decir las existentes entre los átomos, unos con otros, de la molécula candidato a fármaco.

$$E_{\text{Evaluación}} = E_{\text{Interacciones Intermoleculares}} + E_{\text{Interacciones Intramoleculares}} \quad (6)$$

A su vez, el primer término se compone de una serie de sumandos como sigue:

$$E_{\text{Interacciones Intermoleculares}} = \sum_i \sum_j [E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332 q_i q_j / r_{ij}^2] \quad (7)$$

Donde $E_{\text{PLP}}(0) = A_0$, $E_{\text{PLP}}(R_1) = 0$, $E_{\text{PLP}}(R_2) = E_{\text{PLP}}(R_3) = A_1$ y $E_{\text{PLP}}(r) = 0$, para $r \geq R_4$ interpolado de manera lineal entre estos valores. Los valores de A_0 , A_1 y R_n se definen más adelante, en la tabla 1.

La suma corre sobre todos los i átomos pesados (átomos diferentes de hidrógeno) de la molécula candidato a fármaco y todos los j átomos pesados presentes en la región de acoplamiento.

E_{PLP} es un potencial lineal a tramos que usa dos diferentes conjuntos de parámetros, uno para los enlaces de hidrógeno y otro para las interacciones estéricas. E_{PLP} es función únicamente de la distancia entre cada par de átomos, sin embargo existen factores de corrección para los enlaces de hidrógeno, que está en función del ángulo que existe entre el átomo al que está unido covalentemente el hidrógeno, el átomo de hidrógeno y el átomo con el que se forma el enlace de hidrógeno, la introducción de estos factores de corrección fue motivada por otros trabajos (McDonald and Thornton, 1994). El potencial lineal está definido a partir de los valores adoptados (ver **Tabla 1**) del método para acoplamientos moleculares denominado GEMDOCK (Yang and Chen, 2004).

Tabla 1. Parámetros del Potencial Lineal a Tramos, PLP.

	A_0	A_1	R_1	R_2	R_3	R_4
Enlaces de hidrógeno	20.0	-2.5	2.3	2.6	3.1	3.6
Interacciones estéricas	20.0	-0.4	3.3	3.6	4.5	6.0

La suma del producto de las cargas corresponde a un potencial bajo la ley de Coulomb,

$$U = k \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (8)$$

donde K es una constante, q_i es la carga de cada uno los i átomos pesados de la molécula candidato a fármaco y q_j es la carga de cada uno de los j átomos pesados presentes en la región del acoplamiento y r_{ij} es la distancia entre cada i átomo y j átomo, y nos permite calcular la energía debida a las interacciones electrostáticas en las unidades requeridas, en este caso kilocalorías por mol.

El segundo término se compone de una serie de sumandos como sigue:

$$E_{\text{Interacciones Intramoleculares}} = \sum_i \sum_j E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + \sum_{\text{Enlaces flexibles}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{\text{Choque}} \quad (9)$$

La doble suma corre sobre todos los pares de átomos i y j de la molécula candidato a fármaco que estén conectados por dos o un enlace. El segundo es un término para calcular la energía torsional, parametrizado en función de los tipos de hibridación de cada átomo, θ es el ángulo torsional del enlace, m y A toman distintos valores en función de la hibridación de los átomos, 6 y 1.5 para enlaces sp^2 - sp^3 , 3 y 3.0 para sp^3 - sp^3 y 2 y 3.0 para sp^3 - sp^2 , y finalmente, E_{Choque} es un término que asigna un valor numérico muy alto a las conformaciones donde dos átomos pesados se encuentran a menos de 2 Å de distancia.

En general, los programas de acoplamiento molecular tienen funciones de evaluación que reproducen bastante bien los resultados obtenidos mediante análisis cristalográficos. La combinación del algoritmo de búsqueda adecuado y de la función de evaluación determinará el éxito de los acoplamientos moleculares.

La combinación de las técnicas de Simulación de Dinámica Molecular, Generación de Farmacóforo y Acoplamiento Molecular *in silico* es una herramienta muy poderosa en el diseño racional de fármacos asistido por computadora y es la metodología utilizada en esta tesis.

CAPÍTULO 2 - Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Las moléculas diseñadas bajo el modelo de farmacóforo propuesto tendrán una mejor energía de interacción que el fármaco comercial SAHA, al ser acopladas *in silico* en la isoforma seleccionada de la familia de Desacetilasas de Histonas. Esto puede generar mejores compuestos anticancerígenos que el fármaco líder SAHA.

2.2 Objetivo General

Diseñar *in silico* una serie de moléculas orgánicas derivadas de ácidos hidroxámicos con capacidad de bloquear el sitio activo de las Desacetilasas de Histonas.

2.3 Objetivos específicos

1. Generar un modelo de farmacóforo para cada una de las isoformas seleccionadas de la familia de Desacetilasas de Histonas.
2. Encontrar el sitio y el modo de unión de una serie de moléculas orgánicas nuevas, derivadas de ácidos hidroxámicos y calcular la energía de unión de cada una de estas moléculas con las isoformas de HDAC seleccionadas. Este estudio permitió colaborar con el grupo de Química Orgánica Sintética del Dr. Miguel Ángel Vázquez-Guevara, orientando la síntesis y diseño de estas moléculas.
3. Predecir si la actividad biológica de estas moléculas orgánicas derivadas de ácidos hidroxámicos como inhibidores de HDAC será mayor o menor que la del fármaco líder en el mercado. Este estudio permitió colaborar con el grupo de Toxicología de la Dra. Minerva Martínez-Alfaro, que se encargó de realizar las pruebas biológicas requeridas.

CAPÍTULO 3 - Metodología

3.1 Simulaciones de Dinámica Molecular

Se obtuvieron las coordenadas cristalográficas de las isoformas de la familia de Desacetilasas de histonas, HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8 del Protein Data Bank, códigos 4LXZ (Lauffer *et al.*, 2013), 4CBT (Bürli *et al.*, 2013), 3C0Z (Schuetz *et al.*, 2008) y 4QA3 (Decroos *et al.*, 2014) respectivamente. Los blancos biológicos obtenidos presentaban errores estructurales, por lo que fue necesario llevar a cabo la reparación de los mismos, tales errores consisten en deficiencias en el número de átomos de los aminoácidos, en todos ellos se agregaron los átomos faltantes para completar los residuos en función de su parecido con los aminoácidos conocidos, se realizó una optimización a nivel de mecánica molecular de cada uno de ellos seguida de una nueva optimización también a nivel de mecánica molecular de cada uno de sus primeros vecinos, esto se llevó a cabo con el programa MVD. Los residuos reparados se reportan a continuación (ver **Tabla 2**).

Tabla 2. Residuos con errores estructurales en las proteínas obtenidas de Protein Data Bank

Isoforma	HDAC2	HDAC4	HDAC7	HDAC8
Código PDB	4LXZ	4CBT	3C0Z	4QA3
Residuos	<i>Lys 13</i>	<i>Arg 61</i>	<i>Arg 596</i>	<i>Lys 33</i>
		<i>Thr 941</i>	<i>Lys 598</i>	<i>Lys 36</i>
		<i>Leu 1005</i>	<i>Arg 655</i>	<i>Lys 52</i>
			<i>Lys 658</i>	<i>Lys 60</i>

<i>Lys 818</i>	<i>Lys 81</i>
<i>Arg 900</i>	<i>Glu 85</i>
	<i>Asp 101</i>
	<i>Glu 658</i>

Una vez que las estructuras de los blancos biológicos fueron completadas, iniciamos la simulación de dinámica molecular, todos los residuos fueron protonados en función del pH biológico; los residuos de Lisina y Arginina quedaron con carga +1, los residuos de Ácido Aspártico y Ácido Glutámico con carga -1 y los residuos de Histidina con el nitrógeno en la posición NE2 del anillo imidazol, protonado, esto se llevó a cabo con el programa GROMACS. El campo de fuerzas seleccionado para las simulaciones de dinámica molecular fue AMBER03 (Duan *et al.*, 2003), **ver detalles técnicos en Apéndice A.**

El centro de masas de cada sistema fue colocado en el centro de una caja cúbica hipotética. Se agregan los iones Na⁺ y Cl⁻ suficientes para ajustar la concentración a 0.15 M y se agregan moléculas de agua para simular el solvente explícitamente. Posterior a ello se llevan a cabo los procesos de equilibrio, primero a presión y volumen constantes y después a temperatura y volumen constantes. Los detalles sobre las dimensiones de la caja, iones y moléculas de agua agregadas se reportan a continuación (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros aplicados para la preparación de los sistemas para las simulaciones de Dinámica Molecular.

Isoforma	HDAC2	HDAC4	HDAC7	HDAC8
Código PDB	4LXZ	4CBT	3C0Z	4QA3
Dimensiones de la caja, Å³.	823	893	937	818
Moléculas de agua agregadas.	16411	21634	24936	16057
Iones Na⁺.	51	69	78	56
Iones Cl⁻.	50	61	74	49

Una vez preparados los sistemas se corrieron simulaciones de DM de 15 nanosegundos para cada uno de los sistemas en original y dos réplicas con un tiempo promedio de 18.75 días para cada corrida. Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo empleando los recursos de súper cómputo del Laboratorio Nacional Guanajuato (CONACyT 123732), con el programa Gromacs versión 5.0.4

utilizando para cada sistema 16 procesadores AMD Opteron(tm) Processor 6378 a 2.4 GHz bajo la distribución GNU/Centos 6.9 Kernel 2.6.32-573.12.1.el6.x86_6.

3.2 Generación de farmacóforo

A partir de los resultados de las simulaciones DM, poniendo especial atención en el movimiento de los residuos que componen el sitio activo de cada una de las isoformas seleccionadas de HDAC y las características electrónicas y estructurales de tales residuos, hemos conseguido proponer elementos del farmacóforo con el fin de optimizar las interacciones atractivas entre los residuos y la molécula candidato a fármaco. En los casos donde los residuos son histidinas, revisamos cuál de los átomos de nitrógeno quedaba expuesto hacia el interior del sitio activo, si es el átomo de nitrógeno protonado, NE2, o bien el no protonado, ND1, con la intención de proponer como un elemento del farmacóforo un enlace de hidrógeno de tipo aceptor o donador respectivamente. En los casos donde los residuos son tirosinas revisamos la orientación del grupo hidroxilo, con la intención de conocer la viabilidad de proponer como un elemento del farmacóforo un enlace de hidrógeno de tipo aceptor. En los casos donde los residuos son ácidos aspárticos y en los casos donde los residuos son ácidos glutámicos (aspartatos y glutamatos a pH=7), revisamos la orientación de los átomos de oxígeno cargados negativamente con la intención de saber qué tan adecuado es proponer una carga positiva como elemento de farmacóforo. En los casos donde los residuos son fenilalaninas revisamos la orientación de las caras de los anillos de benceno, con la intención de saber si es adecuado proponer una nube de orbitales Pi para generar una interacción de tipo apilamiento. Y en los casos donde los residuos son lisinas, revisamos la orientación del grupo amino cargado positivamente con la intención de saber que tan adecuado sería proponer una carga negativa como elemento del farmacóforo (ver **Figura 6**).

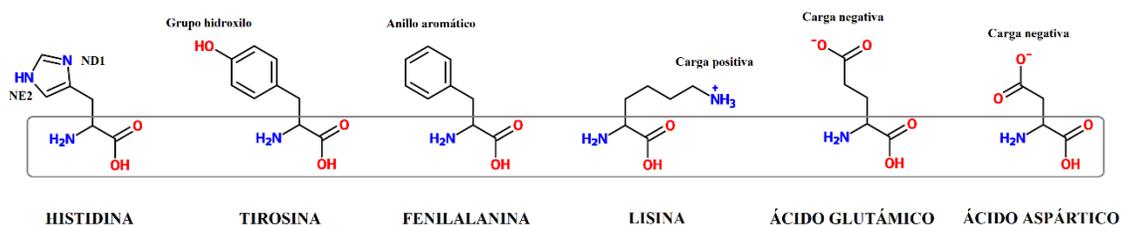


Figura 6. Residuos de interés presentes en el sitio activo de las isoformas seleccionadas. Detalle de las características analizadas para la generación del modelo de farmacóforo. La cadena principal de la secuencia de aminoácidos está enmarcada.

Una vez que hemos generado un modelo de farmacóforo, se propusieron una serie de moléculas orgánicas candidatas a fármacos con las características que satisfacen el modelo, con el grupo colaborador de Síntesis Orgánica.

3.3 Acoplamiento molecular *in silico*

Todas las moléculas candidatas a fármacos fueron construidas inicialmente con el programa *Spartan* (Shao *et al.*, 2006), optimizando sus geometrías primero a nivel de mecánica molecular con el campo de fuerzas SYBYL (Mayo *et al.*, 1990) y, posteriormente, reoptimizando con un nivel semiempírico PM3 (Stewart, 1989).

El estudio de las interacciones intermoleculares se llevó a cabo con las mismas estructuras obtenidas de la base de datos del *Protein Data Bank* empleadas para las simulaciones DM, utilizando para ello el programa de acoplamiento molecular (*Docking*) *in silico* *Molegro Virtual Docker*, MVD, con base en el siguiente protocolo:

Acoplamiento ciego; llevamos a cabo una serie de acoplamiento molecular en toda la superficie de la proteína, sin presuponer el sitio de interacción preferente, empleando una malla espacial con tamiz de 3 Å y un número máximo de 1500 iteraciones. En aquellos sistemas donde se obtuvieron las mejores energías de interacción de los acoplamiento en el sitio activo de las Desacetilasas y una vez que se corrobora que todas las poses ocurren en el sitio activo, se lleva a cabo una nueva serie de acoplamiento como se describe a continuación:

Realizamos el **procedimiento de calibración del método** comparando nuestros resultados de las mejores poses del Docking ciego descrito anteriormente, con las estructuras experimentales de las moléculas de los fármacos SAHA, TSA y (1R,2R,3R)-2-[4-(5-fluoranylpirimidin-2-il)fenil]-N-oxidanyl-3-fenil-ciclopropano-1-carboxamida co-cristalizadas con cada uno de los sistemas (HDACs) obtenidas en el PDB, con la finalidad de encontrar los parámetros adecuados para el refinamiento de los acoplamiento molecular obteniendo valores de la desviación cuadrática media, (RMSD por sus siglas en inglés), inferiores a 2 Å en todos los casos (ver **Figura 7**).

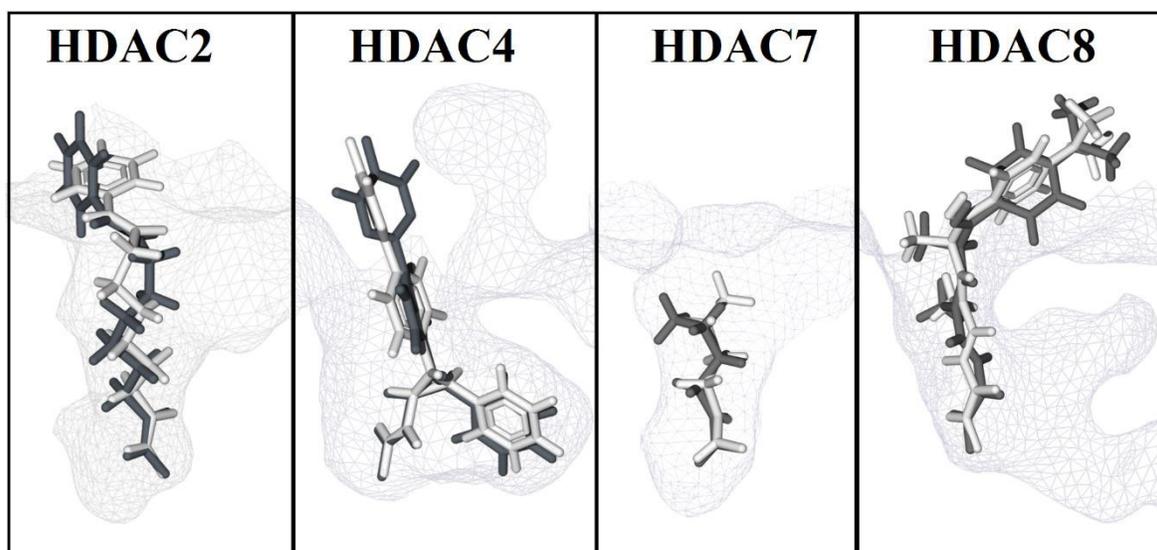


Figura 7. Ligandos co-cristalizados experimentalmente en color blanco y mejor pose obtenida por medio de acoplamiento molecular *in silico* en color gris en cada una de las isoformas de HDAC seleccionadas. El RMSD obtenido para el ligando SAHA co-cristalizado en HDAC2 es igual a 1.14 Å, y el RMSD obtenido para el ligando (1R,2R,3R)-2-[4-(5-fluoranilpirimidin-2-il)fenil]-N-oxidanil-3-fenil-ciclopropano-1-carboxamida co-cristalizado en HDAC4 es igual 0.69 Å, el RMSD obtenido para el ligando N-hidroxiopropanamida, co-cristalizado en HDAC7 es igual a 0.91 Å y finalmente, el RMSD obtenido para el ligando TSA co-cristalizado en HDAC8 es igual a 0.90 Å.

Llevamos a cabo una nueva serie de acoplamiento molecular con los parámetros obtenidos durante el proceso de calibración; centrando ahora la esfera que delimita la región de acoplamiento en el sitio activo de cada una de las isoformas, el radio de dicha esfera fue de 15 Å, usando una malla espacial con tamiz de 0.2 Å y un número máximo de 10000 iteraciones. Los algoritmos de búsqueda y evaluación empleados fueron *MolDock Simplex Evolution* y *MolDock Score* (Thomsen and Christensen, 2006), **ver detalles técnicos en Apéndice B.**

Finalmente revisamos las mejores poses y re-evaluamos las interacciones de tipo enlaces de hidrógeno, reportamos entonces los mejores modos de acoplamiento (poses con las energías de interacción más negativas).

CAPÍTULO 4 - Resultados y Discusión

4.1 Simulaciones de Dinámica Molecular

4.1.1 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC2

El sitio activo de HDAC2 consta de un túnel de aproximadamente 90 \AA^3 de volumen que se compone de unos cuantos aminoácidos en torno a un átomo de zinc que está coordinado por 3 residuos específicos, Aspartato 181, Histidina 183 y Aspartato 269. Los residuos Histidina 145 e Histidina 146 tienen un heterociclo que contiene 2 átomos de nitrógeno, uno de ellos protonado y el otro no, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno los átomos de nitrógeno mencionados y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo Tirosina 308 durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. Los residuos Fenilalanina 155 y Fenilalanina 210 se encuentran en la parte central del túnel que constituye el sitio activo de HDAC2, reportamos aquí como cambia la distancia entre los átomos de carbono en posición *para* de cada uno de ellos durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. Los residuos Aspartato 104 e Histidina 33 se encuentran en la parte superior del túnel que compone el sitio activo de HDAC2, el residuo Histidina 33 contiene un heterociclo con dos átomos de nitrógeno, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de nitrógeno y cada uno de los átomos de oxígeno del residuo Aspartato 104 (ver **Figura 8**).

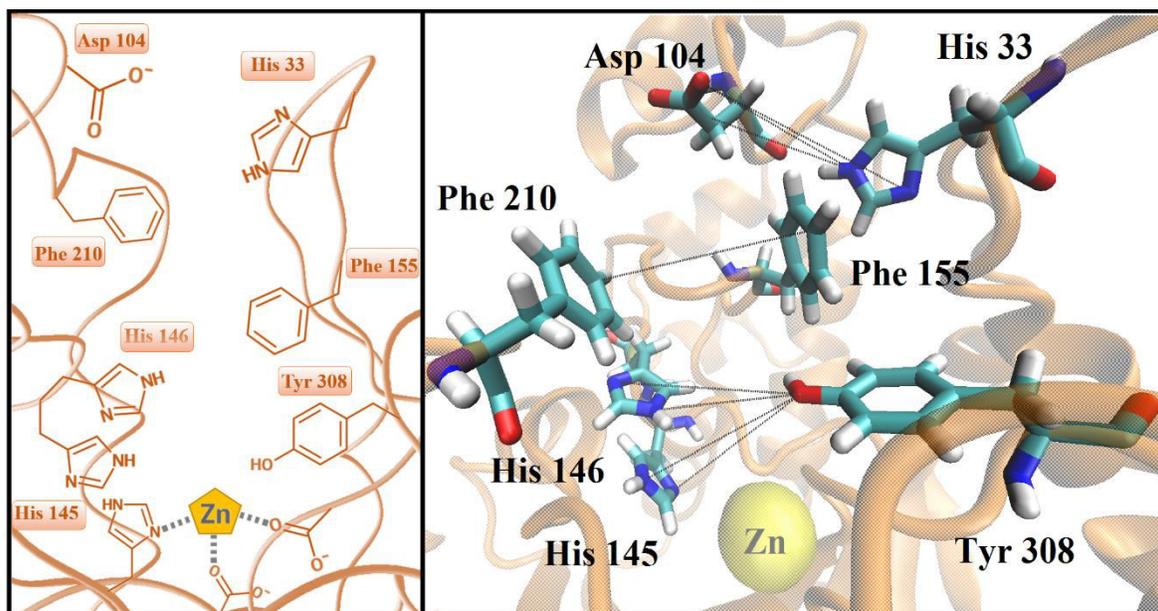


Figura 8. Residuos que componen el sitio activo de HDAC2. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 145 y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $8.13 \pm 0.36 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $7.81 \pm 0.34 \text{ \AA}$. No hay una diferencia contundente entre los movimientos de ambos átomos que permita considerar que uno de ellos se encuentra expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo (ver **Figura 9**).

La tirosina 308 tiene un grupo hidroxilo, es decir un átomo de oxígeno con un hidrógeno expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo, por lo que es conveniente proponer un enlace de hidrógeno de tipo aceptor entre la molécula candidato a fármaco y este residuo.

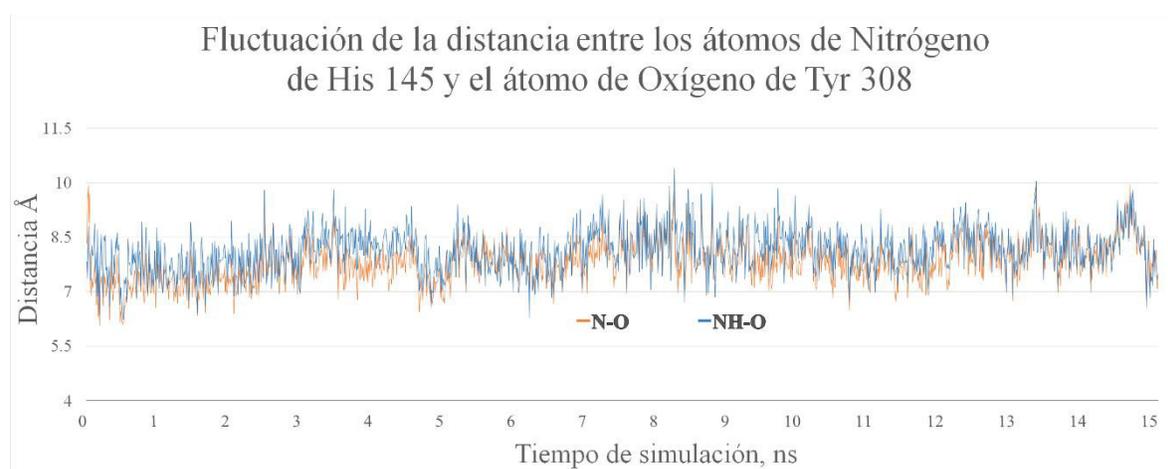


Figura 9. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 145 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 145 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 146 y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $8.98 \pm 0.78 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $8.88 \pm 1.27 \text{ \AA}$ (ver **Figura 10**). No hay una diferencia contundente entre los movimientos de ambos átomos que permita considerar que uno de ellos se encuentra expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo. Sin embargo, es notorio que en el periodo comprendido entre 0.5 y 3 nanosegundos el átomo de nitrógeno no protonado permanece a una distancia claramente menor del átomo de oxígeno de tirosina que el átomo protonado, por lo que puede considerarse que durante la primera parte de la simulación el átomo de nitrógeno no protonado permanece expuesto hacia el interior del túnel que compone sitio activo.

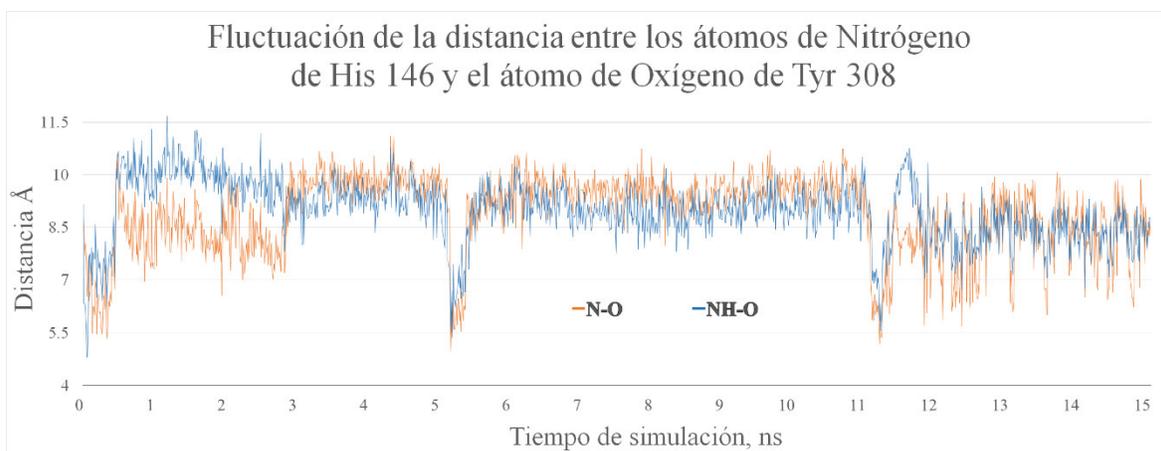


Figura 10. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 208 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono en la posición *para* de Fenilalanina 210 oscilan alrededor de $7.59 \pm 1.12 \text{ \AA}$ (ver **Figura 11**). Se sabe que las interacciones de tipo apilamiento son óptimas cuando los centros de los anillos bencénicos se encuentran en distancias comprendidas en el intervalo de 3.5 a 5 Å, por lo que colocar un anillo bencénico u otro aromático, incluso una cadena alifática conjugada tiene el potencial de formar una interacción de tipo apilamiento con uno o ambos anillos de Fenilalanina y con ello conseguir un mejor anclaje del ligando en el sitio activo de HDAC2 cuya consecuencia sería una mejora en la capacidad inhibitoria, es decir que se tendría un fármaco más potente.

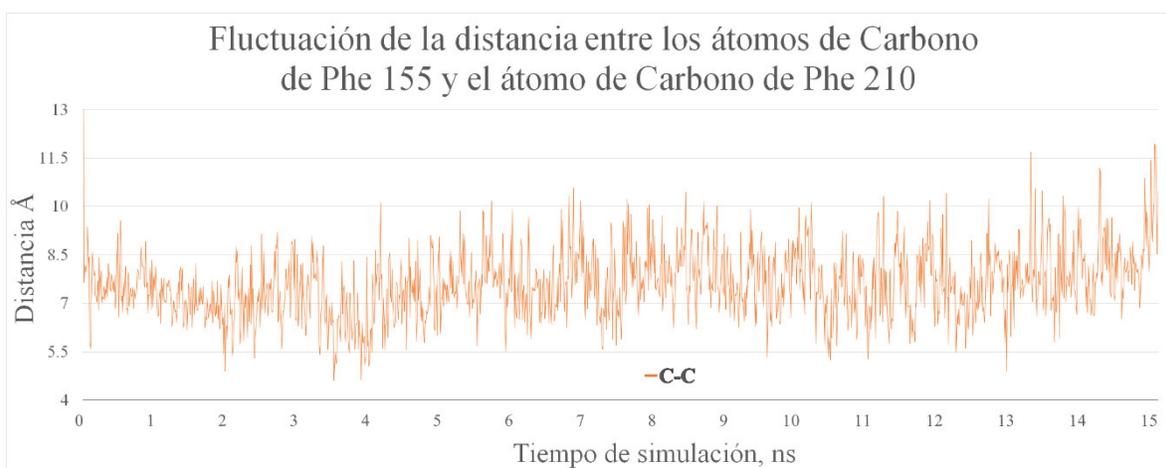


Figura 11. Distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición *para* durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.

El residuo Aspartato tiene dos átomos de oxígeno equivalentes, entre los cuales se distribuye la carga negativa. Se muestran a continuación, los resultados de las distancias entre cada uno de los átomos de oxígeno de Aspartato 104 y cada uno de los átomos de nitrógeno de Histidina 33.

Con respecto al primer átomo de oxígeno de Aspartato 104: Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 33 y uno de los átomos de oxígeno del Aspartato 104 oscilan alrededor de $8.44 \pm 2.00 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre los átomos de nitrógeno no protonado y el mismo átomo de oxígeno del Aspartato 104 oscilan alrededor de $10.04 \pm 1.87 \text{ \AA}$ (ver **Figura 12**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado permanece expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo que el átomo de nitrógeno no protonado.

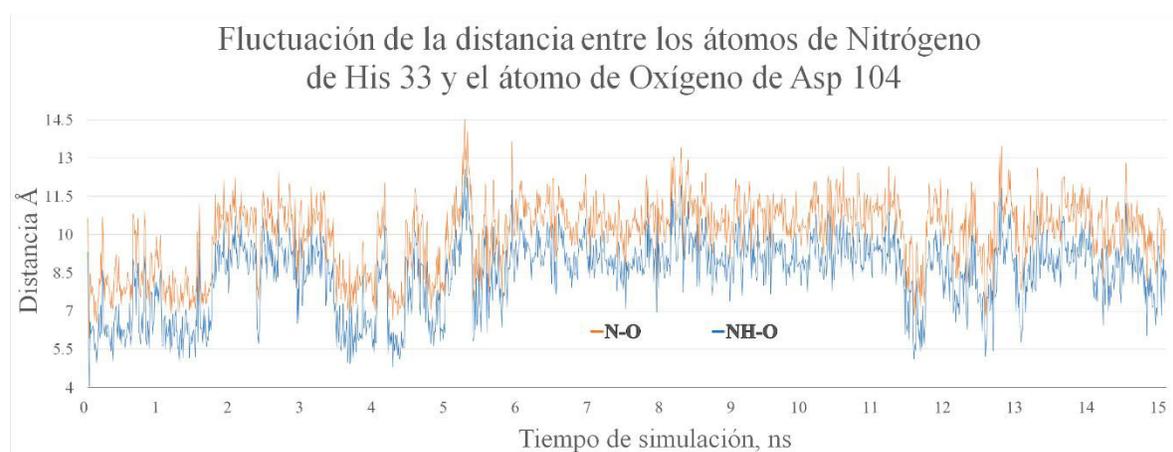


Figura 12. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.

Con respecto al segundo átomo de oxígeno de Aspartato 104: Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 33 y uno de los átomos de oxígeno del Aspartato 104 oscilan alrededor de $8.49 \pm 2.28 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre los átomos de nitrógeno no protonado y el mismo átomo de oxígeno del Aspartato 104 oscilan alrededor de $10.08 \pm 2.06 \text{ \AA}$ (ver **Figura 13**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado permanece expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo que el átomo de nitrógeno no protonado.

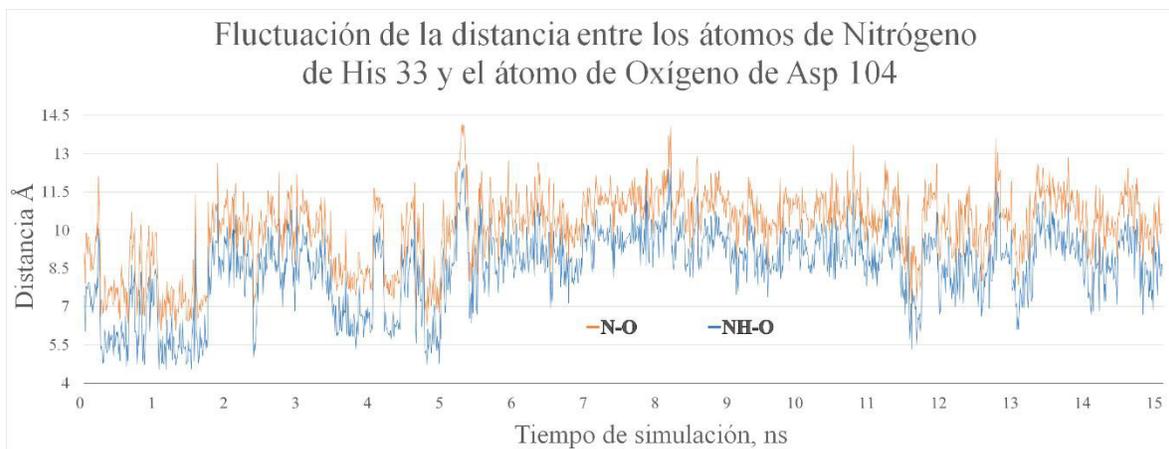


Figura 13. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 33 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 146 y el átomo de Oxígeno de Aspartato 104 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC2 de 15 nanosegundos.

4.1.2 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC4

El sitio activo de HDAC4 consta de un túnel de aproximadamente 105 \AA^3 de volumen que se compone de unos cuantos aminoácidos en torno a un átomo de Zn(II) que está quelado por 3 residuos específicos, Aspartato 196, Histidina 198 y Aspartato 290. Los residuos Histidina 802 e Histidina 803 tienen un heterociclo que contiene 2 átomos de nitrógeno, uno de ellos protonado y el otro no, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno los átomos de nitrógeno mencionados y el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del residuo Tirosina 308 durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. Los residuos Fenilalanina 812 y Fenilalanina 870 se encuentran en la parte central del túnel que constituye el sitio activo de HDAC4, reportamos aquí como cambia la distancia entre los átomos de carbono en posición *para* de cada uno de ellos durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. En el centro del túnel que compone el sitio activo también se encuentra el residuo Arginina 798 que contiene dos átomos de nitrógeno protonados y se reporta aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de nitrógeno de Arginina 798 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870. Histidina 675 se encuentra en la parte superior del túnel que compone el sitio activo de HDAC4, el residuo Histidina 675 contiene un heterociclo con dos átomos de nitrógeno, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de nitrógeno y el átomo de carbono en la posición *para* de Fenilalanina 870 (ver **Figura 14**).

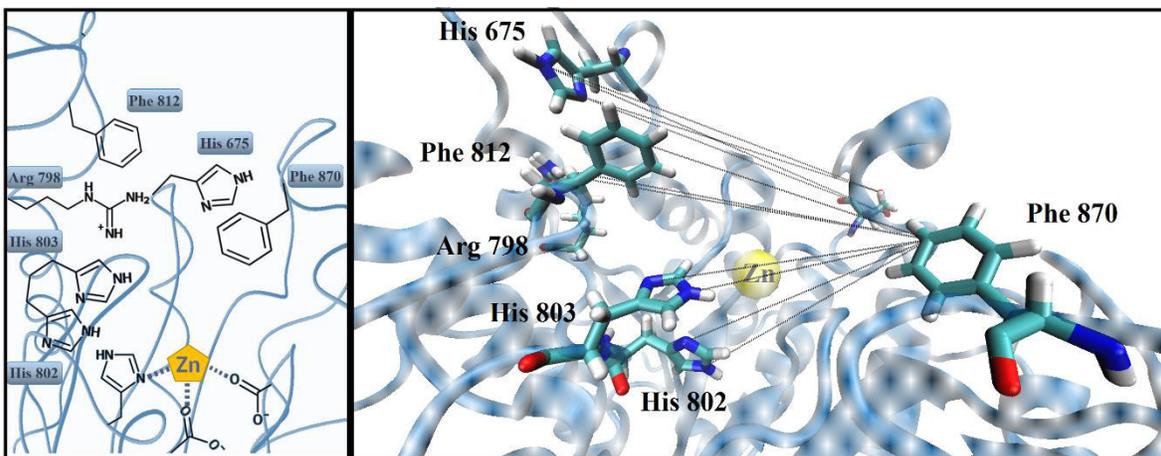


Figura 14. Residuos que componen el sitio activo de HDAC4. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 802 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $11.89 \pm 1.55 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $12.67 \pm 1.34 \text{ \AA}$ (ver **Figura 15**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado permanece expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo que el átomo de nitrógeno no protonado, aunque la diferencia entre las distancias sigue siendo pequeña.

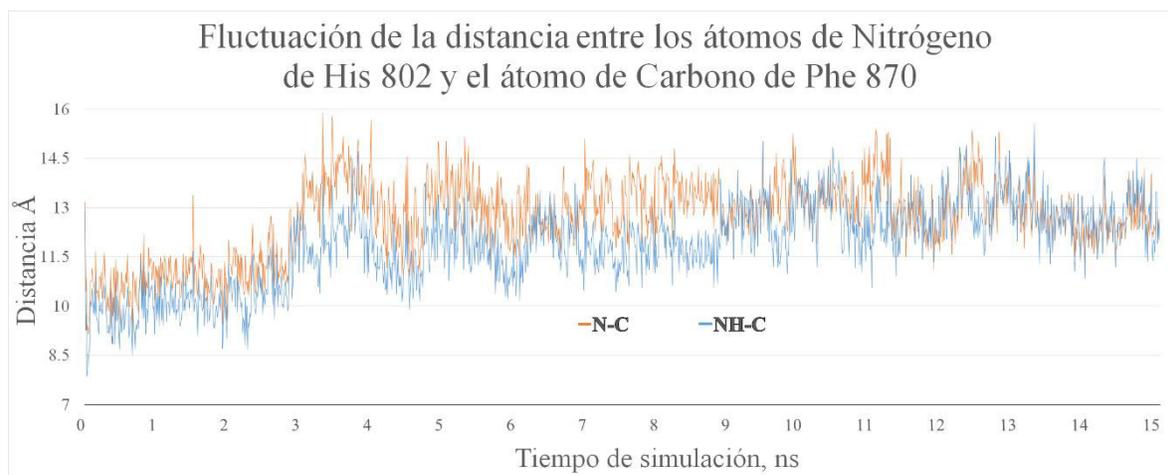


Figura 15. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 802 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 802 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 803 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $13.00 \pm 0.53 \text{ \AA}$,

mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $12.76 \pm 0.55 \text{ \AA}$ (ver **Figura 16**). No hay una diferencia contundente entre los movimientos de ambos átomos que permita considerar que uno de ellos se encuentra expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo.

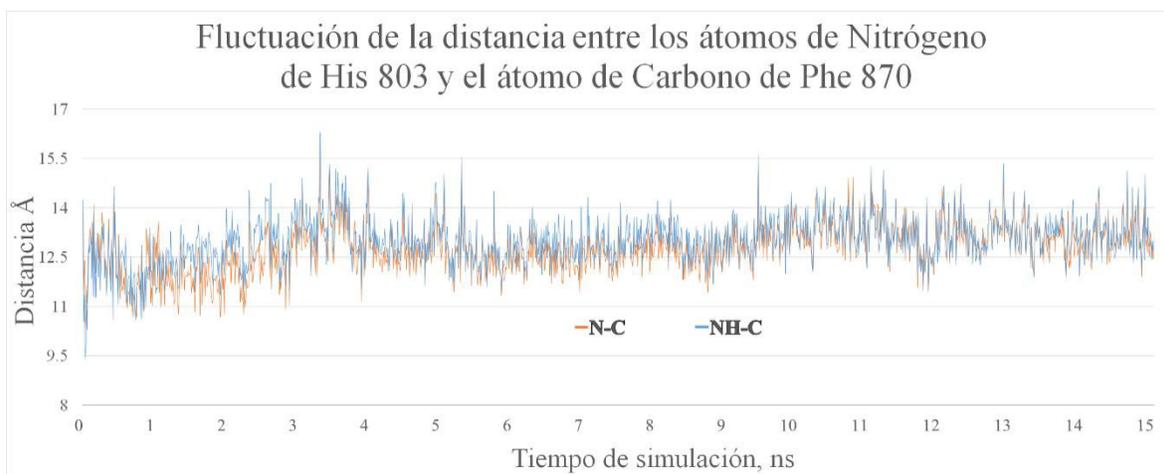


Figura 16. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 803 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 803 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Arginina 798 más cercano al esqueleto de la proteína y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $25.50 \pm 2.04 \text{ \AA}$. Las distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado y con carga positiva de Arginina 798 y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $23.74 \pm 2.10 \text{ \AA}$. Las distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Arginina 798 más alejado del esqueleto de la proteína y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $23.42 \pm 1.95 \text{ \AA}$. Es notorio que los átomos de nitrógeno protonados de Arginina 798 no quedan expuestos hacia el interior del túnel del sitio activo (ver **Figura 17**).

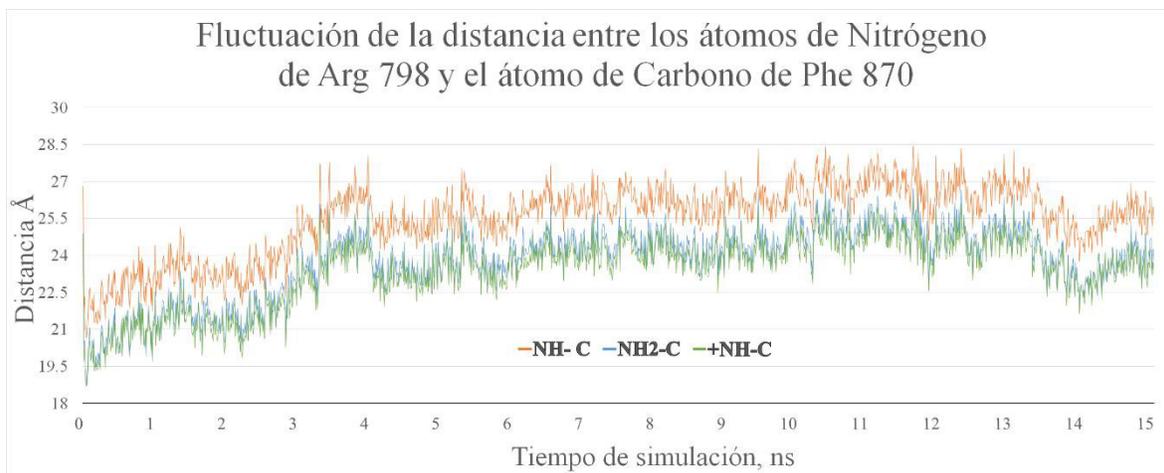


Figura 17. Distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado más cercano al esqueleto de la proteína de Arginina 798 y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 (línea naranja), distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado más alejado del esqueleto de la proteína de Arginina 803 y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 (línea azul) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado y con carga de Arginina 798 y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 (línea verde) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 812 y el átomo de Carbono en la posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $16.81 \pm 3.86 \text{ \AA}$ (ver **Figura 18**).

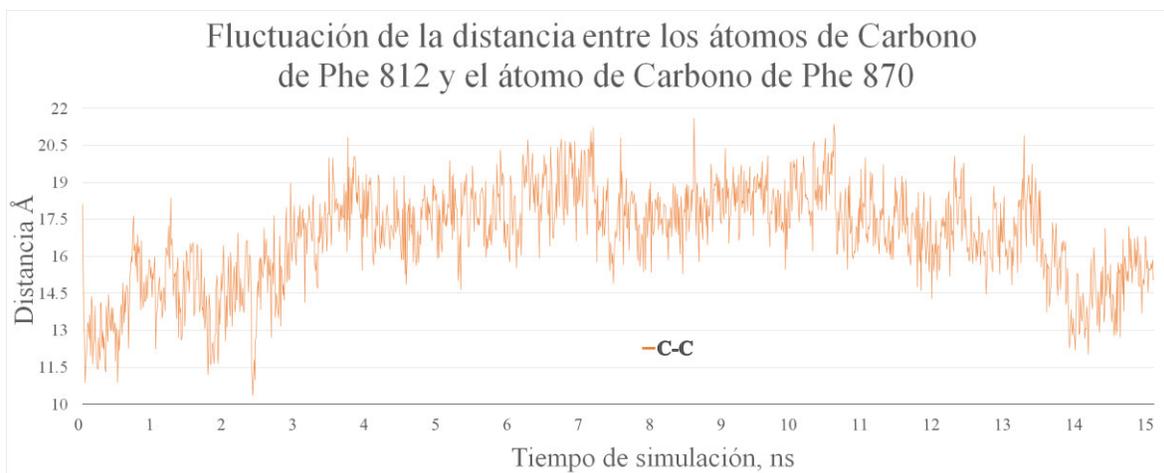


Figura 18. Distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición *para* durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 675 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $20.78 \pm 1.78 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $20.12 \pm 1.71 \text{ \AA}$. No hay una diferencia

contundente entre los movimientos de ambos átomos que permita considerar que uno de ellos se encuentra expuesto hacia el interior del túnel del sitio activo por más tiempo (ver **Figura 19**).

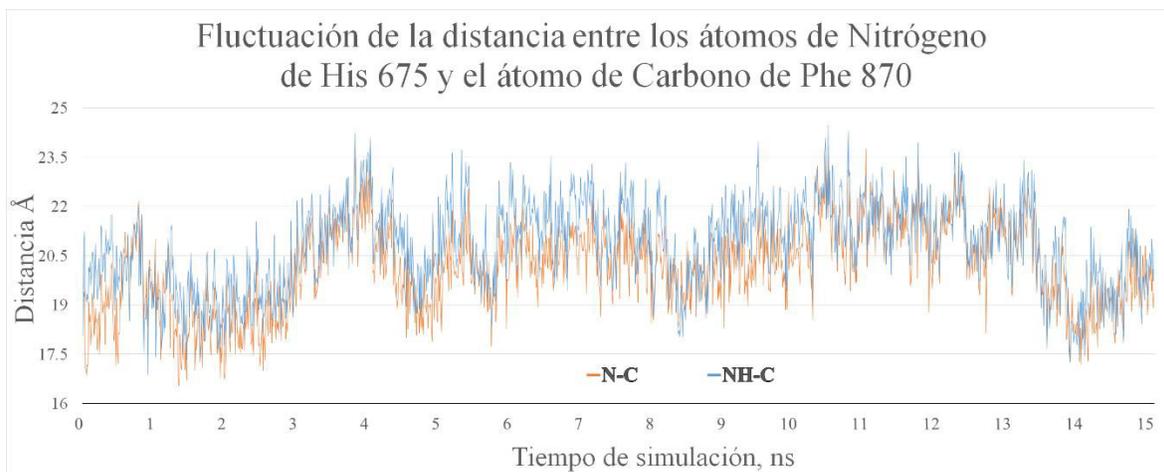


Figura 19. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 675 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 675 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 870 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC4 de 15 nanosegundos.

4.1.3 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC7

El sitio activo de HDAC7 consta de un túnel de aproximadamente 116 \AA^3 de volumen que se compone de unos cuantos aminoácidos en torno a un átomo de zinc que está quelado por 3 residuos específicos, Aspartato 707, Histidina 709 y Aspartato 801. Los residuos Histidina 669 e Histidina 670 tienen un heterociclo que contiene 2 átomos de nitrógeno, uno de ellos protonado y el otro no, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de nitrógeno mencionados y el átomo de carbono en posición *para* del residuo Fenilalanina 738 durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. Los residuos Fenilalanina 679 y Fenilalanina 738 se encuentran en la parte central del túnel que constituye el sitio activo de HDAC7, reportamos aquí como cambia la distancia entre los átomos de carbono en posición *para* de cada uno de ellos durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. El Aspartato 626 se encuentra en la parte superior del túnel que compone el sitio activo de HDAC7, el residuo Aspartato 626 contiene dos átomos de oxígeno sobre los que reparte la carga negativa, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de oxígeno y el átomo de carbono en la posición *para* de Fenilalanina 738 (ver **Figura 20**).

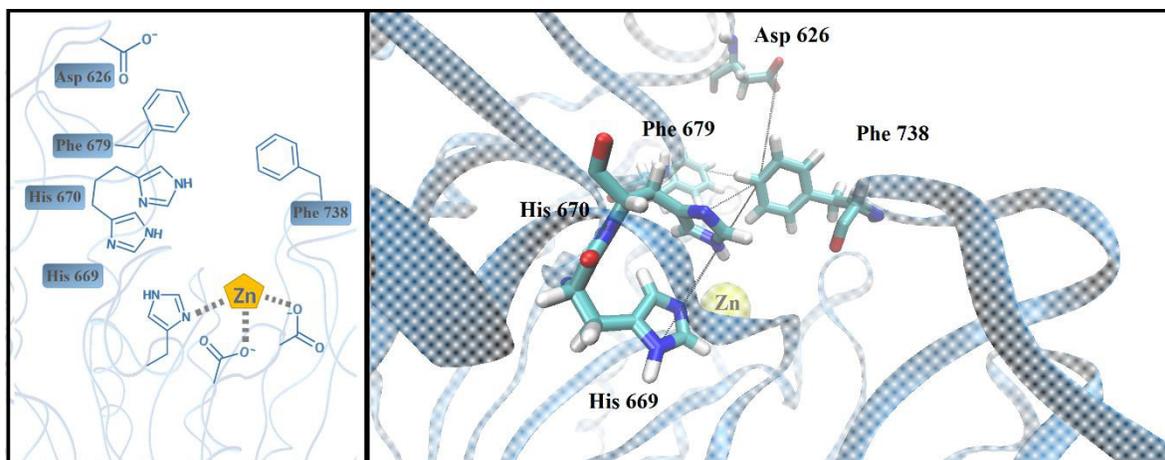


Figura 20. Residuos que componen el sitio activo de HDAC7. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 669 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 oscilan alrededor de $8.77 \pm 0.80 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $10.37 \pm 0.75 \text{ \AA}$ (ver **Figura 21**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 669 permanece más cerca del átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738.

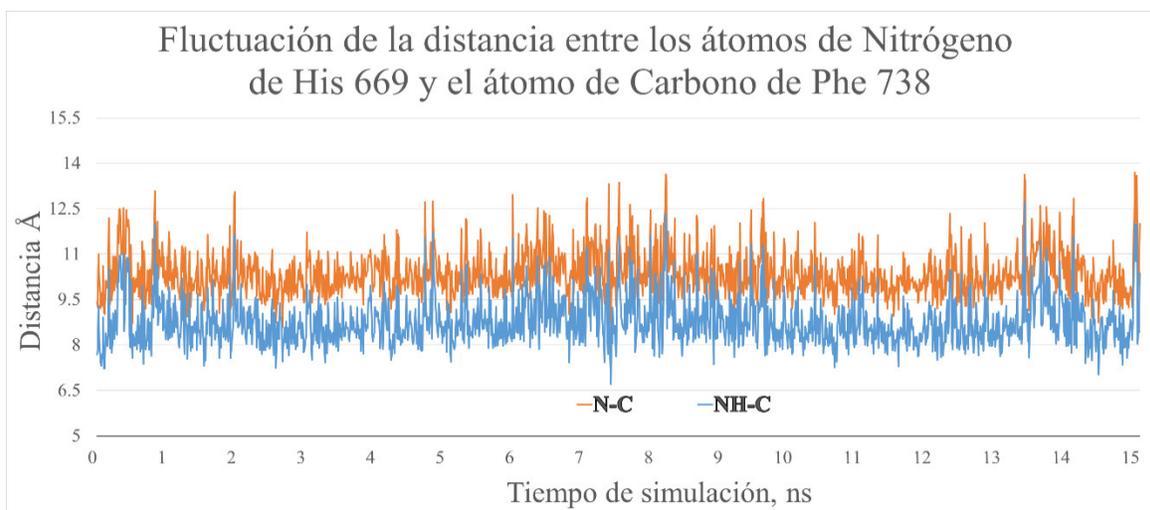


Figura 21. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea naranaja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 670 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 oscilan alrededor de $4.91 \pm 0.73 \text{ \AA}$,

mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 870 oscilan alrededor de $4.15 \pm 0.73 \text{ \AA}$ (ver **Figura 22**). Es notorio que el átomo de nitrógeno no protonado de Histidina 670 permanece más cerca del átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738.

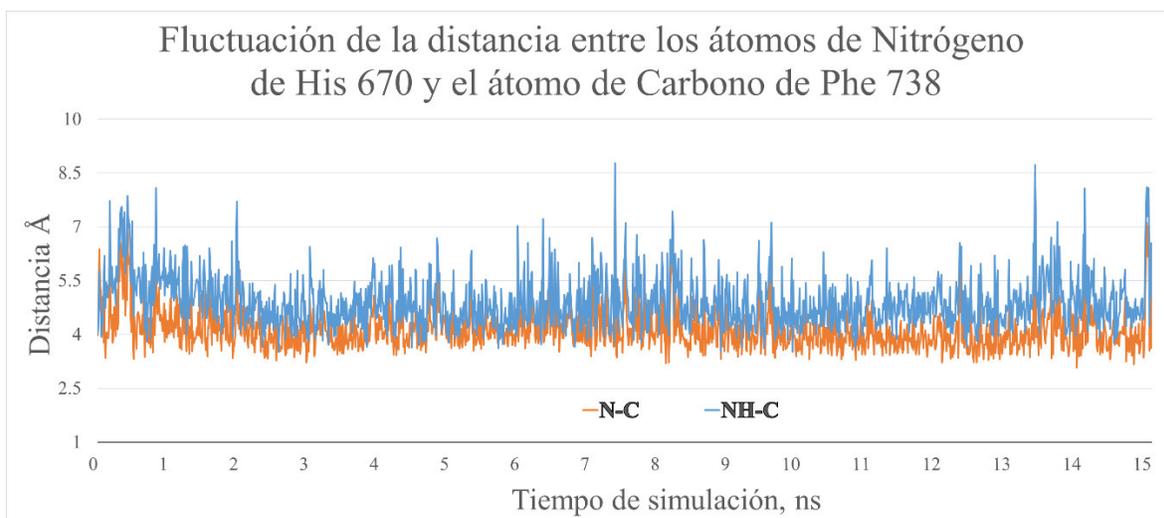


Figura 22. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 670 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 669 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 679 y el átomo de Carbono en la posición *para* de Fenilalanina 738 oscilan alrededor de $8.06 \pm 1.11 \text{ \AA}$ (ver **Figura 23**).

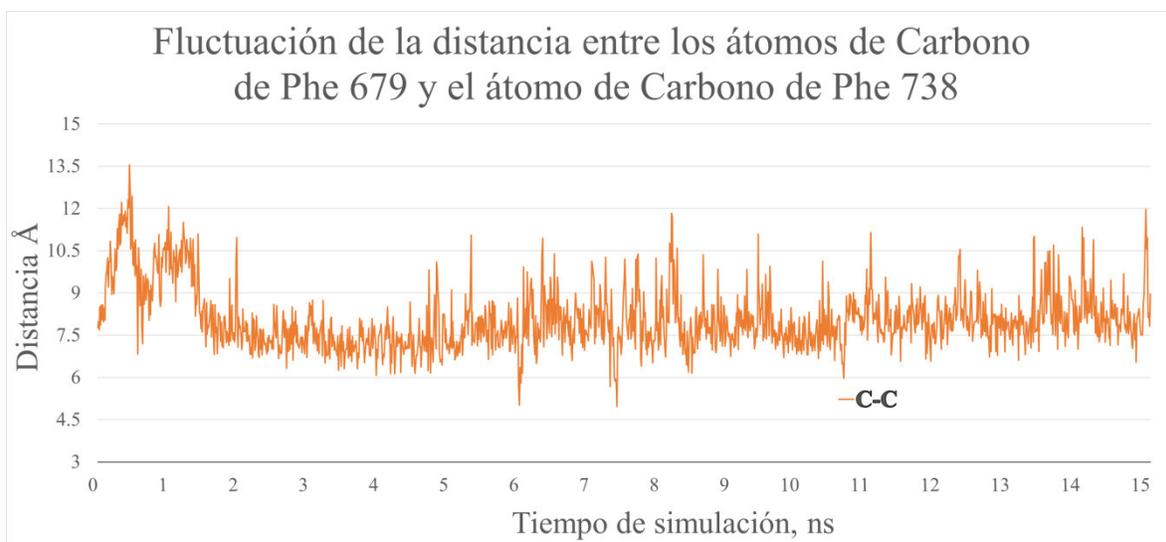


Figura 23. Distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 679 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 738 en posición *para* durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.

El residuo Aspartato 626 tiene dos átomos de oxígeno equivalentes, entre los cuales se distribuye la carga negativa. Se muestran ahora los resultados de las distancias entre cada uno de los átomos de oxígeno de Aspartato 626 y el átomo en posición *para* de Fenilalanina 738.

Durante la simulación de DM las distancias entre uno de los átomos de oxígeno de Aspartato 626 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 oscilan alrededor de $6.83 \pm 1.70 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el otro átomo de oxígeno de Aspartato 626 y el átomo de carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 oscilan alrededor de $6.54 \pm 1.41 \text{ \AA}$ (ver **Figura 24**).

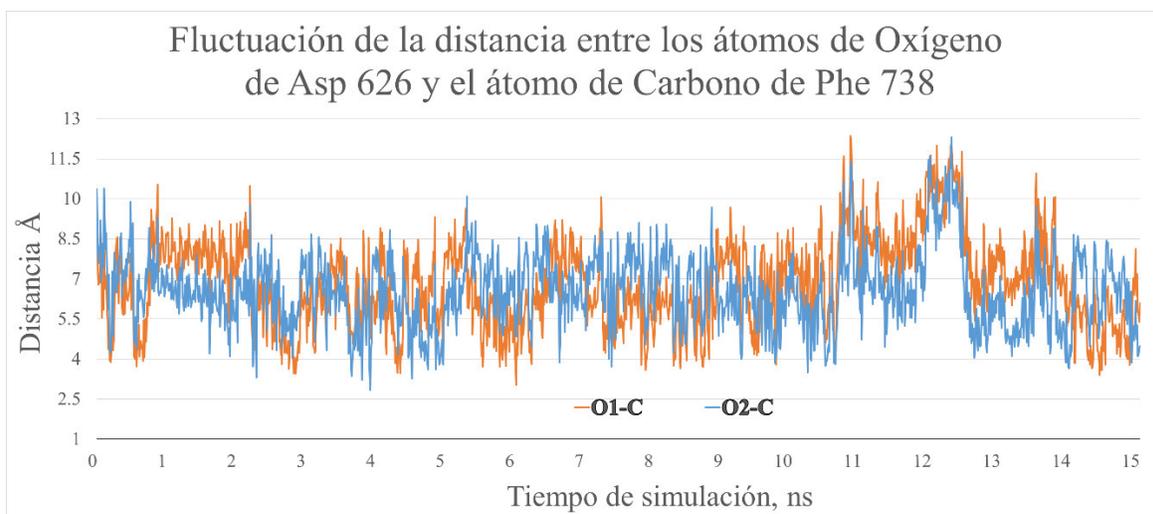


Figura 24. Distancias entre uno de los átomos de Oxígeno de Aspartato 626 y el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 (línea naranja) y distancias entre el otro Oxígeno de Aspartato 626 y el átomo de

Carbono en posición *para* de Fenilalanina 738 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC7 de 15 nanosegundos.

4.1.4 Simulación de Dinámica Molecular de HDAC8

El sitio activo de HDAC8 consta de un túnel de aproximadamente 370 \AA^3 de volumen que se compone de unos cuantos aminoácidos en torno a un átomo de Zn(II) que está quelado por 3 residuos específicos, Aspartato 178, Histidina 180 y Aspartato 267.

En función de los resultados de la simulación de DM es que se hace la selección de aquellos aminoácidos cuyo movimiento los expone hacia el interior del túnel del sitio activo.

Los residuos Histidina 142 e Histidina 143 tienen un heterociclo que contiene 2 átomos de nitrógeno, uno de ellos protonado y el otro no, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de nitrógeno mencionados y el átomo de oxígeno de Tirosina 306 durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. Los residuos Fenilalanina 152 y Fenilalanina 207 se encuentran en la parte central del túnel que constituye el sitio activo de HDAC8, reportamos aquí como cambia la distancia entre los átomos de carbono en posición *para* de cada uno de ellos durante 15 nanosegundos de la simulación de DM. El Aspartato 101 se encuentra en la parte superior del túnel que compone el sitio activo de HDAC7, el residuo Aspartato 101 contiene dos átomos de oxígeno sobre los que reparte la carga negativa, reportamos aquí como cambia la distancia entre cada uno de los átomos de oxígeno y el átomo de carbono del esqueleto de la proteína de Fenilalanina 207. Tirosina 100 se encuentra en la parte superior del túnel que compone el sitio activo de HDAC8, reportamos aquí como cambia la distancia entre el átomo de oxígeno y el átomo de carbono del esqueleto de la proteína de Fenilalanina 207 (**Figura 25**).

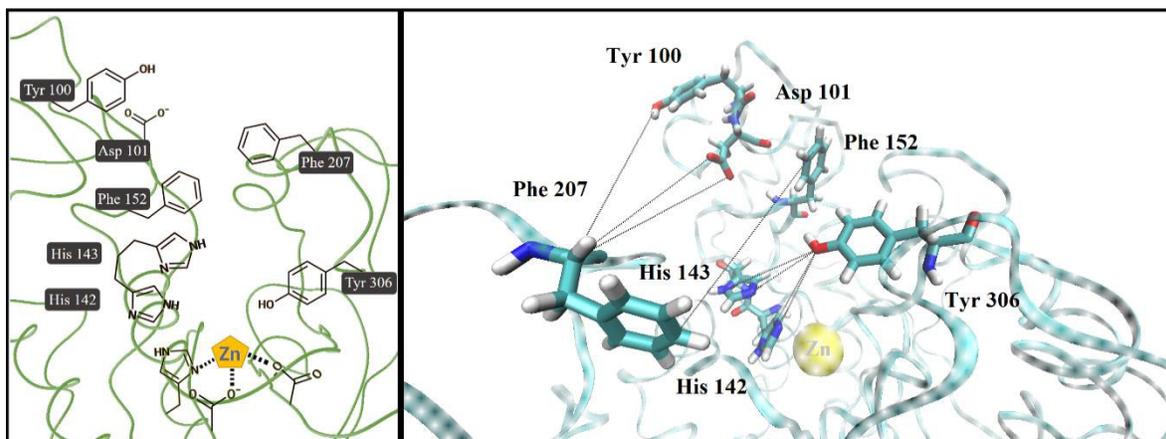


Figura 25. Residuos que componen el sitio activo de HDAC8. Modelo esquemático en 2D (izquierda) y representación espacial con líneas en color negro que indican las distancias de interés (derecha).

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 145 y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $11.26 \pm 3.67 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $13.34 \pm 3.66 \text{ \AA}$ (ver **Figura 26**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 145 permanece más cerca del átomo de oxígeno de Tirosina 308 que el átomo de nitrógeno no protonado durante la simulación de DM.

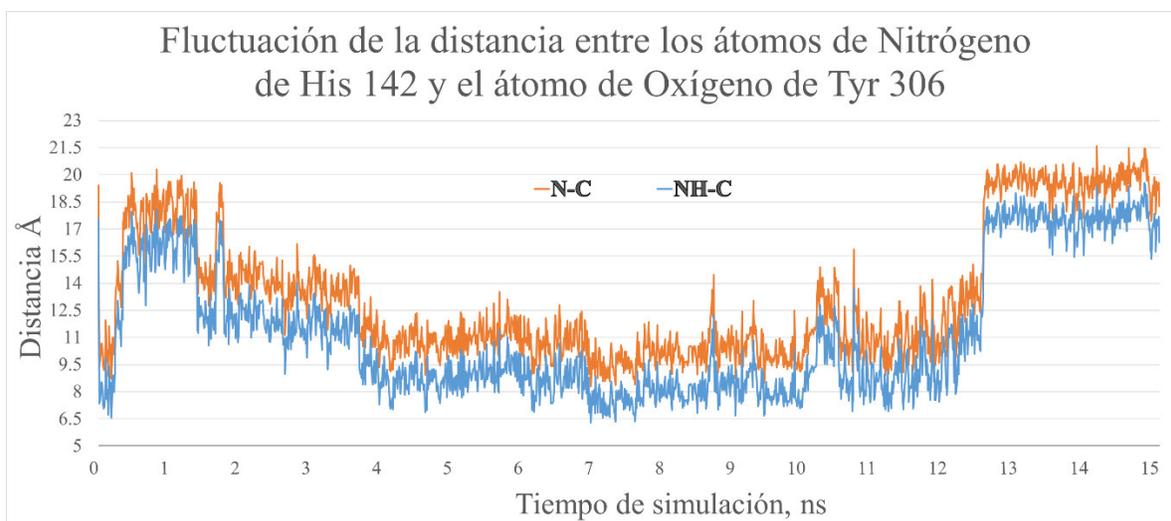


Figura 26. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 142 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 142 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 143 y el átomo de oxígeno de Tirosina 306 oscilan alrededor de $9.28 \pm 3.60 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el átomo de nitrógeno no protonado y el átomo de oxígeno de Tirosina 308 oscilan alrededor de $11.24 \pm 3.59 \text{ \AA}$ (ver **Figura 27**). Es notorio que el átomo de nitrógeno protonado de Histidina 145 permanece más cerca del átomo de oxígeno de Tirosina 308 que el átomo de nitrógeno no protonado durante la simulación de DM.

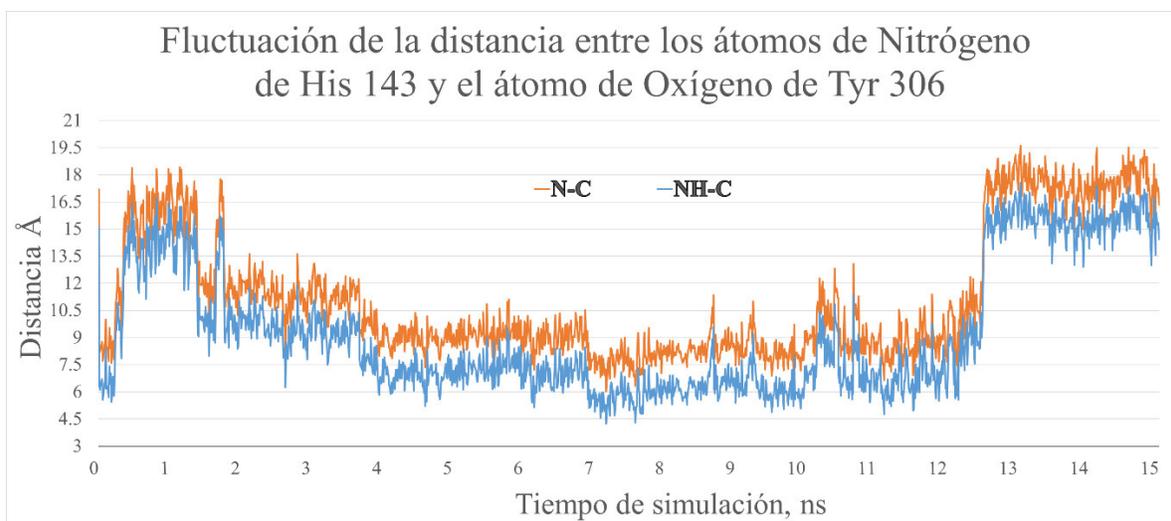


Figura 27. Distancias entre el átomo de Nitrógeno no protonado de Histidina 143 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 306 (línea naranja) y distancias entre el átomo de Nitrógeno protonado de Histidina 143 y el átomo de Oxígeno de Tirosina 308 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 152 y el átomo de Carbono en la posición *para* de Fenilalanina 207 oscilan alrededor de $19.1 \pm 3.2 \text{ \AA}$ (ver **Figura 28**).

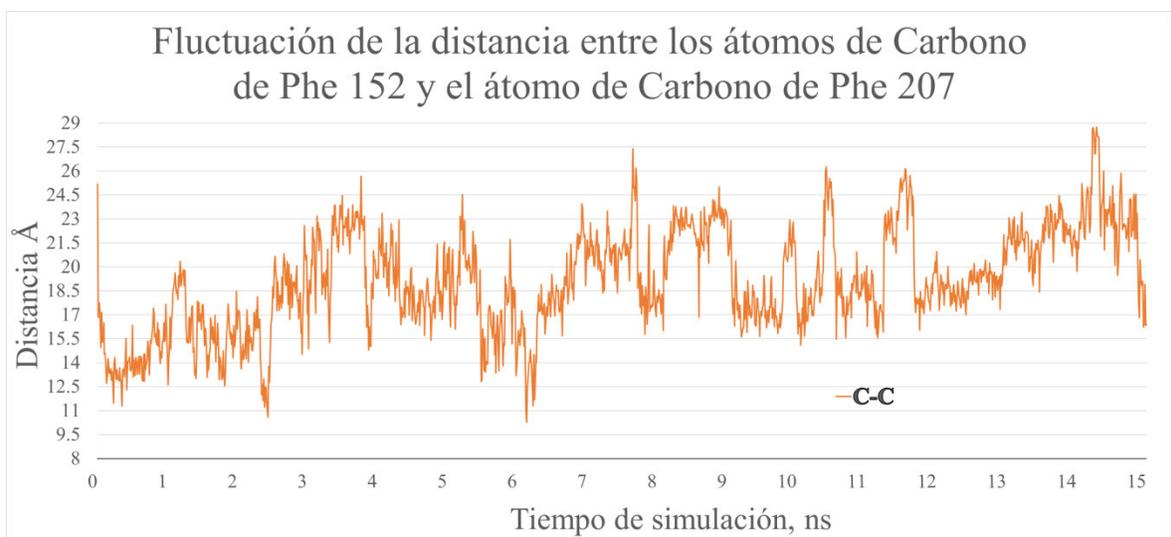


Figura 28. Distancias entre el átomo de Carbono en posición *para* de Fenilalanina 155 y el átomo de Carbono de Fenilalanina 210 en posición *para* durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.

El residuo Aspartato tiene dos átomos de oxígeno equivalentes, entre los cuales se distribuye la carga negativa. Se muestran ahora los resultados de las distancias entre cada uno de los átomos de oxígeno de Aspartato 101 y el átomo de carbono del esqueleto de proteína de Fenilalanina 207.

Durante la simulación de DM las distancias entre el átomo de carbono que pertenece a la cadena principal de aminoácidos de la proteína, también denominada esqueleto proteico, de Fenilalanina 207 y el primer átomo de oxígeno del Aspartato 104 oscilan alrededor de $12.9 \pm 2.00 \text{ \AA}$, mientras que las distancias entre el segundo átomo de oxígeno oscilan alrededor de $12.9 \pm 2.01 \text{ \AA}$ (ver **Figura 29**).

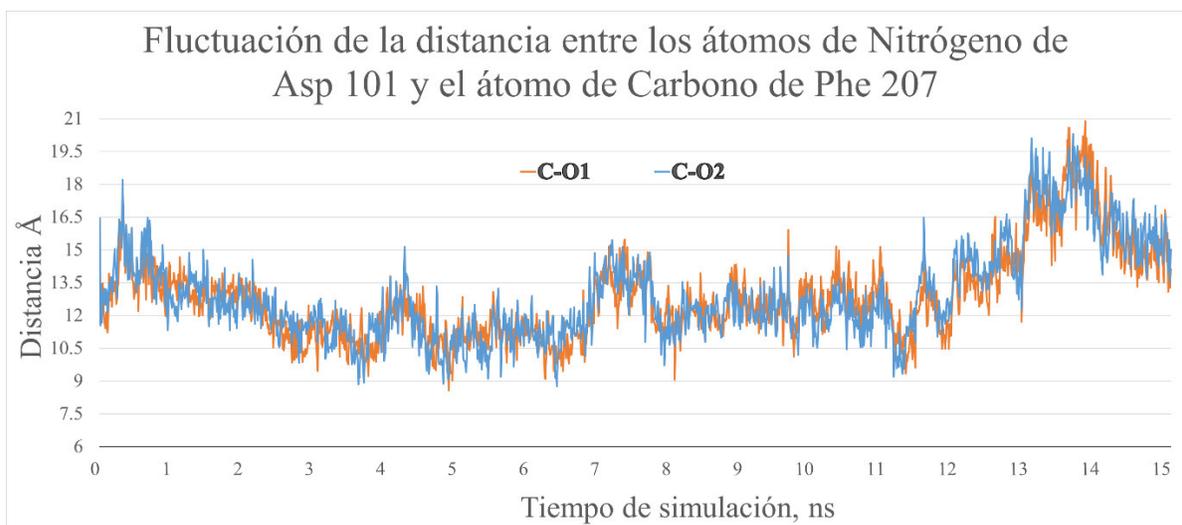


Figura 29. Distancias entre el primer átomo de Oxígeno de Aspartato 104 y el átomo de Carbono del esqueleto proteico de Fenilalanina 207 (línea naranja) y distancias entre el segundo átomo de Oxígeno de Aspartato 104 y el átomo de Carbono del esqueleto proteico de Fenilalanina 207 (línea azul) durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.

Durante la simulación de DM las distancia entre el átomo de oxígeno de Tirosina 100 y el átomo de carbono del esqueleto proteico de Fenilalanina 207 oscilan alrededor de $15.9 \pm 2.00 \text{ \AA}$ (ver **Figura 30**).

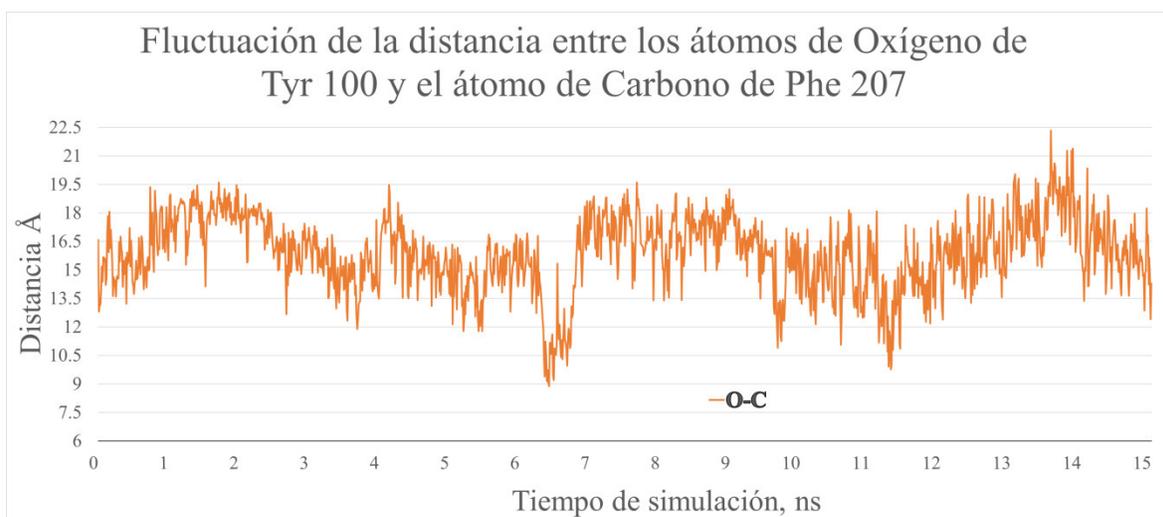


Figura 30. Distancia entre los átomos de Oxígeno de Tirosina 100 y átomo de carbono del esqueleto proteico de Fenilalanina 207 durante una simulación de dinámica molecular de HDAC8 de 15 nanosegundos.

4.2 Generación de modelos de Farmacóforo

Diversos estudios computacionales y experimentales han demostrado que el ácido hidroxámico es el grupo que mejor se coordina con el zinc. Se propone aquí como un elemento del modelo de farmacóforo un grupo que pueda coordinarse de manera bidentada en general, sin embargo, se sugiere enfáticamente que este sea el grupo hidroxámico en todos los casos. También se aclara que la parte inferior de los modelos de farmacóforo que se presentarán en este trabajo corresponde al fondo del sitio activo de cada una de las isoformas, mientras que la parte media corresponde a la parte media del túnel del sitio activo y la parte superior corresponde a la entrada al sitio activo de cada una de las isoformas evaluadas. Los elementos del modelo de farmacóforo se representan con esferas y flechas.

4.2.1 Modelo de Farmacóforo de HDAC2

Los resultados de la simulación de DM sugieren que las Histidinas que componen el fondo del sitio activo de HDAC2 exhiben hacia el interior del túnel tanto el átomo de nitrógeno protonado como el que no está protonado, es decir que, al anclar una molécula en el sitio activo de la enzima, se pueden formar enlaces de hidrógeno tanto de tipo aceptor como donador. Los elementos de farmacóforo que representan enlaces de hidrógeno de tipo donador y aceptor se representan con un par de flechas, una con la punta dirigida hacia la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo aceptor y la otra con la punta dirigida hacia afuera de la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo donador. Las esferas en color rojo representan elementos de farmacóforo que tengan pares electrónicos libres y/o carga negativa, como es el caso de los átomos de oxígeno del grupo hidroxámico. Las esferas de mayor tamaño en color amarillo representan anillos aromáticos y/o deslocalización electrónica debida a nubes de orbitales Pi, causada por la presencia y cercanía de los anillos de benceno de las Fenilalaninas que se encuentran en el centro del túnel que compone el sitio activo se proponen dos elementos de farmacóforo de este tipo alejados por aproximadamente 6 Å de distancia del grupo quelante. En la parte superior del modelo de farmacóforo se proponen dos elementos de farmacóforo, el primero es un grupo cargado positivamente para formar una interacción atractiva de tipo electrostática con el residuo de Aspartato, dicho elemento es representado con una esfera en color azul. El segundo elemento de farmacóforo es un grupo con átomo(s) de hidrógeno(s) para formar un enlace de hidrógeno de tipo aceptor, dado que los resultados de la simulación de DM muestran que el átomo de nitrógeno de Histidina que está protonado es el que permanece expuesto

hacia el interior del túnel que compone el sitio activo y por tanto hacia el elemento de farmacóforo (ver **Figura 31**)

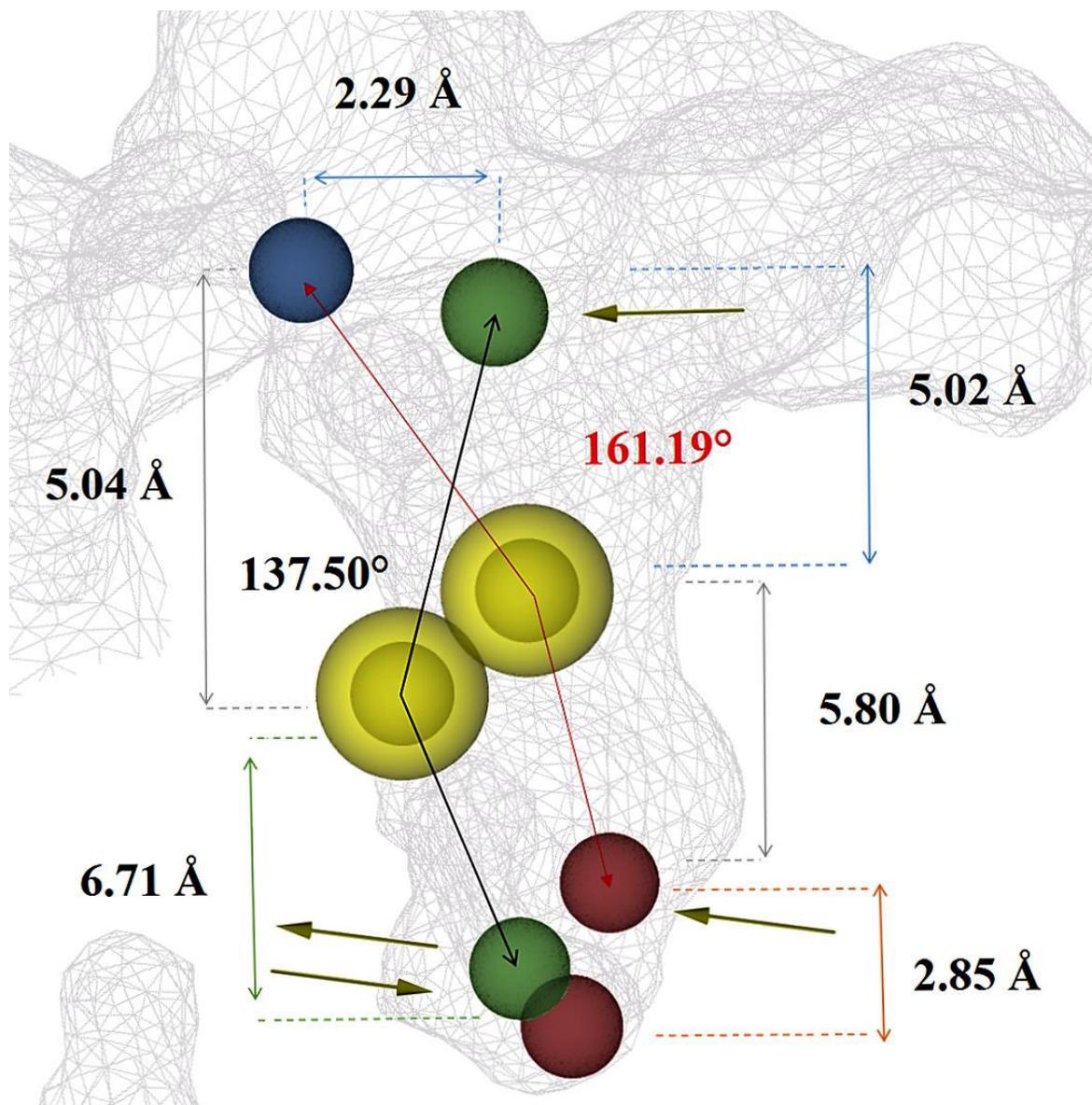


Figura 31. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC2. Elementos de farmacóforo con carga negativa representados como esferas en color rojo, anillos aromáticos representados como esferas en color amarillo, elementos cargados positivamente representados como esferas en color azul y elementos que indican potenciales enlaces de hidrógeno aceptores y donadores representados como flechas dirigidas hacia la esfera en color verde o hacia afuera de la esfera respectivamente.

4.2.2 Modelo de farmacóforo de HDAC4

Los resultados de la simulación de DM sugieren que las Histidinas que componen el fondo del sitio activo de HDAC4 exhiben hacia el interior del túnel tanto el átomo de nitrógeno protonado como el que no está protonado, es decir que, al anclar una molécula en el sitio activo de la enzima, se pueden formar enlaces de hidrógeno tanto de tipo aceptor como donador. Los elementos de farmacóforo que representan enlaces de hidrógeno de tipo donador y aceptor se representan con un par de flechas, una con la punta dirigida hacia la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo aceptor y la otra con la punta dirigida hacia afuera de la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo donador. Las esferas en color rojo representan elementos de farmacóforo que tengan pares electrónicos libres y/o carga negativa, como es el caso de los átomos de oxígeno del grupo hidroxámico. La esfera de mayor tamaño en color amarillo representa un anillo aromático y/o deslocalización electrónica debida a nubes de orbitales Pi. Debido a la presencia y posición de los anillos de benceno de las Fenilalaninas que se encuentran en el centro del túnel que compone el sitio activo se propone un elemento de farmacóforo de este tipo, alejado por aproximadamente 5 Å de distancia del grupo quelante. Se propone un cuarto elemento de farmacóforo representado con una esfera de mayor tamaño en color gris que representa impedimento estérico, si bien no es un elemento necesario, puede favorecer que una molécula sea selectiva hacia esta isoforma, dado que dos de las otras isoformas, HDAC2, HDAC7 no tienen espacio suficiente para albergar una molécula con un grupo estérico voluminoso cerca del grupo quelante (ver **Figura 32**).

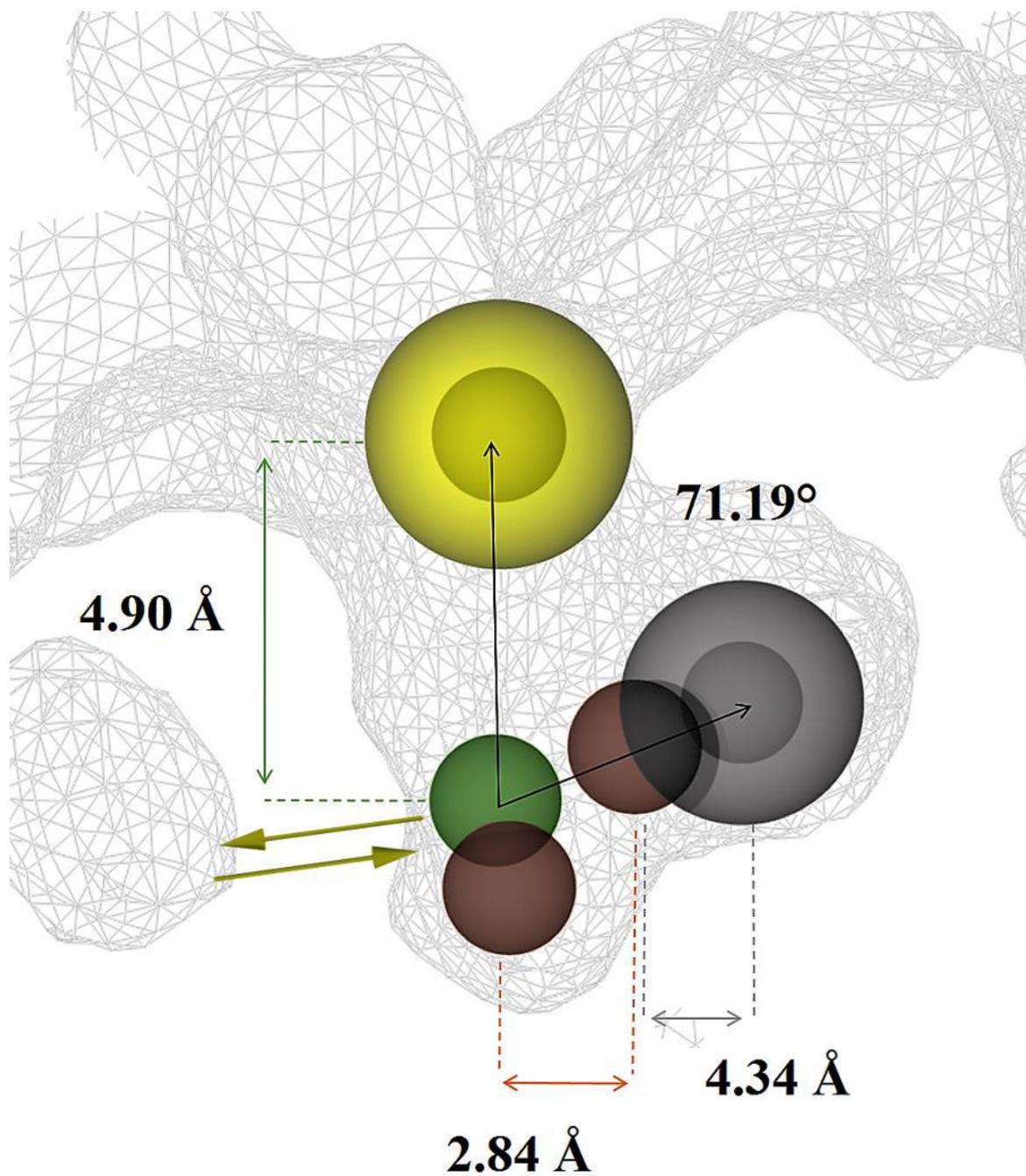


Figura 32. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC4. Elementos de farmacóforo con carga negativa representados como esferas en color rojo, anillos aromáticos representados como esferas en color amarillo, elementos que indican potenciales enlaces de hidrógeno aceptores y donadores representados como flecha dirigidas hacia la esfera en color verde o hacia afuera de la esfera respectivamente y elemento que indica impedimento estérico como esfera en color gris.

4.2.3 Modelo de farmacóforo de HDAC7

Los resultados de la simulación de DM sugieren que las Histidinas que componen el fondo del sitio activo de HDAC7 exhiben hacia el interior del túnel tanto el átomo de nitrógeno protonado como el que no está protonado, es decir que, al anclar una molécula en el sitio activo de la enzima, se pueden formar enlaces de hidrógeno tanto de tipo aceptor como donador. Los elementos de farmacóforo que representan enlaces de hidrógeno de tipo donador y aceptor se representan con un par de flechas, una con la punta dirigida hacia la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo aceptor y la otra con la punta dirigida hacia afuera de la esfera del elemento de farmacóforo en color verde que indica la posible formación de un enlace de hidrógeno de tipo donador. Las esferas en color rojo representan elementos de farmacóforo que tengan pares electrónicos libres y/o carga negativa, como es el caso de los átomos de oxígeno del grupo hidroxámico. Las esferas de mayor tamaño en color amarillo representan anillos aromáticos y/o deslocalización electrónica debida a nubes de orbitales Pi, debido a la presencia y cercanía de los anillos de benceno de las Fenilalaninas que se encuentran en el centro del túnel que compone el sitio activo, se proponen dos elementos de farmacóforo de este tipo alejados por aproximadamente 6 Å de distancia del grupo quelante. En la parte superior del modelo de farmacóforo se propone como elemento del farmacóforo un grupo cargado positivamente para formar una interacción atractiva de tipo electrostática con el residuo de Aspartato, dicho elemento es representado con una esfera en color azul, dado que el Aspartato tiene, además de carga, pares electrónicos libres, es conveniente que el elemento del farmacóforo propuesto tenga átomo(s) de hidrógeno(s) para formar un enlace de hidrógeno de tipo donador (ver **Figura 33**)

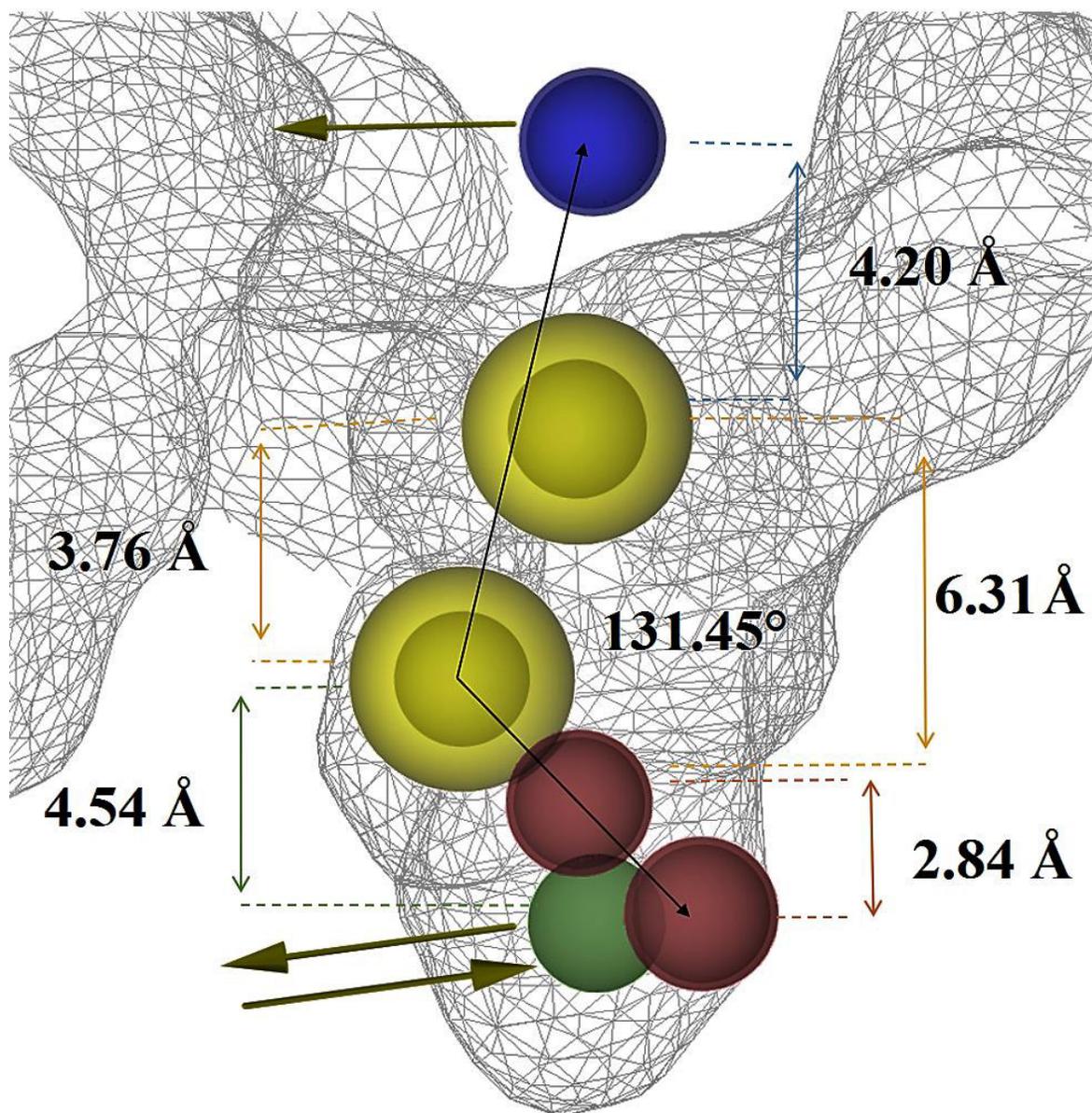


Figura 33. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC7. Elementos de farmacóforo con carga negativa representados como esferas en color rojo, anillos aromáticos representados como esferas en color amarillo, elementos cargados positivamente representados como esferas en color azul y elementos que indican potenciales enlaces de hidrógeno aceptores y donadores representados como flecha dirigidas hacia la esfera en color verde o hacia afuera de la esfera respectivamente.

4.2.4 Modelo de farmacóforo de HDAC8

Los resultados de la simulación de DM sugieren que las Histidinas que componen el fondo del sitio activo de HDAC8 exhiben hacia el interior del túnel el átomo de nitrógeno protonado, es decir que, al anclar una molécula en el sitio activo de la enzima, se pueden formar preferentemente enlaces de hidrógeno de tipo aceptor, esto se representa con una flecha con la punta dirigida hacia la esfera del elemento de farmacóforo en color verde. Las esferas en color rojo representan elementos de farmacóforo que tengan pares electrónicos libres y/o carga negativa, como es el caso de los átomos de oxígeno del grupo hidroxámico. Las esferas de mayor tamaño en color amarillo representan anillos aromáticos y/o deslocalización electrónica debida a nubes de orbitales Pi, debido a la presencia y cercanía de los anillos de benceno de las Fenilalaninas que se encuentran en el centro del túnel que compone el sitio activo se propone un elemento de farmacóforo de este tipo alejado por aproximadamente 7 Å de distancia del grupo quelante. En la parte superior del modelo de farmacóforo se propone como elemento del farmacóforo un grupo cargado positivamente para formar una interacción atractiva de tipo electrostática con el residuo de Aspartato, dicho elemento es representado con una esfera en color azul, dado que el Aspartato tiene, además de carga, pares electrónicos libres, es conveniente que el elemento de farmacóforo propuesto tenga átomo(s) de hidrógeno para formar un enlace de hidrógeno de tipo donador. En la parte superior hay un residuo de Tirosina que tiene un grupo hidroxilo con el que se pueden formar enlaces de hidrógeno tanto de tipo aceptor como donador por lo que se propone como elemento de farmacóforo un grupo o átomo con pares electrónicos libre y/o hidrógenos. También es posible formar una interacción de tipo apilamiento cara-cara desplazada, por lo que se propone el elemento de farmacóforo correspondiente a nubes electrónicas Pi, representado con una esfera en color amarillo. Además, HDAC8 es una proteína que presenta una cavidad mucho mayor que el resto de las isoformas, por lo que se propone un elemento de farmacóforo estérico, con la finalidad de ocupar el volumen disponible en la parte inferior del túnel del sitio activo de la proteína y de esta manera evitar que la molécula que se proponga como HDACi pueda unirse a otras isoformas en las que no hay un volumen disponible para albergar un sustituyente voluminoso cercano al grupo quelante (ver **Figura 34**).

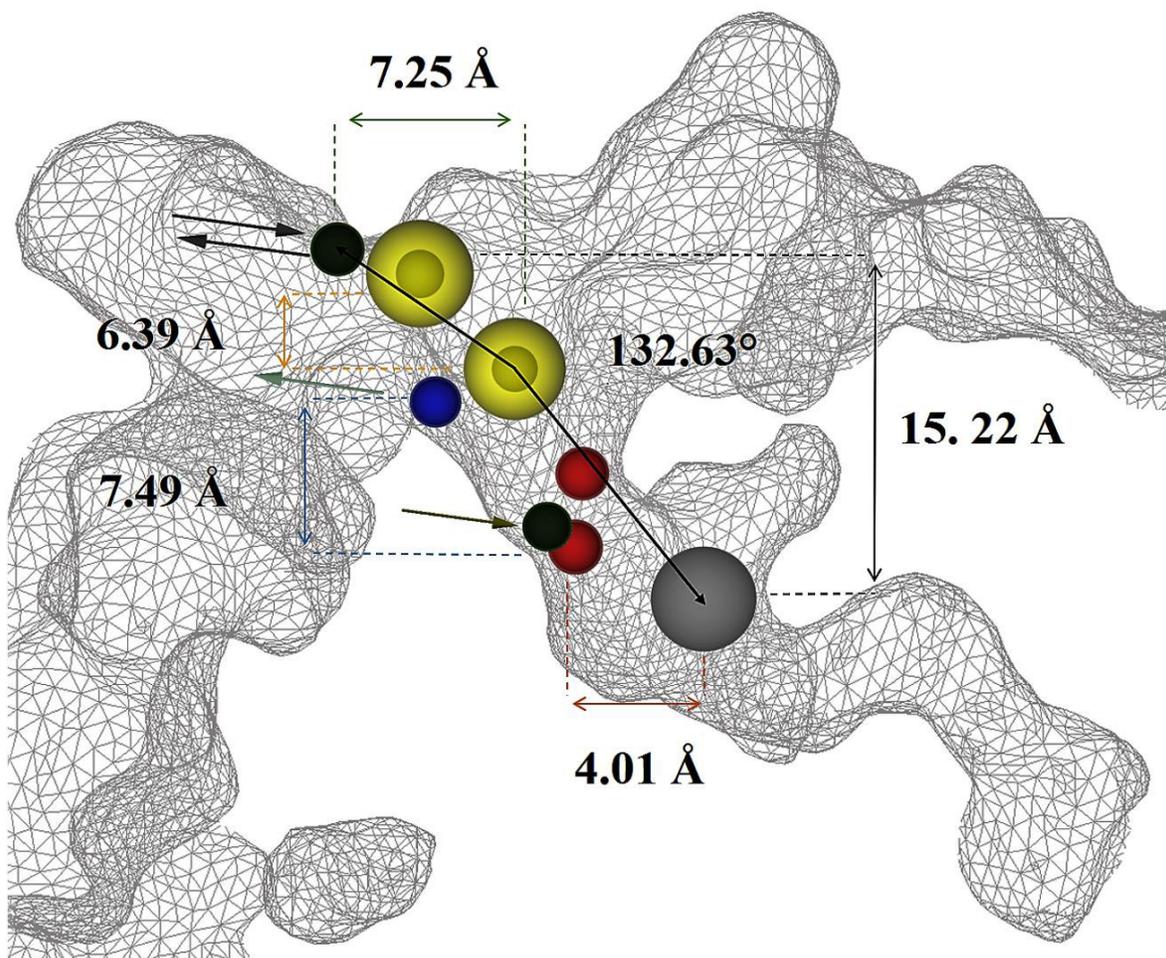


Figura 34. Modelo de farmacóforo propuesto para inhibidores de HDAC8. Elementos de farmacóforo con carga negativa representados como esferas en color rojo, anillos aromáticos representados como esferas en color amarillo, elementos cargados positivamente representados como esferas en color azul, elementos que indican potenciales enlaces de hidrógeno aceptores y donadores representados como flechas dirigidas hacia la esfera en color verde o hacia afuera de la esfera en color azul respectivamente y elemento de farmacóforo estérico representado como esfera en color gris.

4.3 Acoplamiento molecular *in silico* (Docking)

Propuestas de moléculas con probable actividad biológica (PAB).

En los modelos de farmacóforo propuestos aparecen claramente tres secciones: i) La primera de ellas se denomina grupo quelante, FQ, y corresponde al fragmento de la molécula que se unirá directamente al átomo de Zn(II) presente en el sitio activo, ii) La segunda sección se denomina espaciador, FE, y corresponde al fragmento de la molécula que se encuentra unido a FQ e incluye todos los átomos que estén alejados a una distancia menor a 10 Å de FQ, iii) La tercera sección se denomina cubierta, FC, y corresponde al grupo que está unido por el otro extremo a FE y queda expuesto hacia el exterior de la enzima.

4.3.1 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC2, (HDAC2i).

En todos los casos se propone como quelante el grupo hidroxámico, mientras que para el espaciador se proponen 4 distintos fragmentos y para la cubierta se proponen 4 distintos fragmentos (ver **Figura 35**). Cada uno de los fragmentos FC se combina con cada uno de los fragmentos FT, por lo tanto, se obtienen 16 moléculas propuestas.

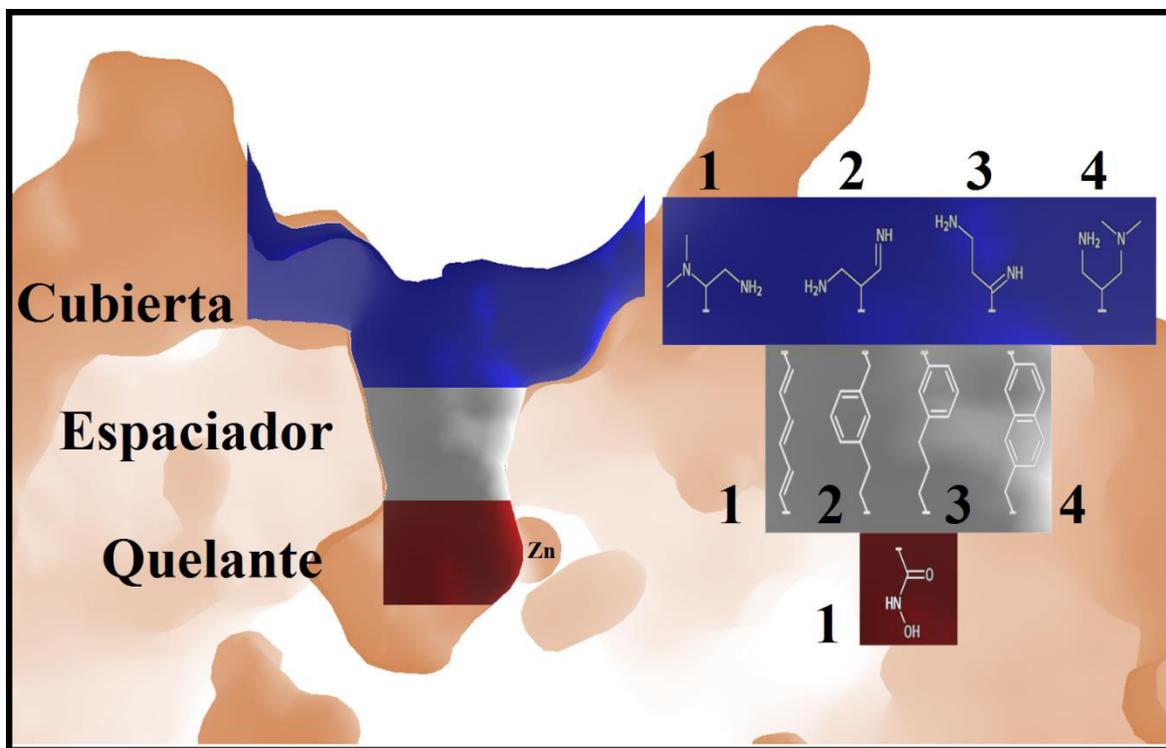


Figura 35. En la parte izquierda de la figura se muestran las tres secciones del modelo de farmacóforo propuesto insertado en el sitio activo de HDAC2: Sección del Fragmento Quelante (FQ) en color rojo, sección del Fragmento Espaciador (FE) en color blanco y sección del Fragmento de Cubierta (FC) en color azul. En la parte derecha de la figura se muestran los distintos fragmentos propuestos: El grupo hidroxámico como Fragmento Quelante 1 en el cuadro en color rojo, cuatro Fragmentos Espaciadores marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color blanco y cuatro Fragmentos de Cubierta marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color azul.

Las 16 moléculas (ver Esquema 1) propuestas fueron construidas uniendo cada uno de los distintos FC a cada uno de los distintos FE y a FQ, es decir que formamos las 16 posibles combinaciones: la primera molécula PAB se obtiene al unir FC 1 a FE 1 y FQ 1 y es nombrada 111, la segunda molécula PAB se obtiene al unir FC1-FE2-FQ1 y es nombrada 121, la tercera FFE3-FQ1 y es nombrada 131, y así sucesivamente hasta llegar a la décimo sexta FC4-FE4-FQ1 que es nombrada 441. Para cada una de las moléculas propuestas se obtuvo una primera geometría optimizada a nivel de mecánica molecular con el campo de fuerzas SYBYL (Mayo *et al.*, 1990) la cual fue utilizada para realizar otro cálculo de reoptimización de geometría con el método semiempírico PM3 (Stewart, 1989). Con esta última geometría se hicieron los **acoplamientos moleculares** con HDAC2 siguiendo el protocolo descrito en el capítulo respectivo y utilizando los parámetros obtenidos durante la calibración del método. Se presenta un esquema con las estructuras de las moléculas propuestas (ver **Esquema1**) seguido de los resultados con las energías de las mejores poses en la siguiente tabla (ver **Tabla 4**).

Esquema 1. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC2.

Molécula	Estructura	Nombre IUPAC
111		<i>(2E,4E,6E)-9-amino-8-(dimetilamino)-N-hidroxinona-2,4,6-trienamida</i>
121		<i>3-(3-(3-amino-2-(dimetilamino)propil)fenil)-N-hidroxiopropanamida</i>
131		<i>4-(3-(2-amino-1-(dimetilamino)etil)fenil)-N-hidroxibutanamida</i>
141		<i>2-(7-(2-amino-1-(dimetilamino)etil)nafalen-2-yl)-N-hidroxiacetamida</i>
211		<i>(2E,4E,6E)-9-amino-N-hidroxi-8-(iminometil)nona-2,4,6-trienamida</i>
221		<i>3-(3-(3-amino-2-(iminometil)propil)fenil)-N-hidroxiopropanamida</i>
231		<i>4-(3-(2-amino-1-(iminometil)etil)fenil)-N-hidroxibutanamida</i>
241		<i>2-(7-(1-amino-3-(iminometil)propan-2-yl)naftalen-2-il)-N-hidroxiacetamida</i>

311		<i>(2E,4E,6E)-10-amino-N-hidroxi-8-iminodeca-2,4,6-trienamida</i>
321		<i>3-(3-(4-amino-2-iminobutil)fenil)-N-hidroxiopropanamida</i>
331		<i>4-(3-(3-amino-1-iminopropil)fenil)-N-hidroxibutanamida</i>
341		<i>2-(7-(3-amino-1-iminopropil)naftalen-2-yl)-N-hidroxiacetamida</i>
411		<i>(2E,4E,6E)-9-amino-8-((dimetilamino)metil)-N-hidroxinona-2,4,6-trienamida</i>
421		<i>3-(3-(3-amino-2-((dimetilamino)metil)propil)fenil)-N-hidroxiopropanamida</i>
431		<i>4-(3-(1-amino-3-(dimetilamino)propan-2-yl)fenil)-N-hidroxibutanamida</i>
441		<i>2-(7-(1-amino-3-(dimetilamino)propan-2-yl)naftalen-2-yl)-N-hidroxiacetamida</i>

Tabla 4. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de la mejor pose obtenida con SAHA y la mejor pose de cada una de las 16 moléculas PAB acopladas en HDAC2.

HDAC2	Zn ^a	Hnd ^b	Hd ^c	EH ^d	IE ^e	EFQ ^f	EFE ^g	EFC ^h	ET ⁱ	EL ^j	ETN ^k	ELN ^l
SAHA	18.8	6.0	20.6	26.6	5.9	34.0	48.3	23.4	105.8	5.6	1.00	1.00
111	14.7	4.9	9.7	14.7	5.3	24.0	44.8	21.9	90.7	5.7	0.86	1.02
121	16.0	3.2	9.6	12.8	2.8	21.3	54.7	11.2	87.2	4.4	0.82	0.78
131	13.9	5.1	10.9	16.0	5.0	22.6	48.2	25.2	96.0	5.1	0.91	0.91
141	17.5	1.8	6.3	8.0	11.4	33.3	36.9	18.1	88.3	4.2	0.83	0.76
211	15.2	4.8	14.6	19.5	8.6	24.3	47.3	23.3	94.9	6.3	0.90	1.14
221	15.6	4.9	21.2	26.1	10.1	34.6	55.2	22.1	111.8	6.2	1.06	1.12
231	15.5	6.1	14.4	20.4	10.0	24.5	48.2	27.3	100.0	5.6	0.95	1.00
241	17.3	3.7	23.8	27.4	8.4	38.3	52.1	11.3	101.7	5.1	0.96	0.91
311	16.6	2.7	9.4	12.1	0.8	27.8	39.0	19.4	86.2	5.7	0.82	1.03
321	17.4	4.4	19.7	24.1	0.0	38.5	53.2	19.6	111.2	5.9	1.05	1.05
331	15.7	4.0	19.6	23.6	0.1	36.5	46.7	20.1	103.3	5.7	0.98	1.03
341	16.2	3.7	13.8	17.5	12.3	29.7	43.8	19.7	93.2	4.7	0.88	0.84
411	4.9	4.7	13.9	18.7	4.8	20.8	30.8	25.0	76.6	4.3	0.72	0.76
421	17.1	2.3	8.0	10.4	0.8	26.5	40.7	18.3	85.5	4.1	0.81	0.73
431	10.1	6.1	12.6	18.6	5.7	19.4	51.1	31.8	102.3	5.1	0.97	0.92
441	15.6	4.5	9.9	14.4	1.3	26.0	44.1	30.0	100.1	4.6	0.95	0.82

^a Energía de interacción de cada una de las moléculas con el cofactor Zinc del sitio activo.

^b Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno no dirigidos.

^c Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno dirigidos.

^d Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno totales.

^e Energía de interacción debida a interacciones de tipo electrostático.

^f Energía de interacción debida al fragmento quelante de cada molécula.

^g Energía de interacción debida al fragmento espaciador de cada molécula.

^h Energía de interacción debida al fragmento cubierta de cada molécula.

ⁱ Energía de interacción total debida al acoplamiento de cada molécula.

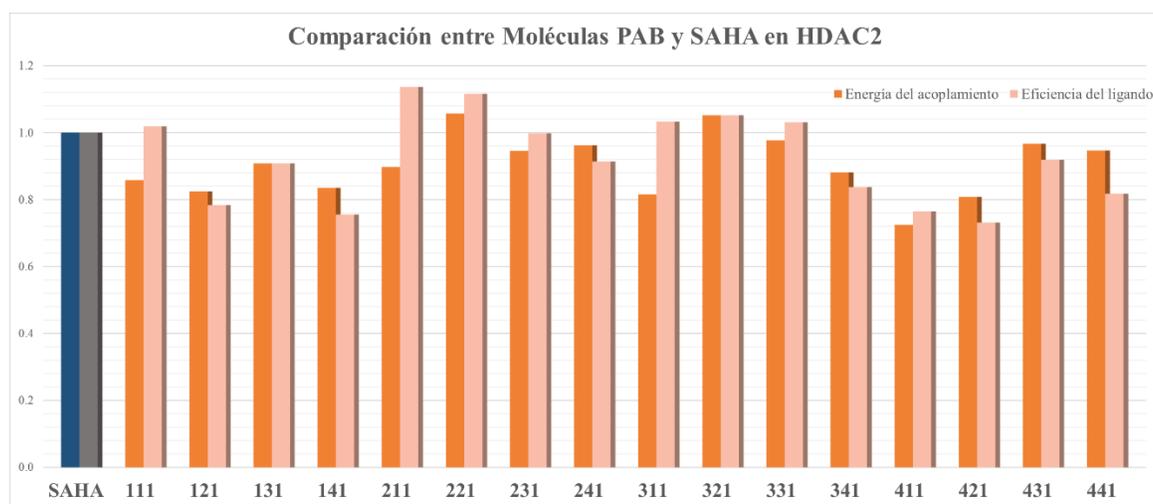
^j Eficiencia del ligando que se obtiene con el cociente entre la energía y el número de átomos pesados de cada molécula.

^k Energía total normalizada que se obtiene con el cociente entre la energía de interacción total de cada una de las moléculas y la energía de interacción total de SAHA que es 105.8 kcal/mol.

^l Eficiencia del ligando normalizada que se obtiene del cociente de la eficiencia del ligando de cada una de las moléculas y la eficiencia del ligando de SAHA que es 5.6 kcal/mol número de átomos pesados.

Se consideran átomos pesados a todos aquellos diferentes de hidrógeno. Se reportan los valores absolutos de todos los calculados. Todos los valores reportados con número en negro implican interacciones de tipo atractivas, mientras que los valores reportados con número en color rojo implican interacciones de tipo repulsivas.

Se hace ahora un análisis comparativo de las Energías de interacción y Eficiencias del ligando normalizadas con respecto a SAHA de cada una de las moléculas PAB propuestas, desde 111 hasta 441 (ver **Gráfica 1**)



Gráfica 1. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC2. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC2, mientras que las barras en color naranja oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la energía de interacción de las moléculas PAB. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC2, mientras que las barras en color naranja claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB.

Dos de los criterios más empleados para decidir si una molécula tendrá mejor o peor actividad biológica son la Energía Total de Acoplamiento, ET y la Eficiencia del Ligando, EL, sin embargo, existe una polémica en cuanto a cuál es mejor para discernir el potencial de una molécula. Podemos notar de los resultados obtenidos que las moléculas PAB 221 y 321 presentan una mejoría con respecto a SAHA en ambos criterios, las ET y EL de 221 son superiores a las de SAHA en 6 % y 12 % respectivamente, mientras que las ET y EL de 321 son superiores a las de SAHA en 5 % y 5 % respectivamente. Mostramos a continuación los acoplamientos moleculares *in silico* de las dos moléculas PAB con mejores resultados y SAHA (ver **Figura 36**).

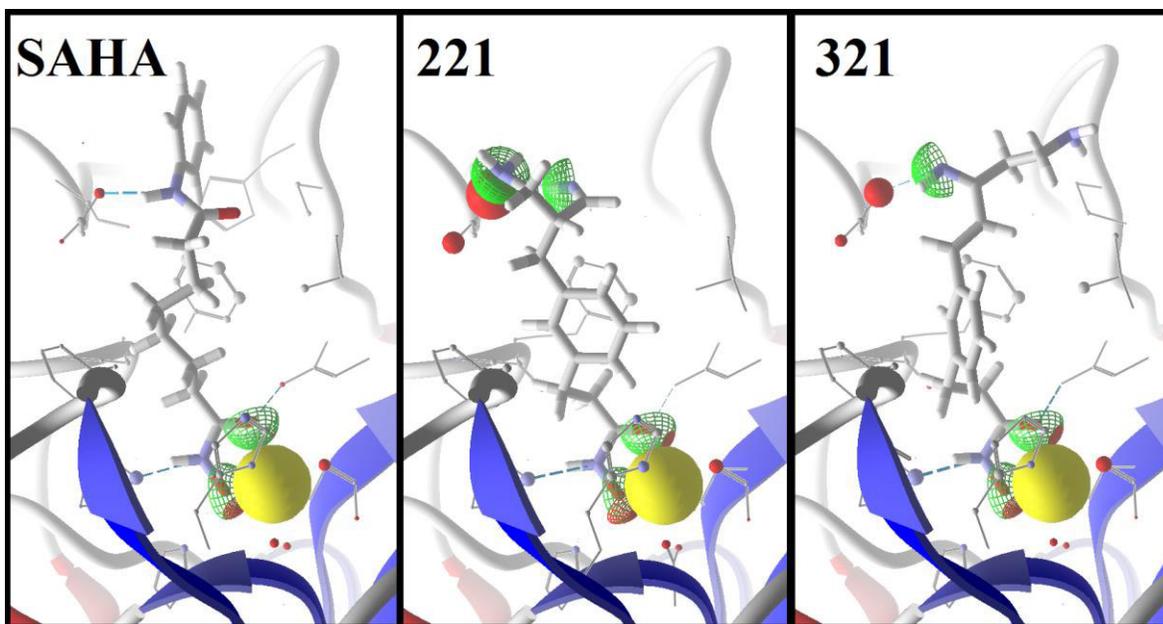


Figura 36. Sitio y modo de unión de SAHA y moléculas 221 y 321 en HDAC2. Enlaces de hidrógeno representados con líneas punteadas en color azul. Interacciones electrostáticas atractivas representadas como semiesferas en color verde e interacciones repulsivas representadas como semiesferas en color rojo. Los átomos de los residuos de HDAC2 están representados como esferas de diferentes tamaños en función de la energía de interacción con la molécula SAHA o PAB, cuanto mayor es el tamaño de la esfera, mayor es su contribución a la energía de acoplamiento. La esfera en color amarillo representa al átomo de zinc del sitio activo de HDAC2 y las hélices en colores azul y rojo representan al esqueleto protéico.

Es notorio que SAHA y las moléculas PAB tienen interacciones electrostáticas entre el grupo hidroxámico y el átomo de zinc de la proteína, las moléculas PAB tienen, además, interacciones electrostáticas con el residuo de Aspartato que se encuentra a la entrada del túnel que compone el sitio activo de HDAC2, en el acoplamiento de 221 se forman dos interacciones de este tipo y en el acoplamiento de 321 sólo una.

Las moléculas PAB 221 y 321 son aquellas con una mejor probabilidad de superar la capacidad inhibitoria de SAHA de la actividad de HDAC2 en ensayos enzimáticos. Se sugiere que la evaluación biológica sea midiendo la actividad de la enzima seleccionada como blanco biológico, pues mediante el empleo de esta técnica computacional no se aporta información sobre selectividad y en ensayos en líneas celulares o modelos *in vivo* se deben considerar otros criterios tales como mayor afinidad de las moléculas PAB por otras isoformas e incluso otros blancos biológicos.

4.3.2 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC4, (HDAC4i)

En todos los casos se propone como quelante el grupo hidroxámico, mientras que el grupo espaciador y el grupo de cubierta se vuelven uno solo, cabe mencionar que este grupo cubierta/espaciador

contiene un elemento de farmacóforo que tiene como finalidad ocupar un volumen disponible en esta isoforma y no disponible en otras isoformas, buscando de esta manera hacerlo selectivo hacia las isoformas con volumen disponible cerca del átomo de zinc, se proponen 6 distintos grupos cubierta/espaciador y con ello se obtienen 6 moléculas propuestas (ver **Figura 37**).

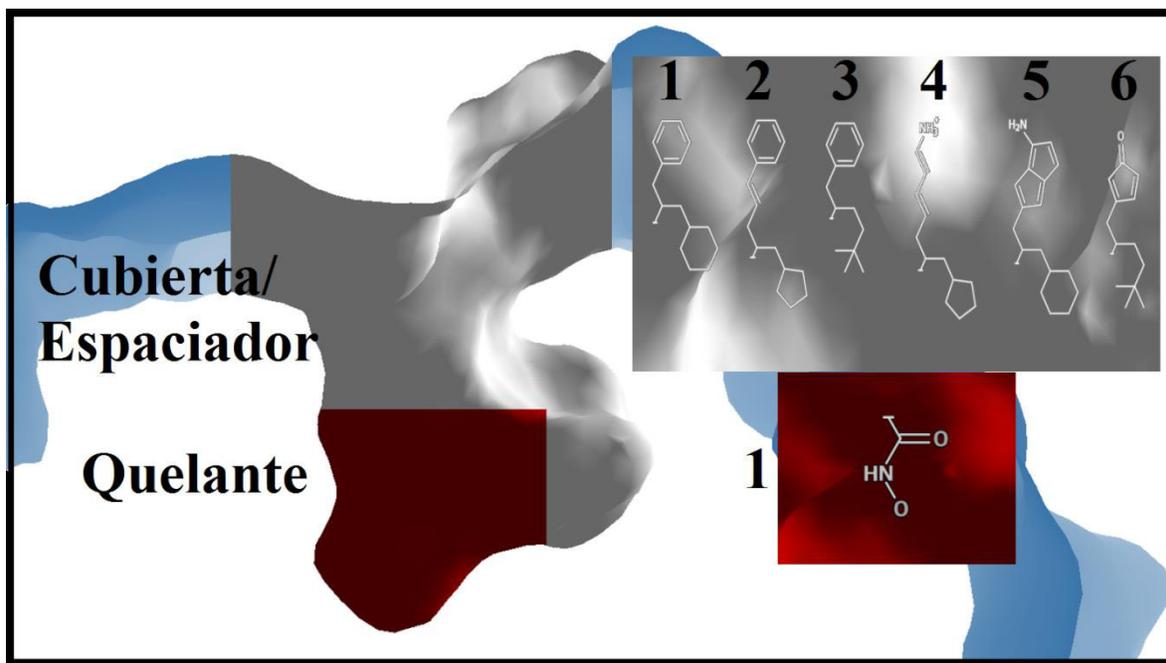
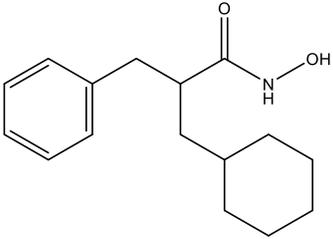
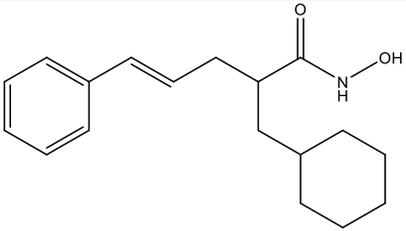
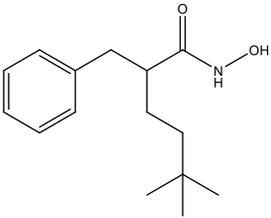
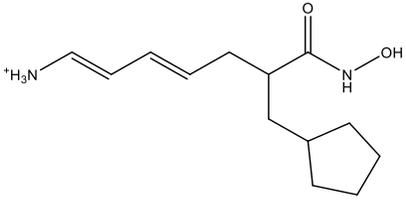
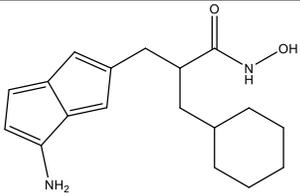
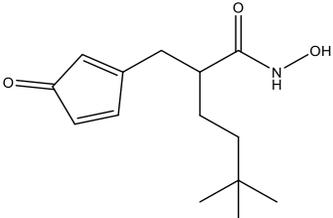


Figura 37. En la parte izquierda de la figura se muestran las dos secciones del modelo de farmacóforo propuesto: Sección del Fragmento Quelante en color rojo, sección del Fragmento Cubierta/Espaciador en color blanco en el sitio activo de HDAC4. En la parte derecha de la figura se muestran los distintos fragmentos propuestos: El grupo hidroxámico como Fragmento Quelante 1 en el cuadro en color rojo y seis Fragmentos Cubierta/Espaciador marcados con los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en el cuadro en color blanco.

Las 6 moléculas propuestas (ver Esquema 2) son denominadas 11, 21, 31, 41, 51 y 61 debido a que se une cada uno de los grupos cubierta/espaciador 1, 2, 3, 4, 5 y 6 con el grupo hidroxámico 1. Para cada una de las moléculas propuestas se obtuvo una geometría optimizada a nivel de mecánica molecular con el campo de fuerzas SYBYL (Mayo *et al.*, 1990) la cual fue utilizada para realizar otro cálculo de reoptimización de geometría con el método semiempírico PM3 (Stewart, 1989). Con esta última geometría se hicieron los acoplamientos moleculares con HDAC4 siguiendo el protocolo descrito y utilizando los parámetros obtenidos durante la calibración del método

Esquema 2. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC4.

Moléculas	Estructura	Nombre IUPAC
11		<i>2-bencil-3-ciclohexil-N-hidroxipropanamida</i>
21		<i>(E)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxi-5-fenilpent-4-enamida</i>
31		<i>2-bencil-N-hidroxi-5,5-dimetilhexanamida</i>
41		<i>(1E,3E)-6-(ciclopentilmetil)-7-(hidroxiamino)-7-oxohepta-1,3-dien-1-amino</i>
51		<i>3-(4-aminopentalen-2-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxipropanamida</i>
61		<i>N-hidroxi-5,5-dimetil-2-((3-oxociclopenta-1,4-dien-1-il)metil)hexanamida</i>

Se obtienen los resultados presentados a continuación (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de la mejor pose obtenida con SAHA y las mejores poses de cada una de las 6 moléculas PAB acopladas en HDAC4, y del ligando co-cristalizado experimentalmente, denominado QHCRW.

HDAC4	Zn ^a	Hnd ^b	Hd ^c	EH ^d	IE ^e	EFQ ^f	EFC/E ^g	ET ^h	EL ⁱ	ETN ^j	ELN ^k
SAHA	18.7	5.6	0.8	6.4	9.5	8.7	43.8	52.5	2.8	1.00	1.00
11	19.2	6.6	0.8	7.4	8.5	17.0	94.1	111.0	5.6	2.11	2.01
21	13.7	6.9	1.8	8.8	9.3	6.6	93.0	99.6	4.5	1.90	1.64
31	19.0	6.9	1.4	8.2	9.0	16.9	86.6	103.6	5.5	1.97	1.97
41	13.1	6.9	2.4	9.2	3.5	7.0	89.8	96.8	5.4	1.84	1.95
51	17.0	5.8	1.4	7.1	5.8	18.3	111.7	130.1	5.9	2.48	2.14
61	18.6	14.2	1.3	15.6	8.3	18.1	78.8	96.9	5.7	1.85	2.06
QHCRW	17.1	14.1	2.3	16.6	9.6	27.0	97.9	124.9	4.8	2.38	1.74

^a Energía de interacción de cada una de las moléculas con el cofactor Zinc del sitio activo.

^b Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno no dirigidos.

^c Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno dirigidos.

^d Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno totales.

^e Energía de interacción debida a interacciones de tipo electrostático.

^f Energía de interacción debida al fragmento quelante de cada molécula.

^g Energía de interacción debida al fragmento cubierta/espaciador de cada molécula.

^h Energía de interacción total debida al acoplamiento de cada molécula.

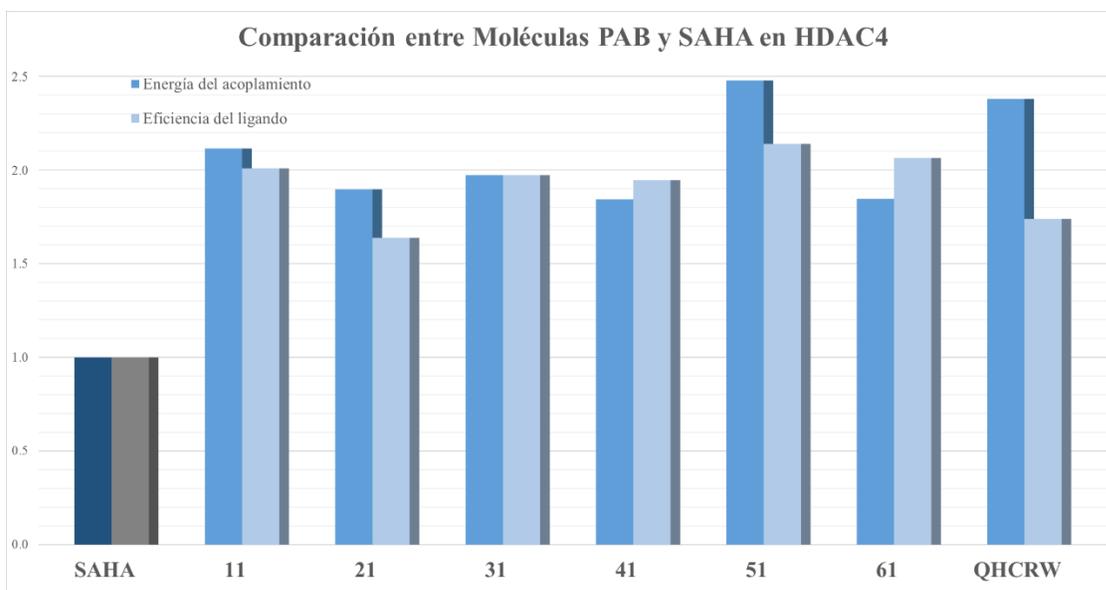
ⁱ Eficiencia del ligando que se obtiene con el cociente entre la energía y el número de átomos pesados de cada molécula.

^j Energía total normalizada que se obtiene con el cociente entre la energía de interacción total de cada una de las moléculas y la energía de interacción total de SAHA que es 52.5 kcal/mol.

^k Eficiencia del ligando normalizada que se obtiene del cociente entre la eficiencia del ligando de cada una de las moléculas y la eficiencia del ligando de SAHA que es 2.8 kcal/mol número de átomos pesados.

Se consideran átomos pesados a todos aquellos diferentes de hidrógeno. Se reportan los valores absolutos de todos los calculados. Todos los valores reportados con número en negro implican interacciones de tipo atractivas, mientras que los valores reportados con número en color rojo implican interacciones de tipo repulsivas.

Se hace ahora un análisis comparativo de las Energías de interacción y Eficiencias del ligando normalizadas con respecto a SAHA de cada una de las moléculas PAB propuestas, desde 11 hasta 61, se incluye también el ligando co-cristalizado en la isoforma HDAC4 (ver **Gráfica 2**)



Gráfica 2. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC4. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC4, mientras que las barras en color azul oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 7 representan la energía de interacción de las moléculas PAB, la de la columna 8 corresponde al ligando co-cristalizado. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC4, mientras que las barras en color azul claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 7 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB, la de la columna 8 corresponde al ligando co-cristalizado.

Es notorio que todas las moléculas PAB tienen tanto una mejor energía de acoplamiento como una mejor eficiencia del ligando. Cabe destacar que el ligando co-cristalizado en esta isoforma no es SAHA, sino (1R,2R,3R)-2-[4-(5-fluoranylpirimidin-2-il)fenil]-N-oxidanyl-3-fenil-ciclopropano-1-carboxamida, QHCRW, y se puede hacer un análisis comparativo con las energías de interacción y eficiencia del ligando del ligando co-cristalizado. Con respecto a esto último, solo la molécula PAB 21 tiene una eficiencia del ligando menor a la de cristal. La molécula PAB 61 orienta el grupo con nubes de orbitales Pi hacia el fondo del sitio activo de HDAC4 y el grupo voluminoso *tert*-butilo hacia la parte media del túnel, que es justo lo contrario de lo propuesto en el modelo de farmacóforo. Se descartan las moléculas PAB 21 y 61 y se muestran los acoplamientos de las restantes a continuación (ver **Figura 38**).

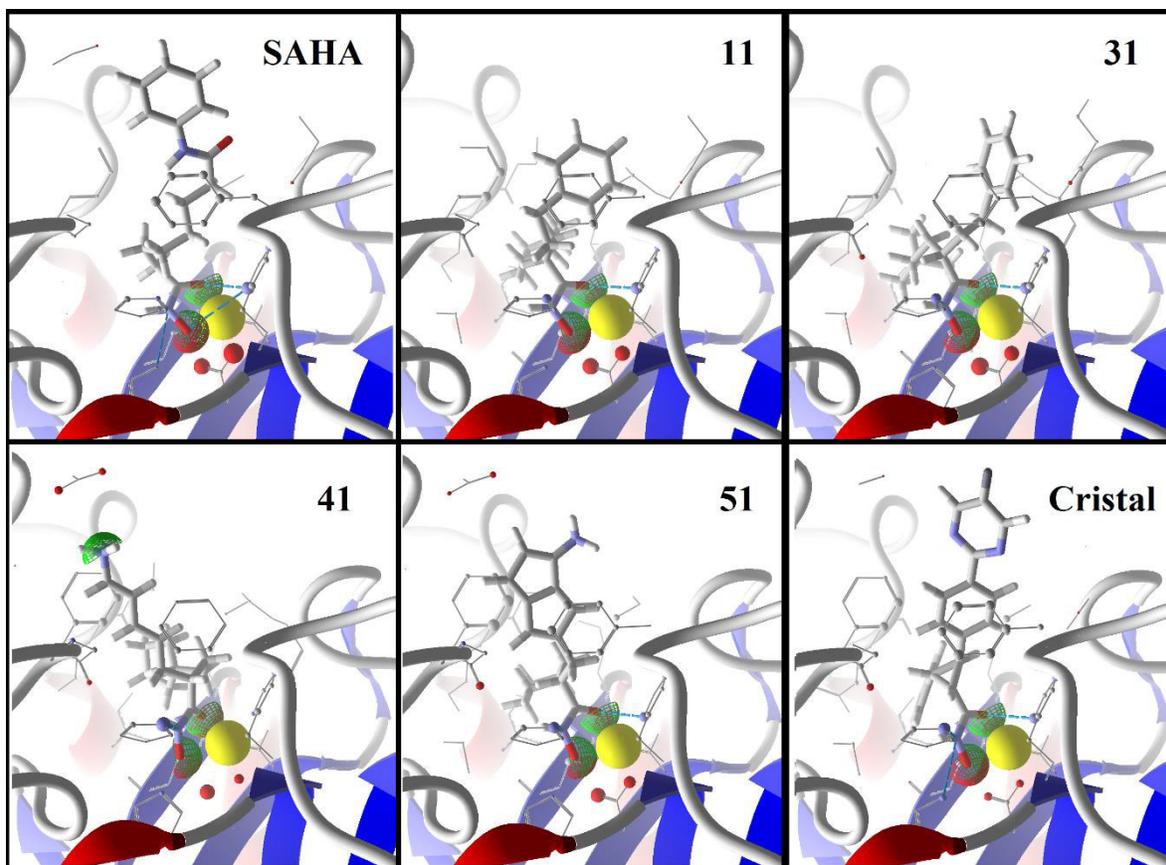


Figura 38. Sitio y modo de unión de SAHA, moléculas PAB 11, 31, 41, 51 y ligando co-cristalizado en HDAC4. Enlaces de hidrógeno representados con líneas punteadas en color azul. Interacciones electrostáticas atractivas representadas como semiesferas en color verde e interacciones repulsivas representadas como semiesferas en color rojo. Los átomos de los residuos de HDAC4 están representados como esferas de diferentes tamaños en función de la energía de interacción con la molécula SAHA, PAB o ligando co-cristalizado, cuanto mayor es el tamaño de la esfera, mayor es su contribución a la energía de acoplamiento. La esfera en color amarillo representa al átomo de zinc del sitio activo de HDAC4 y las hélices en colores azul y rojo representan al esqueleto protéico.

Las moléculas PAB, SAHA y el ligando co-cristalizado presentan interacciones electrostáticas repulsivas con el residuo de aspartato que está quelando al zinc, la molécula PAB 41 tiene además una interacción electrostática atractiva con el residuo de aspartato que está a la entrada del túnel que conforma el sitio activo de HDAC4. Las moléculas PAB 11 y 51 y el ligando co-cristalizado tienen una potencial interacción de tipo apilamiento cara-cara con los residuos de fenilalanina del centro del túnel que compone el sitio activo.

Las 6 moléculas PAB propuestas tienen una buena probabilidad de superar la capacidad inhibitoria de SAHA en HDAC4. Las moléculas PAB 11, 31, 41 y 51 tienen una alta probabilidad de superar la capacidad inhibitoria de la actividad de HDAC4 que SAHA, e incluso que el ligando co-cristalizado, en ensayos enzimáticos.

4.3.3 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC7, (HDAC7i).

En todos los casos se propone como quelante el grupo hidroxámico, mientras que para el espaciador se proponen 4 distintos fragmentos y para la cubierta se proponen 4 distintos fragmentos. Cada uno de los fragmentos FC se combina con cada uno de los fragmentos FT, por lo tanto, se obtienen 16 moléculas propuestas (ver **Figura 39**).

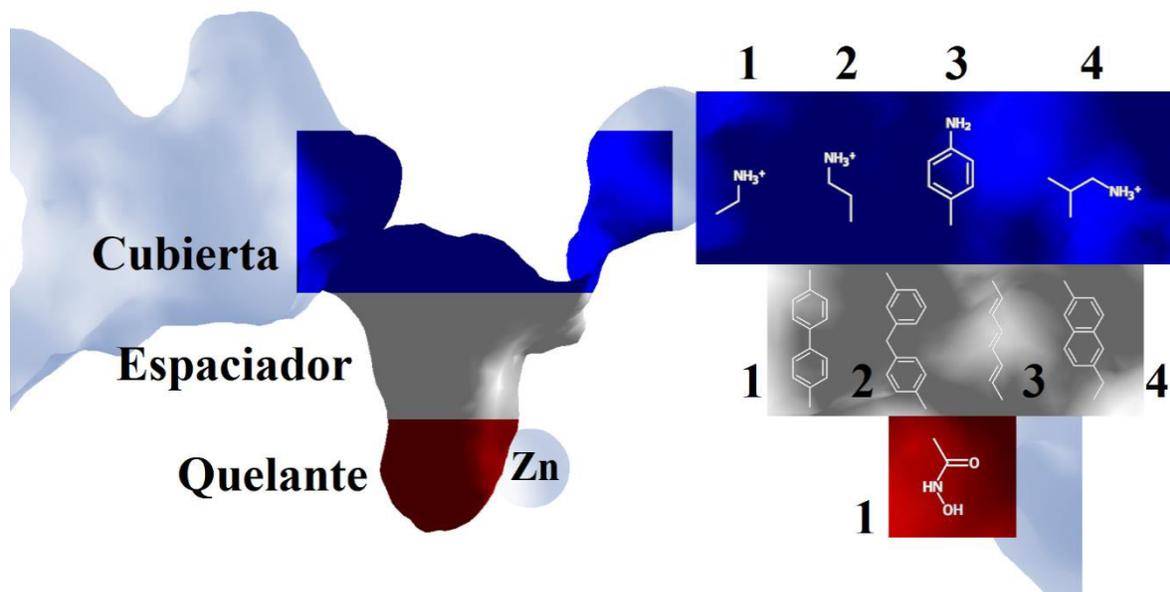
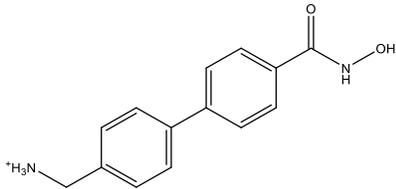
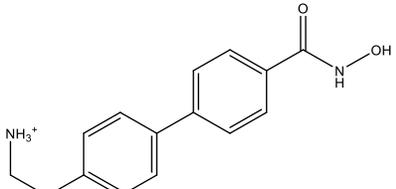
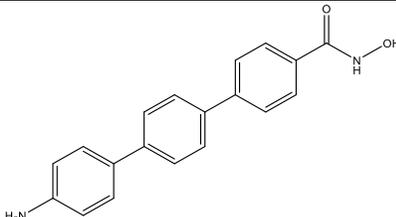
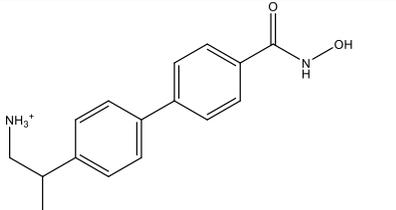
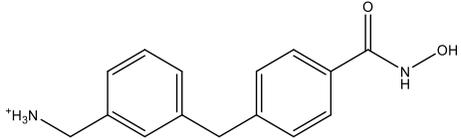
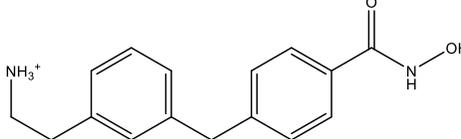


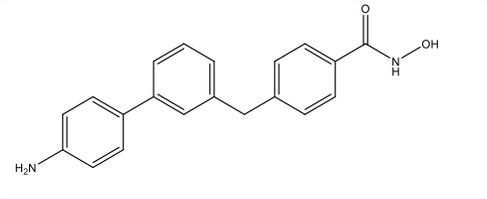
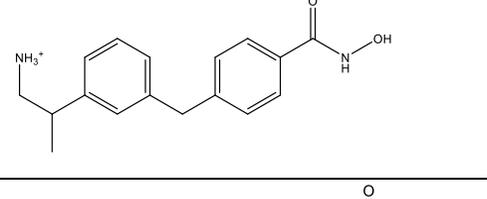
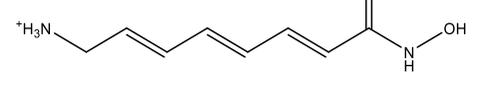
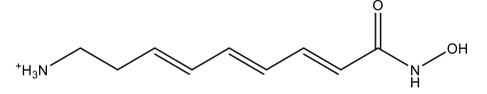
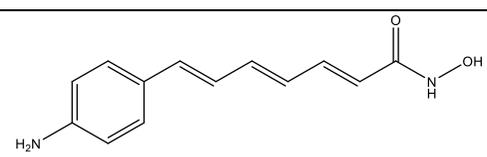
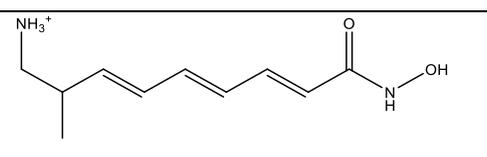
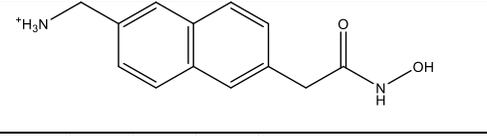
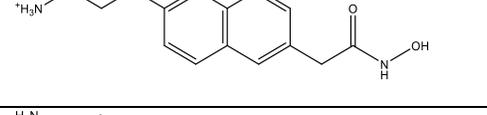
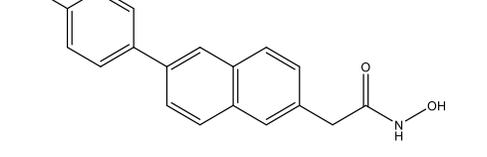
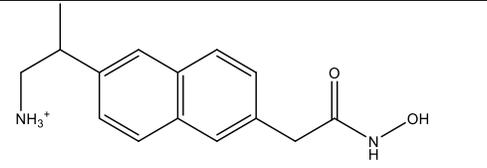
Figura 39. En la parte izquierda de la figura se muestran las tres secciones del modelo de farmacóforo propuesto: Sección del Fragmento Quelante en color rojo, sección del Fragmento Espaciador en color blanco y sección del Fragmento de Cubierta en color azul en el sitio activo de HDAC7. En la parte derecha de la figura se muestran los distintos fragmentos propuestos: El grupo hidroxámico como Fragmento Quelante 1 en el cuadro en color rojo, cuatro Fragmentos Espaciadores marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color blanco y cuatro Fragmentos de Cubierta marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color azul.

Las 16 moléculas (ver Esquema 3) propuestas fueron construidas uniendo cada uno de los distintos FC a cada uno de los distintos FE y a FQ, es decir que la primera molécula PAB se obtiene al unir FC 1 a FE 1 y FQ 1 y es nombrada 111, la segunda molécula PAB se obtiene al unir FC1-FE2-FQ1 y es nombrada 121, la tercera FC1-FE3-FQ1 y es nombrada 131, y así sucesivamente hasta llegar a la décimo sexta FC4-FE4-FQ1 que es nombrada 441. Para cada una de las moléculas propuestas se obtuvo una primera geometría optimizada a nivel de mecánica molecular con el campo de fuerzas SYBYL (Mayo *et al.*, 1990) la cual fue utilizada para realizar otro cálculo de reoptimización de geometría con el método semiempírico PM3 (Stewart, 1989). Con esta última geometría se hicieron los acoplamientos moleculares con HDAC7 siguiendo el protocolo descrito y utilizando los parámetros obtenidos durante la calibración del método

El acoplamiento de la molécula PAB 421 orienta el grupo hidroxámico hacia el exterior de la proteína, dado que su modo de unión es opuesto al del resto de las moléculas por lo cual se descarta.

Esquema 3. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC7.

Molécula	Estructura	Nombre IUPAC
111		<i>4'-(hidroxicarbamoil)-[1,1'-bifenil]-4-il)metanamonio</i>
211		<i>2-(4'-(hidroxicarbamoil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etan-1-amonio</i>
311		<i>4''-amino-N-hidroxi-[1,1':4',1''-terfenil]-4-carboxamida</i>
411		<i>2-(4'-(hidroxicarbamoil)-[1,1'-bifenil]-4-il)propan-1-amonio</i>
121		<i>(3-(4-(hidroxicarbamoil)bencil)fenil)metanamonio</i>
221		<i>2-(3-(4-(hidroxicarbamoil)bencil)fenil)etan-1-amonio</i>

321		4-((4'-amino-[1,1'-bifenil]-3-yl)metil)-N-hidroxi benzamida
421		2-(3-(4-(hidroxi carbamoil)encil)fenil)propan-1-amonio
131		(2E,4E,6E)-8-(hidroxi amino)-8-oxoocta-2,4,6-trien-1-amonio
231		(3E,5E,7E)-9-(hidroxi amino)-9-oxonona-3,5,7-trien-1-amonio
331		(2E,4E,6E)-7-(4-aminofenil)-N-hidroxi hepta-2,4,6-trienamida
431		(3E,5E,7E)-9-(hidroxi amino)-2-metil-9-oxonona-3,5,7-trien-1-amonio
141		(6-(2-(hidroxi amino)-2-oxoetil)naptalen-2-yl)metanamonio
241		3-(6-(2-(hidroxi amino)-2-oxoetil)naptalen-2-il)propan-1-amonio
341		2-(6-(4-aminofenil)naptalen-2-il)-N-hidroxi acetamida
441		2-(6-(2-(hidroxi amino)-2-oxoetil)naptalen-2-il)propan-1-amonio

Se obtienen los resultados presentados a continuación (ver **Tabla 6**).

Tabla 6. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de la mejor pose obtenida para SAHA y la mejor pose de cada una de las 16 moléculas PAB acopladas en HDAC7.

HDAC7	Zn ^a	Hnd ^b	Hd ^c	EH ^d	IE ^e	EFQ ^f	EFE ^g	EFC ^h	ET ⁱ	EL ^j	ETN ^k	ELN ^l
SAHA	15.8	2.5	2.5	5.0	5.8	36.9	41.1	2.4	75.6	4.0	1.00	1.00
111	14.1	4.3	10.7	15.0	4.0	27.2	39.9	13.5	80.6	4.5	1.07	1.13
121	10.7	3.1	6.4	9.5	1.0	23.1	48.7	12.0	83.8	4.4	1.11	1.11
131	14.3	2.1	9.8	11.9	5.0	29.8	41.9	9.9	81.6	6.8	1.08	1.71
141	17.9	3.5	5.8	9.3	1.6	35.5	42.6	5.1	83.3	4.9	1.10	1.23
211	10.6	3.9	10.8	14.7	8.1	22.9	41.2	15.1	79.1	4.2	1.05	1.05
221	12.8	3.9	9.8	13.7	6.0	25.8	49.7	17.8	93.3	4.7	1.23	1.17
231	16.7	1.5	12.1	13.6	12.1	32.2	30.3	12.8	75.2	5.8	1.00	1.45
241	17.9	2.5	5.4	7.8	3.0	36.5	46.9	5.5	88.9	4.9	1.18	1.24
311	12.5	3.3	8.3	11.5	10.6	10.7	18.8	1.5	28.1	1.2	0.37	0.31
321	14.9	3.6	6.4	10.0	6.2	25.6	52.0	24.1	101.18	4.2	1.35	1.07
331	17.6	1.6	6.8	8.4	5.7	31.5	38.7	4.1	66.1	3.9	0.87	0.98
341	20.0	1.6	5.4	6.9	5.5	34.7	47.2	9.3	91.3	4.1	1.21	1.04
411	12.6	2.5	3.8	6.3	2.9	26.0	40.1	4.4	70.5	3.5	0.93	0.89
421	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
431	13.5	3.0	6.1	9.1	3.7	24.7	43.7	20.9	89.3	6.4	1.18	1.60
441	10.4	2.6	9.2	11.8	3.7	22.6	46.1	9.3	78.0	4.3	1.03	1.09

^a Energía de interacción de cada una de las moléculas con el cofactor Zinc del sitio activo.

^b Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno no dirigidos.

^c Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno dirigidos.

^d Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno totales.

^e Energía de interacción debida a interacciones de tipo electrostático.

^f Energía de interacción debida al fragmento quelante de cada molécula.

^g Energía de interacción debida al fragmento espaciador de cada molécula.

^h Energía de interacción debida al fragmento cubierta de cada molécula.

ⁱ Energía de interacción total debida al acoplamiento de cada molécula.

^j Eficiencia del ligando que se obtiene con el cociente entre la energía y el número de átomos pesados de cada molécula.

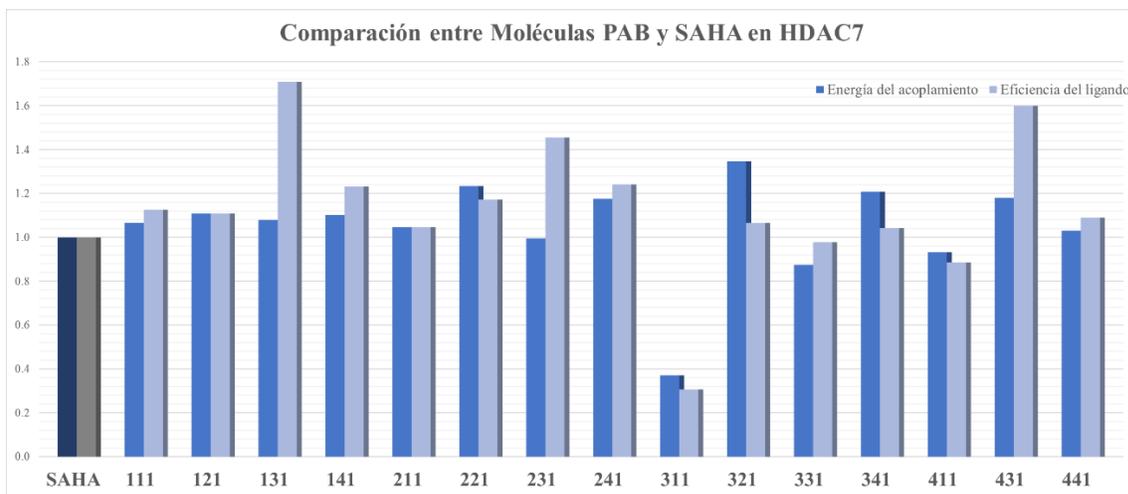
^k Energía total normalizada que se obtiene con el cociente entre la energía de interacción total de cada una de las moléculas y la energía de interacción total de SAHA que es 75.6 kcal/mol.

^l Eficiencia del ligando normalizada que se obtiene del cociente entre la eficiencia del ligando de cada una de las moléculas y la eficiencia del ligando de SAHA que es 4.0 kcal/mol número de átomos pesados.

Se considera átomos pesados a todos aquellos diferentes de hidrógeno. Se reportan los valores absolutos de todos los calculados. Todos los valores reportados con número en negro implican

interacciones de tipo atractivas, mientras que los valores reportados con número en color rojo implican interacciones de tipo repulsivas.

Se hace ahora un análisis comparativo de las Energías de interacción y Eficiencias del ligando normalizadas con respecto a SAHA de cada una de las moléculas PAB propuestas, desde 111 hasta 441 (ver **Gráfica 3**)



Gráfica 3. Energías de acoplamiento normalizadas de SAHA y las moléculas PAB propuestas en HDAC7. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC7, mientras que las barras en color azul oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la energía de interacción de las moléculas PAB. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC7, mientras que las barras en color azul claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 17 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB.

Dos de los criterios más empleados para decidir si una molécula tendrá mejor o peor actividad biológica son la Energía de Total de Acoplamiento, ET y la Eficiencia del Ligando, EL, sin embargo, existe una polémica en cuanto a cuál es mejor para discernir el potencial de una molécula. Podemos notar de los resultados obtenidos que las moléculas PAB presentan una mejoría con respecto a SAHA en ambos criterios, con excepción de las moléculas 231, 311, 411 y 421. Mostramos a continuación los acoplamientos moleculares *in silico* de las dos moléculas PAB con mejores resultados y SAHA (ver **Figura 40**).

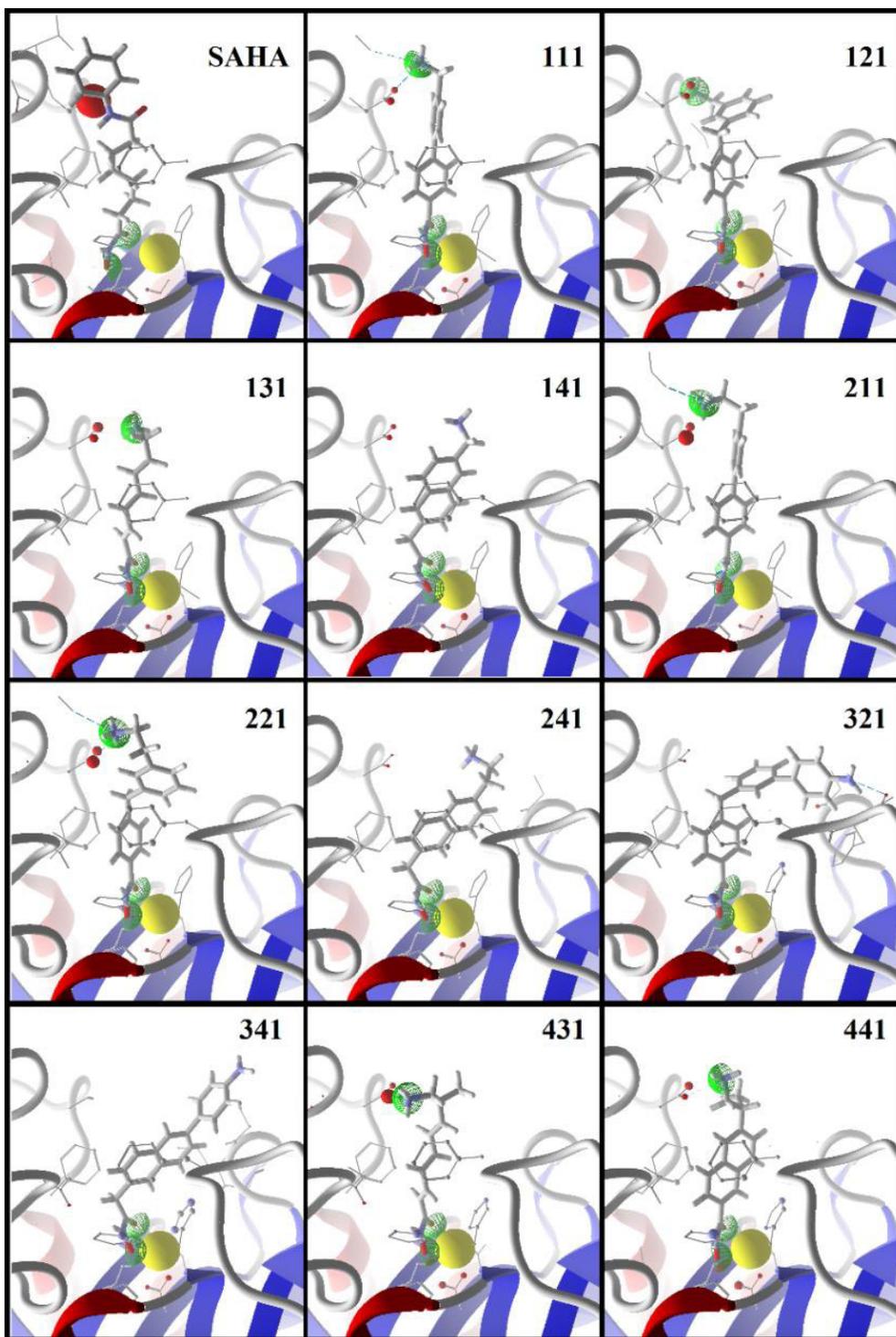


Figura 40. Sitio y modo de unión de SAHA y 11 moléculas PAB en HDAC7. Enlaces de hidrógeno representados con líneas punteadas en color azul. Interacciones electrostáticas atractivas representadas como semiesferas en color verde e interacciones repulsivas representadas como semiesferas en color rojo. Los átomos de los residuos de HDAC7 están representados como esferas de diferentes tamaños en función de la energía de interacción con la molécula SAHA o PAB, cuanto mayor es el tamaño de la esfera, mayor es su contribución a la energía de acoplamiento. La esfera en color amarillo representa al átomo de zinc del sitio activo de HDAC4 y las hélices en colores azul y rojo representan al esqueleto protéico.

Las moléculas propuestas PAB, con excepción de 421, orientan el grupo hidroxámico hacia el átomo de zinc del sitio activo. Las moléculas PAB 111, 121, 131, 211, 221, 431 y 441 presentan una interacción electrostática atractiva con el residuo de aspartato que se encuentra a la entrada del túnel que compone el sitio activo de HDAC7. Las moléculas PAB 111 y 221 forman además un enlace de hidrógeno de tipo donador con el residuo Thr 625, mientras que PAB 321 forma un enlace de hidrógeno de tipo donador con el residuo Asn 736. Las moléculas 141, 211, 241 y 341 orientan la cara del anillo aromático de modo paralelo a la cara del anillo aromático de Phe 738, por lo que existe una potencial interacción de tipo apilamiento cara-cara.

11 de las moléculas propuestas tienen una buena probabilidad de presentar una mejor capacidad inhibitoria de la actividad de HDAC7 que SAHA en ensayos enzimáticos.

4.3.4 Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC8, (HDAC8i).

En todos los casos se propone como quelante el grupo hidroxámico, mientras que para el espaciador se proponen 4 distintos fragmentos y para la cubierta se proponen 4 distintos fragmentos (ver **Figura 41**). Cada uno de los fragmentos FC se combina con cada uno de los fragmentos FT, por lo tanto, se obtienen 16 moléculas propuestas. Además, se agrega un cuarto fragmento, debido a que el túnel que compone el sitio activo de HDAC8 tiene un volumen mucho mayor que el del resto de las isoformas analizadas aquí y a que el modelo de farmacóforo propuesto incluye un elemento estérico, la cuarta sección del sitio activo será aquella que quede por debajo del grupo quelante y cuya función sea únicamente la de ocupar el espacio disponible es HDAC8 y no poder bloquear el sitio activo de otras isoformas donde no hay este espacio disponible, aumentando de este modo la selectividad hacia HDAC8.

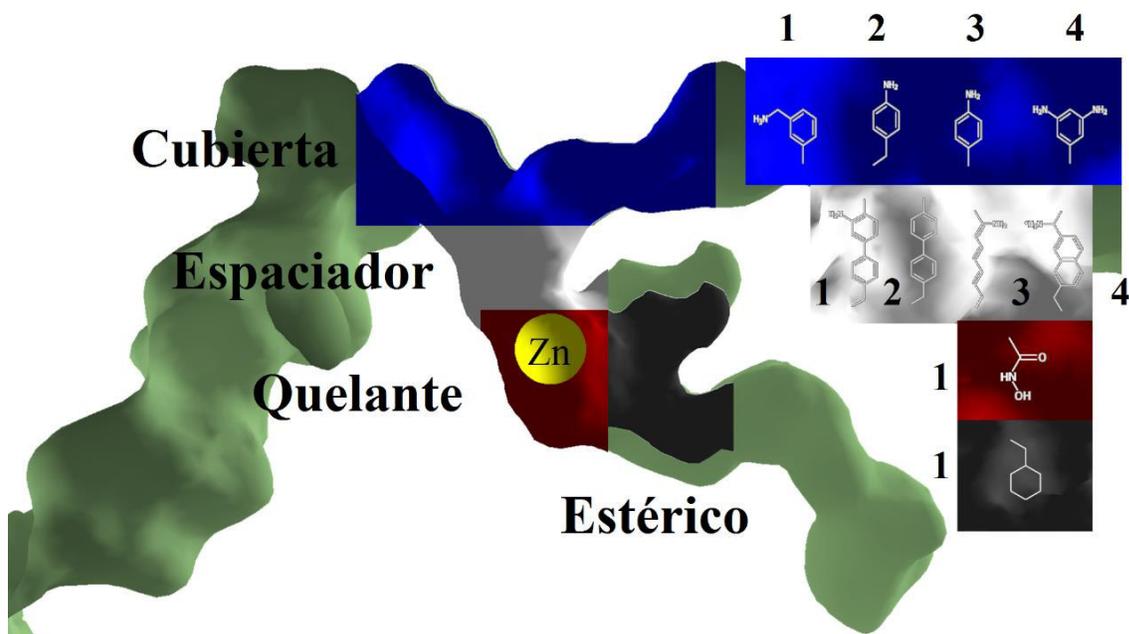
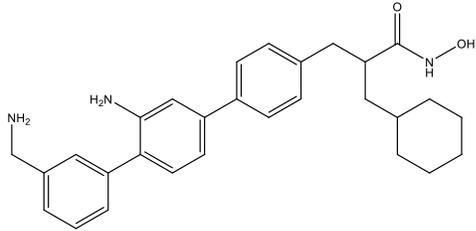
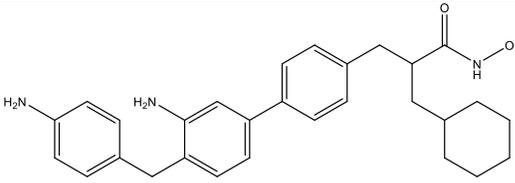
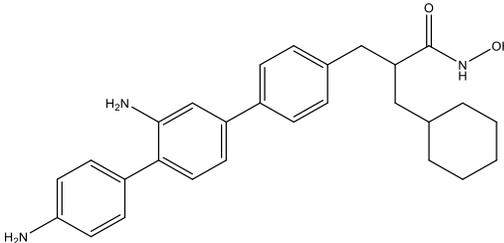
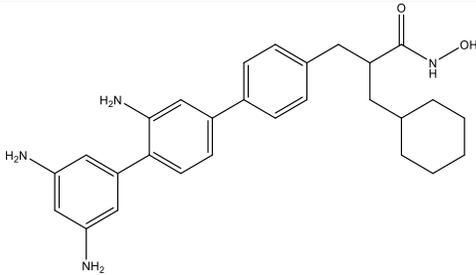
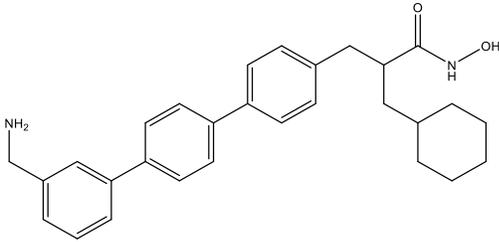
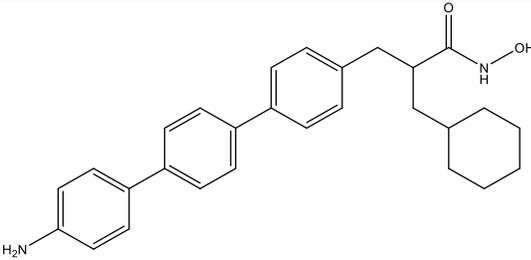


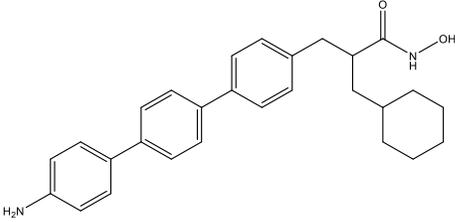
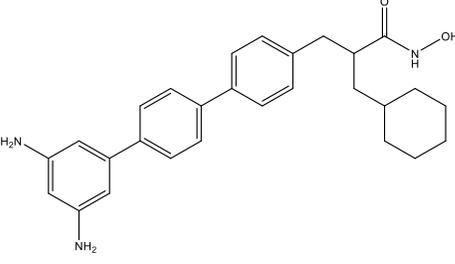
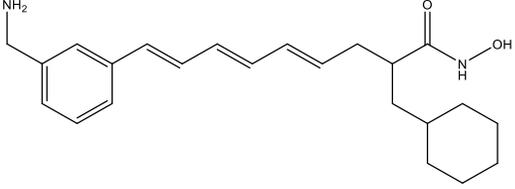
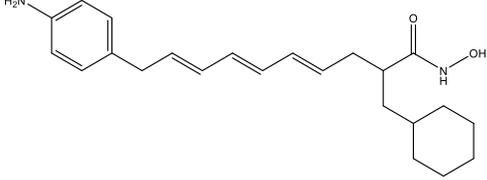
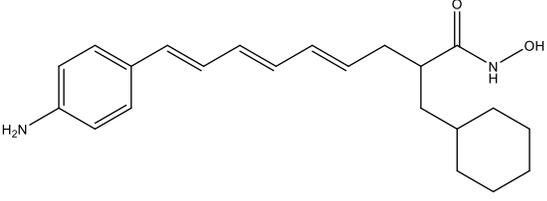
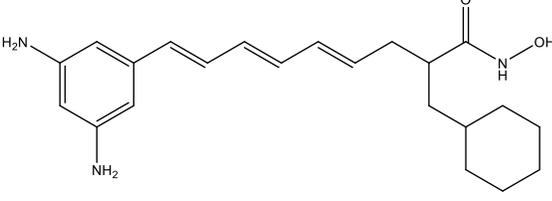
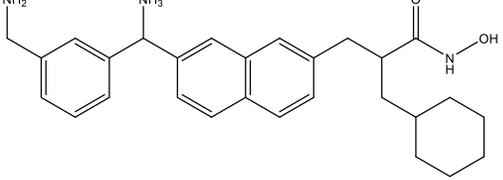
Figura 41. En la parte izquierda de la figura se muestran las cuatro secciones del modelo de farmacóforo propuesto: Sección del Fragmento Quelante en color rojo, sección del Fragmento Espaciador en color blanco, sección del Fragmento de Cubierta en color azul y sección del Fragmento Estérico en color gris en el sitio activo de HDAC8. En la parte derecha de la figura se muestran los distintos fragmentos propuestos: El grupo hidroxámico como Fragmento Quelante 1 en el cuadro en color rojo, cuatro Fragmentos Espaciadores marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color blanco y cuatro Fragmentos de Cubierta marcados con los números 1, 2, 3 y 4 en el cuadro en color azul.

Las 16 moléculas (ver Esquema 4) propuestas fueron construidas uniendo cada uno de los distintos FC a cada uno de los distintos FE y a FQ, es decir que la primera molécula PAB se obtiene al unir FC 1 a FE 1 y FQ 1 y es nombrada 111, la segunda molécula PAB se obtiene al unir FC1-FE2-FQ1 y es nombrada 121, la tercera FC1-FE3-FQ1 y es nombrada 131, y así sucesivamente hasta llegar a la décimo sexta FC4-FE4-FQ1 que es nombrada 441. Para cada una de las moléculas propuestas se obtuvo una primera geometría optimizada a nivel de mecánica molecular con el campo de fuerzas SYBYL (Mayo *et al.*, 1990) la cual fue utilizada para realizar otro cálculo de reoptimización de geometría con el método semiempírico PM3 (Stewart, 1989). Con esta última geometría se hicieron los acoplamientos moleculares con HDAC8 siguiendo el protocolo descrito y utilizando los parámetros obtenidos durante la calibración del método

Esquema 4. Moléculas propuestas como inhibidores de HDAC8.

Molécula	Estructura	Nombre IUPAC

1111		3-(3'-amino-3''-(aminometil)-[1,1':4,1''-terfenil]-4-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxiopropanamida
2111		3-(3'-amino-4'-(4-aminobencil)-[1,1'-bifenil]-4-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxiopropanamida
3111		3-ciclohexil-2-((3',4''-diamino-[1,1':4,1''-terfenil]-4-yl)metil)-N-hidroxiopropanamida
4111		3-ciclohexil-N-hidroxi-2-((3',3'',5''-triamino-[1,1':4,1''-terfenil]-4-il)metil)propanamida
1211		3-(3''-(aminometil)-[1,1':4,1''-terfenil]-4-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxiopropanamida
2211		3-(4''-amino-[1,1':4,1''-terfenil]-4-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxiopropanamida

3211		3-(4''-amino-[1,1':4',1''-terfenil]-4-il)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxiopropanamida
4211		3-ciclohexil-2-((3'',5''-diamino-[1,1':4',1''-terfenil]-4-yl)metil)-N-hidroxiopropanamida
1311		(4E,6E,8E)-9-(3-(aminometil)fenil)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxi nona-4,6,8-trienamida
2311		(4E,6E,8E)-10-(4-aminofenil)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxi deca-4,6,8-trienamida
3311		(4E,6E,8E)-9-(4-aminofenil)-2-(ciclohexilmetil)-N-hidroxi nona-4,6,8-trienamida
4311		(4E,6E,8E)-2-(ciclohexilmetil)-9-(3,5-diaminofenil)-N-hidroxi nona-4,6,8-trienamida
1411		(3-(aminometil)fenil)(7-(2-(ciclohexilmetil)-3-(hidroxiamino)-3-oxopropil)naftalen-2-il)metanamonio

2411		<i>2-(4-aminofenil)-1-(7-(2-(ciclohexilmetil)-3-(hidroxiamino)-3-oxopropil)naftalen-2-il)etan-1-amonio</i>
3411		<i>(4-aminofenil)(7-(2-(ciclohexilmetil)-3-(hidroxiamino)-3-oxopropil)naftalen-2-il)metanamonio</i>
4411		<i>(7-(2-(ciclohexilmetil)-3-(hidroxiamino)-3-oxopropil)naftalen-2-il)(3,5-diaminofenil)metanamonio</i>

Se obtienen los resultados presentados a continuación (ver **Tabla 7**).

Tabla 7. Energías de interacción (kcal / mol) y Eficiencias de Ligando (kcal / mol No. átomos pesados) de la mejor pose obtenida para SAHA, la mejor pose obtenida para TSA y la mejor pose obtenida para cada una de las 16 moléculas PAB acopladas en HDAC8.

HDAC8	Zn ^a	Hnd ^b	Hd ^c	EH ^d	IE ^e	EFQ ^f	EFE ^g	EFC ^h	ET ⁱ	EL ^j	ETN ^k	ELN ^l
SAHA	16.6	4.1	7.9	12.0	6.8	33.7	37.1	29.6	100.4	5.3	1.00	1.00
1111	19.4	1.4	9.6	11.0	5.2	24.4	53.2	6.6	125.9	1.9	1.25	0.36
1211	19.7	0.8	7.2	8.0	5.8	28.6	49.6	3.6	122.9	3.7	1.22	0.70
1311	19.4	3.9	19.3	23.2	5.4	28.1	50.6	15.4	134.0	5.0	1.34	0.94
1411	16.6	2.8	7.3	10.1	4.3	30.3	55.5	15.9	144.0	4.5	1.43	0.85
2111	20.6	0.5	6.9	7.4	7.3	24.3	59.3	22.3	148.4	4.5	1.48	0.85
2211	19.9	3.1	7.7	10.8	8.3	26.9	50.0	8.3	121.5	3.8	1.21	0.72
2311	19.8	7.6	15.0	22.6	8.3	26.0	49.1	19.2	136.0	5.0	1.35	0.95
2411	17.7	1.6	6.9	8.6	5.2	27.4	38.4	19.0	117.6	3.7	1.17	0.69

3111	20.8	1.2	7.6	8.8	7.4	25.1	58.0	2.0	127.2	4.0	1.27	0.75
3211	20.8	0.7	6.8	7.5	7.6	24.7	53.0	3.0	122.6	4.0	1.22	0.75
3311	20.5	3.1	19.3	22.4	7.3	26.4	50.8	7.5	125.7	4.8	1.25	0.91
3411	17.7	4.9	11.9	16.8	5.3	30.6	40.2	16.3	120.6	3.9	1.20	0.73
4111	20.9	1.5	9.2	10.7	7.7	24.5	57.1	5.1	122.8	3.7	1.22	0.70
4211	20.9	2.2	9.3	11.5	7.6	26.3	53.3	5.4	126.6	4.0	1.26	0.75
4311	19.8	5.5	11.9	17.4	7.4	27.7	52.5	10.0	133.1	4.9	1.33	0.93
4411*	14.3	6.2	11.4	17.7	5.4	31.6	37.3	26.8	112.9	3.5	1.12	0.67
TSA	11.3	5.0	9.4	14.4	1.5	31.9	44.7	19.9	96.5	4.4	0.96	0.83

*El modo de unión de 441 es claramente diferente al del resto de las moléculas propuestas y no debe ser comparado empleando los criterios discutidos en este análisis.

^a Energía de interacción de cada una de las moléculas con el cofactor Zinc del sitio activo.

^b Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno no dirigidos.

^c Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno dirigidos.

^d Energía de interacción debida a la formación de enlaces de hidrógeno totales.

^e Energía de interacción debida a interacciones de tipo electrostático.

^f Energía de interacción debida al fragmento quelante de cada molécula.

^g Energía de interacción debida al fragmento espaciador de cada molécula.

^h Energía de interacción debida al fragmento cubierta de cada molécula.

ⁱ Energía de interacción total debida al acoplamiento de cada molécula.

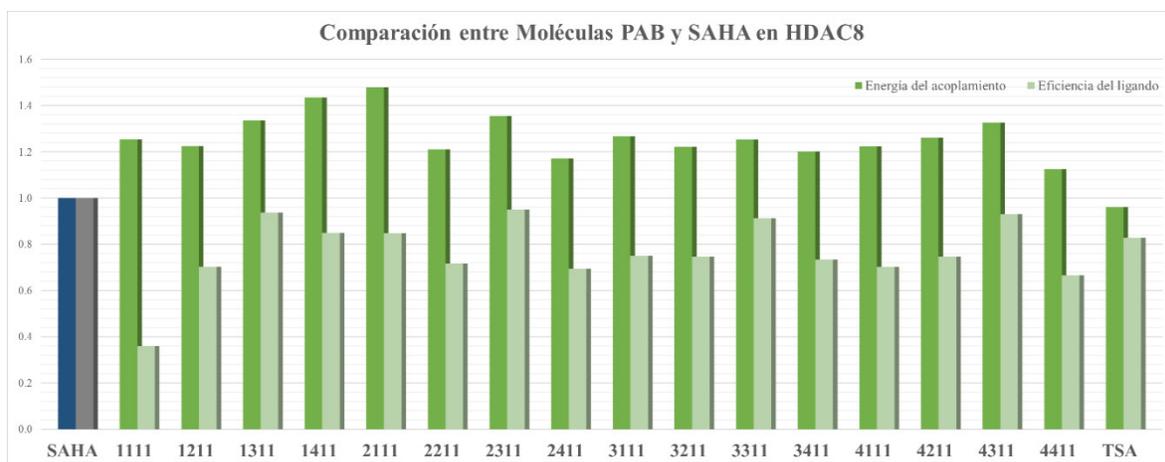
^j Eficiencia del ligando que se obtiene con el cociente entre la energía y el número de átomos pesados de cada molécula.

^k Energía total normalizada que se obtiene con el cociente entre la energía de interacción total de cada una de las moléculas y la energía de interacción total de SAHA que es 100.4 kcal/mol.

^l Eficiencia del ligando normalizada que se obtiene del cociente entre la eficiencia del ligando de cada una de las moléculas y la eficiencia del ligando de SAHA que es 5.3 kcal/mol número de átomos pesados.

Se considera átomos pesados a todos aquellos diferentes de hidrógeno. Se reportan los valores absolutos de todos los calculados. Todos los valores reportados con números en negro implican interacciones de tipo atractivas, mientras que los valores reportados con número en color rojo implican interacciones de tipo repulsivas.

Se hace ahora un análisis comparativo de las Energías de interacción y Eficiencias del ligando normalizadas con respecto a SAHA de cada una de las moléculas PAB propuestas, desde 111 hasta 441. Además, se muestran los resultados obtenidos para Tricostatin A, TSA, que es otro de los fármacos comerciales aprobados por FDA mencionados en la introducción (ver **Gráfica 4**).



Gráfica 4. Energías de acoplamiento y Eficiencias del ligando normalizadas de SAHA, TSA y las moléculas PAB propuestas en HDAC8. La barra en color azul oscuro de la primera columna representa la energía de interacción de SAHA con HDAC8, mientras que las barras en color verde oscuro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 18 representan la energía de interacción de las moléculas PAB y TSA. La barra en color gris oscuro de la primera columna representa la eficiencia del ligando de SAHA con HDAC8, mientras que las barras en color verde claro de cada una de las columnas desde la 2 hasta la 18 representan la eficiencia del ligando de las moléculas PAB y TSA.

Dos de los criterios más empleados para decidir si una molécula tendrá mejor o peor actividad biológica son la Energía de Total de Acoplamiento, ET y la Eficiencia del Ligando, EL, sin embargo, existe una polémica en cuanto a cuál es mejor para discernir el potencial de una molécula.

Podemos notar de los resultados obtenidos que todas las moléculas PAB presentan una mejoría con respecto a SAHA con base en el criterio energético, sin embargo, ninguna presenta una mejor eficiencia del ligando. Las moléculas PAB que tienen una mejor eficiencia del ligando (aunque todas por abajo del valor de SAHA) son 1311, 2311, 3311 y 4311, cabe destacar que el fragmento espaciador 3 está incluido en todas estas moléculas. Mostramos a continuación los acoplamientos moleculares *in silico* de las 4 moléculas PAB con mejores resultados y SAHA (ver **Figura 42**).

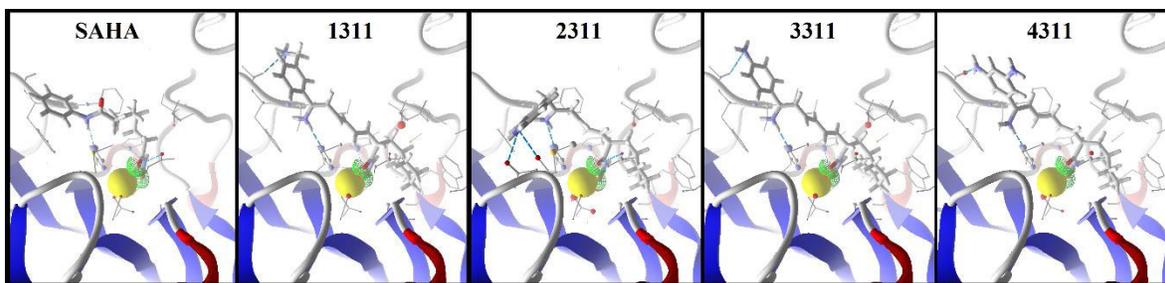


Figura 42. Sitio y modo de unión de SAHA y 4 moléculas PAB en HDAC8. Enlaces de hidrógeno representados con líneas punteadas en color azul. Interacciones electrostáticas atractivas representadas como semiesferas en color verde e interacciones repulsivas representadas como semiesferas en color rojo. Los átomos de los residuos de HDAC8 están representados como esferas de diferentes tamaños en función de la energía de

interacción con la molécula SAHA o PAB, cuanto mayor es el tamaño de la esfera, mayor es su contribución a la energía de acoplamiento.

Todas las moléculas PAB orientan el grupo hidroxámico hacia el átomo de zinc, y forman enlaces de hidrógeno de tipo donador con un residuo de histidina que se encuentra en el interior del túnel que conforma el sitio activo de HDAC8 y orientan el grupo ciclohexano hacia el residuo de triptófano que se encuentra por debajo del átomo de zinc. Además, forman enlaces de hidrógeno de tipo donador con el residuo de aspartato que se encuentra a la entrada del túnel que compone el sitio activo.

No es posible concluir si las moléculas propuestas serán mejores inhibidores de HDAC8 que SAHA.

4.4 Acoplamientos moleculares *in silico* para definir la selectividad

Se llevaron a cabo los acoplamientos moleculares *in silico* de las moléculas PAB 1311, 2311, 3311 y 4311 en las isoformas HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8, obteniendo resultados que sugieren una mayor afinidad por una de las isoformas (ver **Tabla 8**).

Tabla 8. Energías de interacción (kcal / mol) de 4 moléculas PAB acopladas en 4 Isoformas de HDAC.

<i>Moléculas/Isoformas</i>	<i>HDAC2</i>	<i>HDAC4</i>	<i>HDAC7</i>	<i>HDAC8</i>
<i>1311</i>	84.70	102.50	88.29	134.00
<i>2311</i>	77.43	106.31	116.65	136.00
<i>3311</i>	71.18	92.79	54.13	125.70
<i>4311</i>	80.65	99.54	100.96	133.10

<i>SAHA</i>	105.8	52.50	75.60	100.40
-------------	-------	-------	-------	--------

Puede notarse que la molécula PAB que presenta una mejor energía de interacción con la isoforma HDAC2 es 1311, mientras que la molécula PAB que presenta una mejor energía de interacción con las isoformas HDAC4 y HDAC7 es 2311, sin embargo, todas las moléculas PAB seleccionadas presentan una mucho mejor energía de interacción que SAHA con la isoforma HDAC8, lo que se traduce en una mayor afinidad por esta isoforma. En otras palabras, en presencia de las 4 isoformas seleccionadas, las moléculas PAB bloquearán preferentemente el túnel que compone el sitio activo de HDAC8. Por otra parte, el fármaco comercial SAHA tiene afinidades equiparables por las isoformas HDAC2 y HDAC8

Se muestran a continuación los acoplamientos de la molécula PAB 1311 en las 4 isoformas seleccionadas destacando el sustituyente ciclohexano (ver **Figura 43**).

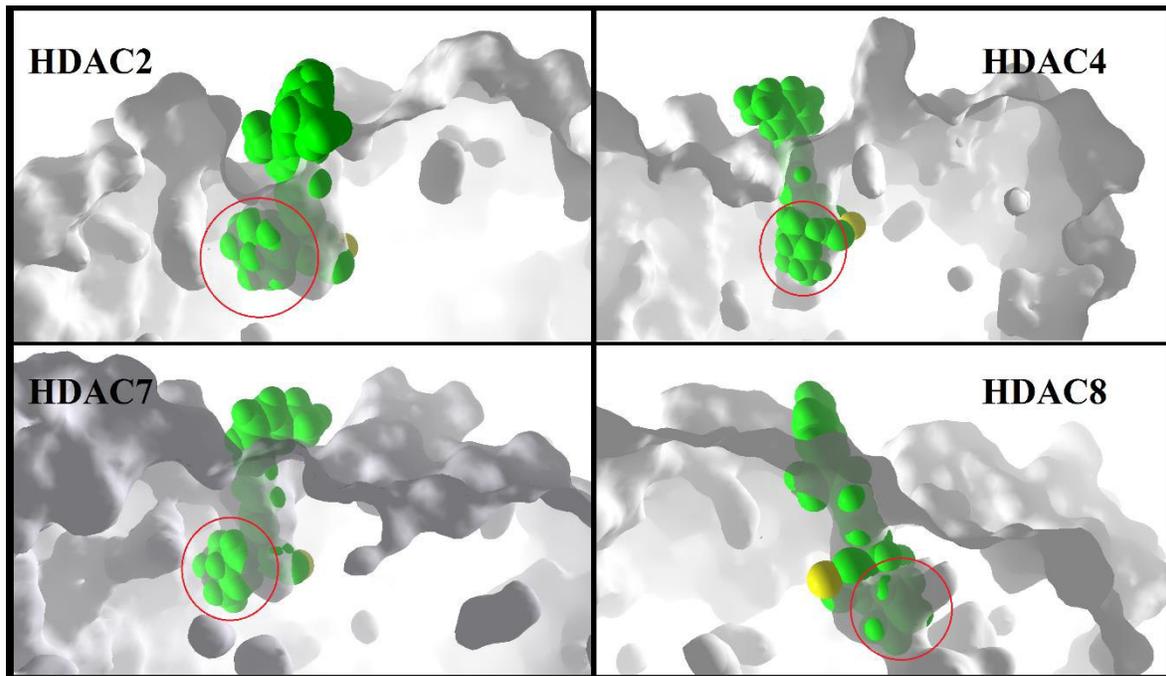


Figura 43. Molécula PAB 1311 acoplada en las isoformas HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8. La molécula PAB es representada en color verde. El túnel del sitio activo de cada una de las isoformas es representado como una superficie en color blanco. El átomo de zinc del sitio activo es representado con una esfera en color amarillo. El grupo ciclohexano se encuentra encerrado con una circunferencia en color rojo.

Puede notarse como el grupo ciclohexano se encuentra sobrepuesto en el fondo del túnel que compone el sitio activo en las isoformas HDAC2 HDAC4 y HDAC7 y por ende presentando interacciones repulsivas de tipo estérico, mientras que en la isoforma HDAC8 se encuentra en el interior del sitio activo ocupando el volumen disponible. Favoreciendo de este modo la energía de interacción entre la

molécula PAB y la isoforma HDAC8. El mismo patrón se repite en todas las isoformas seleccionadas (ver **Figura 44**)

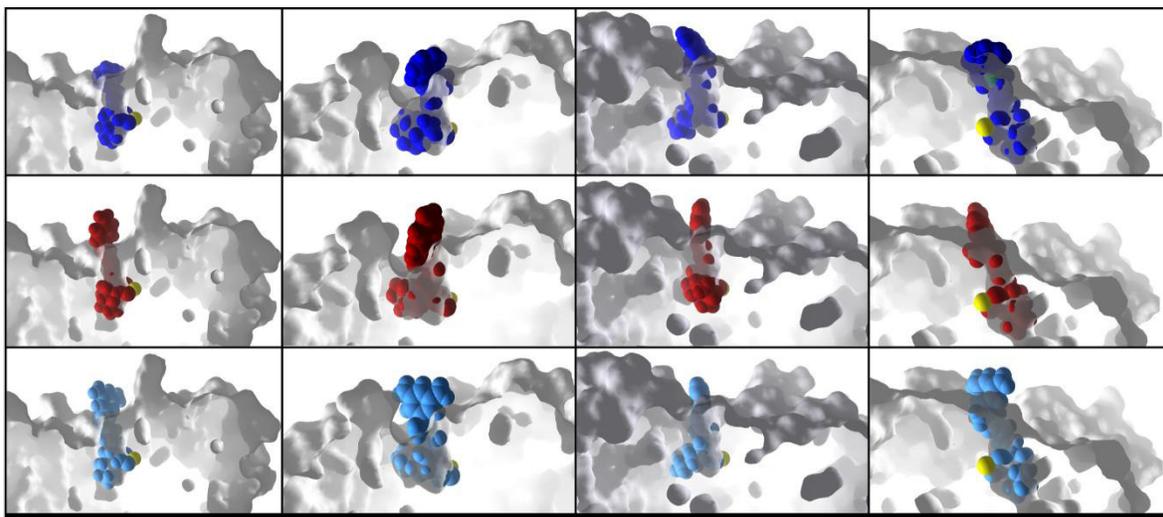


Figura 44. Moléculas PAB acopladas en 3 isoformas de HDAC. Molécula PAB 2311 en color azul oscuro, molécula PAB 3311 en color rojo y molécula PAB 4311 en color azul claro.

4.5 Acoplamiento *in silico* (*Docking*) de una serie de 3 moléculas PAB y comparación con SAHA.

Se aplicó la metodología desarrollada en este trabajo con la finalidad de seleccionar moléculas con mejores probabilidades de inhibir HDACs de una serie de 120 moléculas sintetizadas con probable actividad anti-cancerígena. Mediante un proceso de cribado virtual empleando como filtros los modelos de farmacóforo generados aquí y seguidos de un estudio de acoplamiento molecular *in silico* con cinco isoformas de HDACs.

El presente estudio constituye un esfuerzo de colaboración exitosa por parte de tres grupos de investigación de la Universidad de Guanajuato: El grupo de Síntesis Orgánica liderado por el Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara, el grupo de Toxicología y Evaluación Biológica liderado por la Dra. Minerva Martínez Alfaro y el grupo de Química Teórica liderado por el Dr. Juvencio Robles y del que formo parte.

HDAC6 es una de las isoformas de la familia de HDAC que se encuentra localizada principalmente en el citoplasma y tiene la función de remover los grupos acetilo de las tubulinas y con ello aumentar la motilidad celular impactando de ese modo en múltiples rutas bioquímicas (Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2008).

HDAC6 se encuentra vinculada con cáncer de mama. Diversos estudios han mostrado que la sobre expresión de esta proteína favorece el desarrollo de cáncer de mama en líneas celulares MCF-7 (Aldana-Masangkay and Sakamoto, 2010) y MD-MB 231 (Hsieh *et al.*, 2012)

La estructura de HDAC6 co-cristalizada con SAHA fue reportada junto con las estructuras de otros HDACi derivados de ácidos hidroxámicos incluyendo belinostat y panobinostat (Hai and Christianson, 2016)

En el grupo de Síntesis de Química Orgánica del Dr. Miguel A. Vázquez Guevara con el que colaboramos, se llevó a cabo la síntesis de tres moléculas PAB, 2-(1,3-dioxo-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrolo[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxiacetanamida, 4-(1,3-dioxo-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrolo[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxiбутanamida y 6-(1,3-dioxo-4-fenil-6-(trifluorometil)-3,5-dihidropirrolo[3,4-c]pirrol-2(1H)-il)-N-hidroxihexanamida, denominadas **9a**, **9b** y **9c** respectivamente (Cervantes, 2015) que contienen el grupo hidroxámico, pensando en emplearlas como HDACi, que fueron diseñadas empleando el modelo de farmacóforo propuesto en esta tesis para inhibidores de Desacetilasas de Histonas e, incorporando como sustituyente el grupo trifluoruro de carbono en aras de mejorar la biodisponibilidad de tales moléculas (ver **Figura 45**).

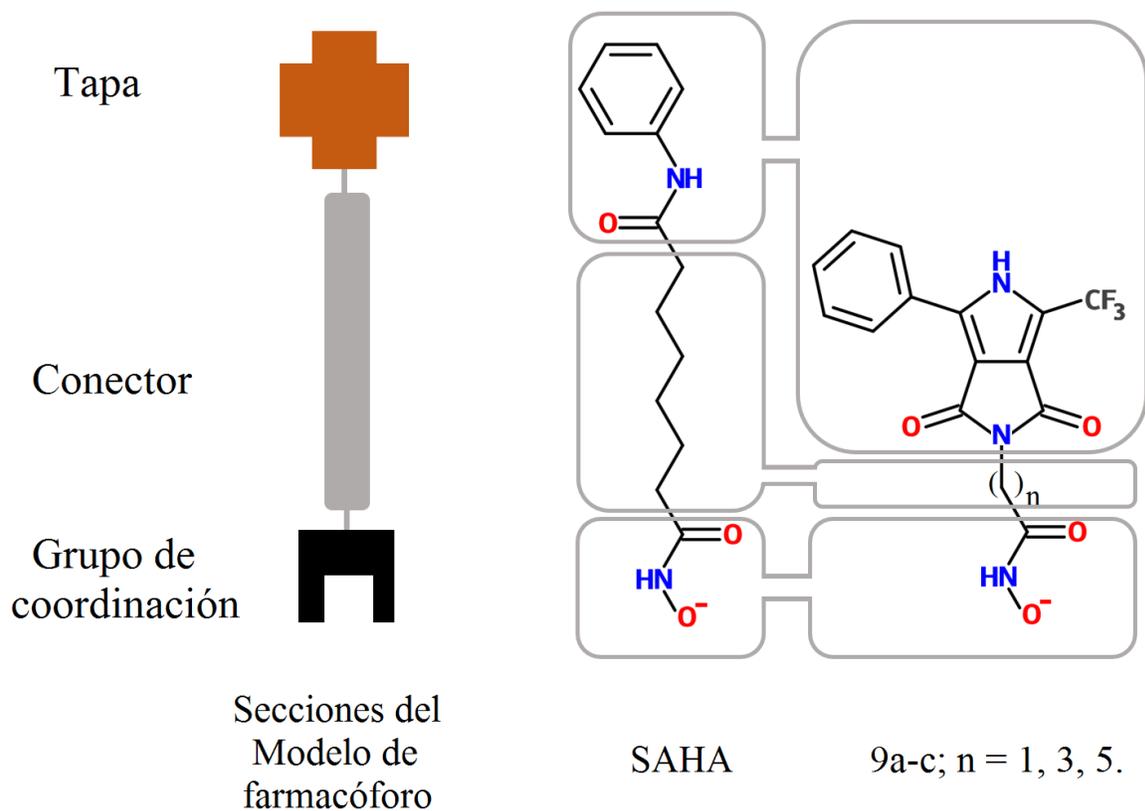


Figura 45. Secciones del Modelo de farmacóforo basado en el ligando: i. Tapa, ii. Conector y iii. Grupo de coordinación (izquierda). SAHA (centro) y moléculas PAB **9a**, **9b** y **9c** (derecha). Los conectores de las moléculas PAB son cadenas alifáticas de 1, 3 y 5 átomos de carbono.

Se realizaron los acoplamientos de las moléculas PAB en HDAC6 para comprobar si el sitio y modo de unión eran similares a los de SAHA. SAHA bloquea el sitio activo de HDAC6 orientando el grupo hidroxámico hacia el átomo de zinc del fondo del túnel y exponiendo el anillo bencénico hacia el exterior de la enzima. La molécula **9c** bloquea el sitio activo de HDAC6 orientando el grupo hidroxámico hacia el átomo de zinc y exponiendo los heterociclos fusionados de su estructura hacia el exterior de la enzima. SAHA forma un enlace de hidrógeno de tipo aceptor con el átomo de oxígeno carbonilo del grupo hidroxámico y el grupo hidroxilo del residuo de tirosina 745 con una distancia de 1.81 Å y un ángulo de 95°. La molécula **9c** forma un enlace de hidrógeno de tipo donador con el átomo de nitrógeno del grupo hidroxámico y el átomo de nitrógeno no protonado del residuo histidina 574 con una distancia de 1.70 Å y un ángulo de 145°, un enlace de hidrógeno de tipo aceptor con el átomo de oxígeno carbonilo del grupo hidroxámico y el grupo hidroxilo del residuo de tirosina 745 con una distancia de 1.57 Å y un ángulo de 123° y un enlace de hidrógeno de tipo aceptor con el átomo de oxígeno del heterociclo que está sustituido del mismo lado que el grupo trifluoruro de carbono y el grupo hidroxilo del residuo de serina 531 con una distancia de 1.63 Å y un ángulo de 158° (ver **Figura 46**).

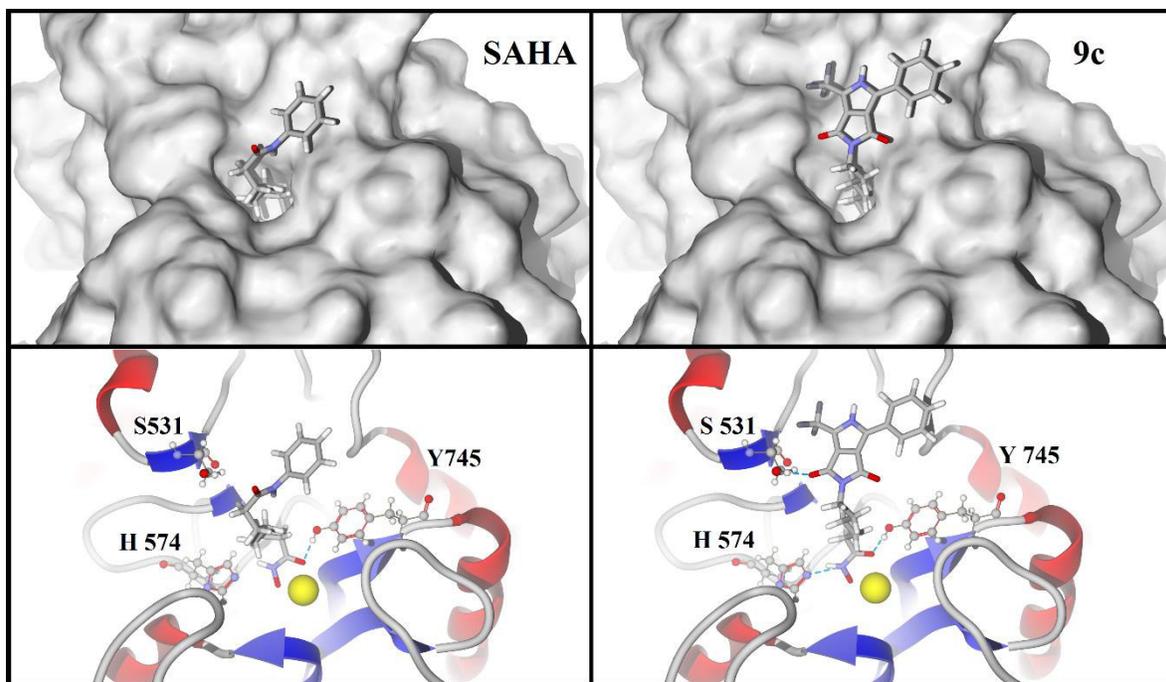


Figura 46. SAHA y **9c** bloqueando el túnel que compone el sitio activo de HDAC6 (arriba) y enlaces de hidrógeno representados con líneas punteadas y residuos Histidina 574, Tirosina 745 al fondo del túnel y Serina 531 a la entrada del túnel.

Las moléculas **9a** y **9b** también fueron acopladas en el sitio activo de HDAC6, debido al tamaño de la cadena alifática de 1 y 3 átomos de carbono respectivamente que hace de espaciador, los átomos de oxígeno que son sustituyentes del heterociclo quedan en el interior del túnel. La parte central del túnel tiene dos residuos de fenilalanina que le confieren características hidrofóbicas que no permiten un adecuado acoplamiento de los átomos de oxígeno. La molécula **9c** tiene una cadena alifática de 5 átomos de carbono, por lo que los átomos de oxígeno que son sustituyentes del heterociclo quedan en el exterior de la enzima (ver **Figura 47**).

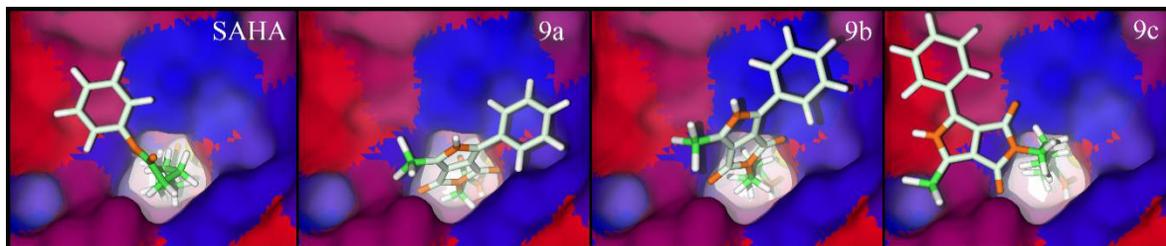


Figura 47. Superficie de lipofilicidad del sitio activo de HDAC6. Las secciones en color azul representan sitios hidrofóbicos, mientras que las secciones en color rojo representan sitios hidrofílicos. Los átomos de las moléculas en color naranja son hidrofílicos.

Las tres moléculas sintetizadas y SAHA fueron acopladas en 5 isoformas de HDAC: HDAC2, HDAC4, HDAC6, HDA7 y HDAC8, y se calculó la energía del acoplamiento con cada una de ellas, se reportan los resultados obtenidos a continuación (ver **Tabla 9**).

Tabla 9. Energías* del acoplamiento entre moléculas **9a**, **9b**, **9c** y SAHA en 5 isoformas de HDAC y el promedio para cada molécula PAB y SAHA.

Molécula/Isoforma	HDAC2	HDAC4	HDAC6	HDAC7	HDAC8	Promedio
9a	93.31	98.77	85.62	93.58	68.94	88.04
9b	77.46	89.52	103.45	111.42	95.65	95.50
9c	135.93	70.80	100.63	123.75	93.12	104.85
SAHA	131.97	85.62	83.16	103.87	78.67	96.66

*Valores absolutos reportados en kcal/mol

Se puede notar que la energía del acoplamiento de **9c** en HDAC6 es mejor que la de SAHA, sin embargo, también es mejor la energía de acoplamiento de las moléculas **9a** y **9b** que la de SAHA, por ello se realizaron los acoplamientos en un conjunto de las isoformas disponibles y se reporta el promedio. El valor absoluto de la energía de acoplamiento promedio de la molécula **9c** en el conjunto de isoformas seleccionado es mejor que la de SAHA, mientras que el de las moléculas **9a** y **9b** es menor. Atendiendo a estos valores se prevé que la capacidad inhibitoria de HDAC de la molécula **9c** sea mejor que la de SAHA.

El efecto anti proliferativo de las moléculas **9a**, **9b**, y **9c** y SAHA fue evaluado mediante ensayos MTT (Mosmann, 1983). Los experimentos corrieron a cargo del grupo de Toxicología y Evaluación Biológica de la Dra. Minerva Martínez-Alfaro y fueron realizados en dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF7 y MDA-MB-231. El efecto inhibitorio de las moléculas **9a**, **9b** y **9c** fue comparado con el de SAHA, encontrando que solo la molécula **9c** muestra una capacidad inhibitoria comparable a la de SAHA. Se muestran los resultados de la Concentración Inhibitoria al 50 %, IC₅₀ de SAHA y **9c** a continuación (ver **Tabla 10**).

Tabla 10. Concentraciones inhibitorias al 50 % de SAHA y molécula **9c** en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MD-MB-231.

Líneas celulares/Moléculas	SAHA	9c
MCF7	2.1 ± 0.3 μM	7.6 ± 0.7 μM
MD-MB-231	3.1 ± 0.3 μM	1.6 ± 0.2 μM

Puede notarse que en la línea celular MD-MB-231, la IC₅₀ de **9c** es menor a la de SAHA. En otras palabras, para esta línea celular que es altamente metastásica, **9c** es un inhibidor más potente que el fármaco comercial, SAHA.

Además, fueron evaluados los niveles de acetilación de la histona H3 en ambas líneas celulares con la finalidad de corroborar que el mecanismo de acción de **9c** fuera el mismo que el de SAHA. Se presentan los datos obtenidos a continuación (ver **Figura 48**).

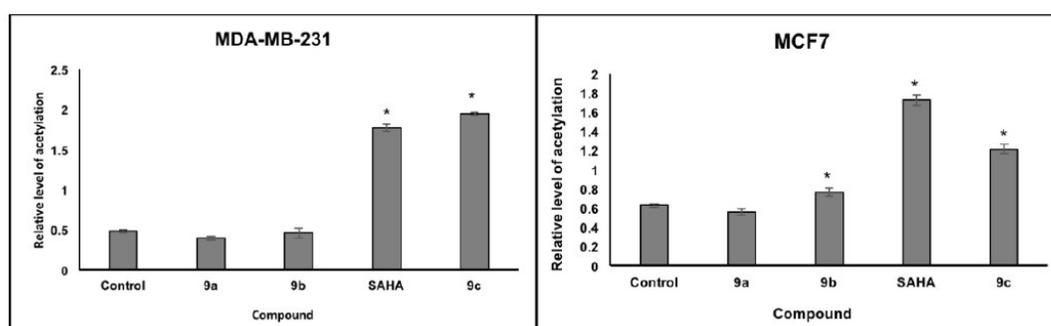


Figura 48. Niveles de acetilación de la histona H3 en presencia de las moléculas **9a**, **9b** y **9c** y SAHA, y sin un posible inhibidor de HDAC como control.

Es notorio que los niveles de acetilación de la histona H3 aumentan en presencia de SAHA y de **9c**. Este efecto se debe a que las moléculas SAHA y **9c** inhiben a la actividad de HDAC, es decir que imposibilitan la remoción de los grupos acetilo de las histonas y, r ende, las histonas permanecen acetiladas. Puede notarse que en la línea celular MDA-MB-231 existe un mayor nivel de acetilación en presencia de **9c** que en presencia de SAHA. En otras palabras, la molécula **9c** inhibe un mayor

número de HDAC que el fármaco comercial, SAHA. Todos los resultados de las pruebas biológicas están en total acuerdo con los cálculos y predicciones teórico-computacionales de este trabajo.

CAPÍTULO 5. Conclusiones

1. Se ha diseñado una serie de moléculas orgánicas con capacidad para bloquear el sitio activo de al menos 4 distintas isoformas de HDAC: HDAC2, HDAC4, HDAC6 y HDAC8, todas ellas vinculadas con diferentes tipos de cáncer.
2. Se han generado modelos de farmacóforo para cada una de las isoformas estudiadas en este proyecto. Tales modelos pueden ser empleados para plantear moléculas objetivo de un proceso de síntesis, o bien para llevar a cabo un proceso de cribado virtual con las moléculas accesibles en las bases de datos, buscando el reposicionamiento de fármacos.
3. Encontramos el sitio y modo de unión de la serie de moléculas propuestas como inhibidores de HDAC. Además, damos detalles de las principales interacciones de cada una de las moléculas propuestas con los residuos que componen el sitio activo de cada una de las isoformas de HDAC seleccionadas.
4. La energía de acoplamiento y eficiencia del ligando de las moléculas propuestas como HDAC2i, 231 y 321 son mejores que las obtenidas para SAHA, por lo tanto, tienen mayores probabilidades de superar la capacidad inhibitoria del fármaco comercial, SAHA en la isoforma HDAC2.
5. Los valores absolutos de la energía de acoplamiento y eficiencia del ligando de las moléculas propuestas como HDAC4i, 11, 21, 31, 41, 51 y 61 son superiores a las obtenidas para SAHA, por lo tanto, tienen mejores posibilidades de superar la capacidad inhibitoria del fármaco comercial, SAHA en la isoforma HDAC4.
6. Los valores absolutos de la energía de acoplamiento y eficiencia del ligando de las moléculas propuestas como HDAC7i, 111, 121, 131, 141, 211, 221, 241, 321, 341, 431 y 441 son superiores a las obtenidas para SAHA, por lo tanto, tienen mejores posibilidades de superar la capacidad inhibitoria del fármaco comercial, SAHA en la isoforma HDAC7.
7. El valor absoluto de la energía de acoplamiento de las 16 moléculas propuestas es superior a la de SAHA en HDAC8. El valor absoluto de la eficiencia del ligando de las 16 moléculas propuestas es inferior al de SAHA en HDAC8. Sin embargo, las moléculas 1311, 2311, 3311 y 4311 presentan una energía de acoplamiento superior en la isoforma HDAC8 que en las otras isoformas seleccionadas, mientras que la energía de acoplamiento de SAHA en HDAC8 es equiparable a la energía de acoplamiento de las otras isoformas e incluso es superior en la

- isoforma HDAC2. Por lo tanto, las moléculas 1311, 2311, 3311 y 4311 tienen mejores posibilidades de superar la capacidad inhibitoria de SAHA en la isoforma HDAC8.
8. Se han generado 4 modelos de farmacóforo de HDACi para las isoformas de HDAC: HDAC2, HDAC4, HDAC7 y HDAC8. En el caso de esta última se incluye un elemento estérico del farmacóforo que puede aumentar la selectividad del inhibidor.
 9. Mediante cálculos de acoplamiento molecular *in silico* se ha determinado que la molécula **9c** tiene la mejor probabilidad de funcionar exitosamente como HDACi. Los resultados computacionales están en acuerdo con la evaluación biológica.
 10. Se ha demostrado, tanto por medio de un estudio de acoplamiento molecular *in silico*, como experimentalmente mediante la medición de la acetilación de la Histona 3, que la molécula **9c** lleva a cabo el mismo mecanismo que el fármaco comercial SAHA, pero de un modo más efectivo, con una capacidad inhibitoria superior, siendo la IC₅₀ de SAHA igual a 3.1±0.3 μM, mientras que la IC₅₀ de **9c** es igual a 1.6 ± 0.2 μM en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
 11. El uso de la metodología computacional desarrollada en este proyecto permite discernir, de entre un gran número de moléculas, cuales tendrán mejores probabilidades para fungir como inhibidores de HDAC.

CAPÍTULO 6. Perspectivas

1. Generar modelos de farmacóforo para el conjunto completo de 11 isoformas de HDAC: desde HDAC1 hasta HDAC11, dado que la sobreexpresión de cada una de ellas está asociada a distintos tipos de Cáncer y otras enfermedades.
2. Generar una nueva serie de modelos de farmacóforo ahora basados en el ligando, y comparar con los modelos de farmacóforo basados en el receptor, en el entendido de que los elementos de farmacóforo que coincidan en los modelos generados con uno y otro enfoque deben ser especialmente importantes.
3. Emplear la técnica descrita para la propuesta de fragmentos atendiendo a los modelos de farmacóforo propuestos, pero ahora utilizando fragmentos de moléculas sugeridos para fármacos.
4. Obtener modelos QSAR y/o QSPR que permitan asegurar la biodisponibilidad de las moléculas propuestas, empleando descriptores vinculados con la solubilidad y capacidad para atravesar membranas, entre otros. Los cálculos de estructura electrónica cuánticos adicionales pueden ser necesarios para obtener estas propiedades.

5. Calcular índices de aromaticidad o deslocalización electrónica que se puedan vincular con las interacciones de tipo apilamiento, con la finalidad de poder sugerir grupos sustituyentes para anillos aromáticos que maximicen este tipo de interacciones.

CAPÍTULO 7. Bibliografía

- Abagyan, R., and M. Totrov, 2001, High-throughput docking for lead generation: Current opinion in chemical biology, v. 5, p. 375-382.
- Aldana-Masangkay, G. I., and K. M. Sakamoto, 2010, The role of HDAC6 in cancer: BioMed Research International, v. 2011 p. 1-10.
- Alder, B. J., and T. Wainwright, 1959, Studies in molecular dynamics. I. General method: The Journal of Chemical Physics, v. 31, p. 459-466.
- Anson, B. D., J. Ma, and J.-Q. He, 2009, Identifying cardiotoxic compounds: Genetic Engineering & Biotechnology News, v. 29, p. 34-35.
- Balasubramanian, S., J. Ramos, W. Luo, M. Sirisawad, E. Verner, and J. Buggy, 2008, A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas: Leukemia, v. 22, p. 1026-1034.
- Barneda-Zahonero, B., and M. Parra, 2012, Histone deacetylases and cancer: Molecular oncology, v. 6, p. 579-589.
- Bartling, B., H.-S. Hofmann, T. Boettger, G. Hansen, S. Burdach, R.-E. Silber, and A. Simm, 2005, Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma: Lung Cancer, v. 49, p. 145-154.
- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne, 2000, The protein data bank: Nucleic acids research, v. 28, p. 235-242.
- Box, V. G., 1997, The molecular mechanics of quantized valence bonds: Molecular modeling annual, v. 3, p. 124-141.
- Box, V. G., 2004, Stereo-electronic effects in polynucleotides and their double helices: Journal of molecular structure, v. 689, p. 33-41.
- Bultinck, P., H. De Winter, W. Langenaeker, and J. P. Tollenare, 2003, Computational medicinal chemistry for drug discovery, CRC Press.
- Bürli, R. W., C. A. Luckhurst, O. Aziz, K. L. Matthews, D. Yates, K. A. Lyons, M. Beconi, G. McAllister, P. Breccia, and A. J. Stott, 2013, Design, synthesis, and biological evaluation of potent and selective class IIa histone deacetylase (HDAC) inhibitors as a potential therapy for Huntington's disease: Journal of medicinal chemistry, v. 56, p. 9934-9954.
- Cervantes, C., 2015, Síntesis de Inhibidor de la Enzima Desacetilasa de Histonas como Anticancerígeno, Universidad de Guanajuato, México.
- Cheng, T., L. Grasse, J. Shah, and J. Chandra, 2015, Panobinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor: rationale for and application to treatment of multiple myeloma: Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998), v. 51, p. 491-504.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, and M. Mann, 2009, Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions: Science, v. 325, p. 834-840.
- Cuevas, G., and F. Cortés, 2003, Introducción a la química computacional, Fondo de cultura económica.
- De Ruijter, A., A. Van Gennip, H. Caron, S. Kemp, and A. van Kuilenburg, 2003, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family: Biochem. J, v. 370, p. 737-749.
- Decroos, C., C. M. Bowman, J.-A. S. Moser, K. E. Christianson, M. A. Deardorff, and D. W. Christianson, 2014, Compromised structure and function of HDAC8 mutants identified in Cornelia de Lange Syndrome spectrum disorders: ACS chemical biology, v. 9, p. 2157-2164.
- Dokmanovic, M., C. Clarke, and P. A. Marks, 2007, Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives: Molecular cancer research, v. 5, p. 981-989.

- Duan, Y., C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, and T. Lee, 2003, A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations: *Journal of computational chemistry*, v. 24, p. 1999-2012.
- Ehrlich, P., 1909, Present status of chemotherapy: *Ber Dtsch Chem Ges*, v. 42, p. 17-47.
- Epstkin, C. J., G. M. Martin, A. L. Schultz, and A. G. Motulskys, 1966, A Review of its Symptomatology, Natural History, Pathologic Features, Genetics And Relationship to the Natural Aging Process: *Medicine*, v. 45, p. 177-221.
- Fermi, E., 1927, Un metodo statistico per la determinazione di alcune priorieta dell'atome: *Rend. Accad. Naz. Lincei*, v. 6, p. 32.
- Finnin, M. S., J. R. Donigian, A. Cohen, V. M. Richon, R. A. Rifkind, P. A. Marks, R. Breslow, and N. P. Pavletich, 1999, Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors: *Nature*, v. 401, p. 188-193.
- Ganai, S. A., 2016, Histone deacetylase inhibitor pracinostat in doublet therapy: a unique strategy to improve therapeutic efficacy and to tackle herculean cancer chemoresistance: *Pharmaceutical biology*, v. 24:9, p. 1926-1935.
- Glaser, K. B., 2007, HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential: *Biochemical pharmacology*, v. 74, p. 659-671.
- Glaser, K. B., J. Li, M. J. Staver, R.-Q. Wei, D. H. Albert, and S. K. Davidsen, 2003, Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA: *Biochemical and biophysical research communications*, v. 310, p. 529-536.
- Goldberg, D., 1989, *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*, Addison-Wesley.
- Goto, M., 1997, Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing: *Mechanisms of ageing and development*, v. 98, p. 239-254.
- Grozinger, C. M., and S. L. Schreiber, 2002, Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors: *Chemistry & biology*, v. 9, p. 3-16.
- Haggarty, S. J., K. M. Koeller, J. C. Wong, R. A. Butcher, and S. L. Schreiber, 2003, Multidimensional chemical genetic analysis of diversity-oriented synthesis-derived deacetylase inhibitors using cell-based assays: *Chemistry & biology*, v. 10, p. 383-396.
- Hai, Y., and D. W. Christianson, 2016, Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition: *Nature Chemical Biology*, v. 12, p. 741-747.
- Halkidou, K., S. Cook, H. Leung, D. Neal, and C. Robson, 2004, Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate: *European urology*, v. 45, p. 382-389.
- Halperin, I., B. Ma, H. Wolfson, and R. Nussinov, 2002, Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 47, p. 409-443.
- Heltweg, B., F. Dequiedt, B. L. Marshall, C. Brauch, M. Yoshida, N. Nishino, E. Verdin, and M. Jung, 2004, Subtype selective substrates for histone deacetylases: *Journal of medicinal chemistry*, v. 47, p. 5235-5243.
- Herper, M., 2013, The cost of creating a new drug now \$5 billion, pushing big pharma to change: *Forbes*, v. 8 p. 1-2.
- Hess, B., C. Kutzner, D. Van Der Spoel, and E. Lindahl, 2008, GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation: *Journal of chemical theory and computation*, v. 4, p. 435-447.
- Hohenberg, P., and W. Kohn, 1964, Inhomogeneous electron gas: *Physical review*, v. 136, p. B864.
- Holland, J. H., 1975, *Adaptation in natural and artificial systems: an introductory analysis with applications to biology, control, and artificial intelligence*, U Michigan Press.
- Hsieh, T.-H., C.-F. Tsai, C.-Y. Hsu, P.-L. Kuo, J.-N. Lee, C.-Y. Chai, S.-C. Wang, and E.-M. Tsai, 2012, Phthalates induce proliferation and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer through the AhR/HDAC6/c-Myc signaling pathway: *The FASEB Journal*, v. 26, p. 778-787.
- Imai, S.-I., C. M. Armstrong, M. Kaeberlein, and L. Guarente, 2000, Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase: *Nature*, v. 403, p. 795-800.
- Jain, A. N., 2006, Scoring functions for protein-ligand docking: *Current Protein and Peptide Science*, v. 7, p. 407-420.
- Jones, G., P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor, 1997, Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking: *Journal of molecular biology*, v. 267, p. 727-748.

- Kapustin, G. V., G. Fejér, J. L. Gronlund, D. G. McCafferty, E. Seto, and F. A. Etzkorn, 2003, Phosphorus-based SAHA analogues as histone deacetylase inhibitors: *Organic letters*, v. 5, p. 3053-3056.
- Khabele, D., D.-S. Son, A. K. Parl, G. L. Goldberg, L. H. Augenlicht, J. M. Mariadason, and V. Montgomery Rice, 2007, Drug-induced inactivation or gene silencing of class I histone deacetylases suppresses ovarian cancer cell growth: implications for therapy: *Cancer biology & therapy*, v. 6, p. 795-801.
- Khan, M., M. A. Blasco, and S. Pelengaris, 2006, *The molecular biology of cancer*, Blackwell Pub.
- Kozikowski, A. P., S. Tapadar, D. N. Luchini, K. H. Kim, and D. D. Billadeau, 2008, Use of the nitrile oxide cycloaddition (NOC) reaction for molecular probe generation: a new class of enzyme selective histone deacetylase inhibitors (HDACIs) showing picomolar activity at HDAC6: *Journal of medicinal chemistry*, v. 51, p. 4370-4373.
- Kutzner, C., D. Van Der Spoel, M. Fechner, E. Lindahl, U. W. Schmitt, B. L. De Groot, and H. Grubmüller, 2007, Speeding up parallel GROMACS on high-latency networks: *Journal of computational chemistry*, v. 28, p. 2075-2084.
- Lauffer, B. E., R. Mintzer, R. Fong, S. Mukund, C. Tam, I. Zilberleyb, B. Flicke, A. Ritscher, G. Fedorowicz, and R. Vallero, 2013, Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability: *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, p. 26926-26943.
- Lee, H.-Z., V. E. Kwitkowski, P. L. Del Valle, M. S. Ricci, H. Saber, B. A. Habtemariam, J. Bullock, E. Bloomquist, Y. L. Shen, and X.-H. Chen, 2015, FDA approval: belinostat for the treatment of patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: *Clinical Cancer Research*, v. 21, p. 2666-2670.
- Lenfant, F., R. Mann, B. Thomsen, X. Ling, and M. Grunstein, 1996, All four core histone N-termini contain sequences required for the repression of basal transcription in yeast: *The EMBO journal*, v. 15, p. 3974.
- Lengauer, T., and M. Rarey, 1996, Computational methods for biomolecular docking: *Current opinion in structural biology*, v. 6, p. 402-406.
- Lensink, M. F., R. Méndez, and S. J. Wodak, 2007, Docking and scoring protein complexes: CAPRI 3rd Edition: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 69, p. 704-718.
- Levine, I. N., 2009, *Quantum chemistry*, v. 6, Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Levine, I. N., D. H. Busch, and H. Shull, 2009, *Quantum chemistry*, v. 6, Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Lewin, B., 2004, *Genes VIII*. Upper Saddle River: New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Longworth, M., and L. Laimins, 2006, Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src: *Oncogene*, v. 25, p. 4495-4500.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond, 1997, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution: *Nature*, v. 389, p. 251-260.
- Luo, J., F. Su, D. Chen, A. Shiloh, and W. Gu, 2000, Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis: *Nature*, v. 408, p. 377-381.
- Mandal, S., M. n. Moudgil, and S. K. Mandal, 2009, Rational drug design: *European journal of pharmacology*, v. 625, p. 90-100.
- Mann, B. S., J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice, and R. Pazdur, 2007, FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma: *The oncologist*, v. 12, p. 1247-1252.
- Marks, P. A., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W. K. Kelly, 2001, Histone deacetylases and cancer: causes and therapies: *Nature Reviews Cancer*, v. 1, p. 194-202.
- Mayo, S. L., B. D. Olafson, and W. A. Goddard, 1990, DREIDING: a generic force field for molecular simulations: *Journal of Physical Chemistry*, v. 94, p. 8897-8909.
- McDonald, I. K., and J. M. Thornton, 1994, Satisfying hydrogen bonding potential in proteins: *Journal of molecular biology*, v. 238, p. 777-793.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: *Journal of immunological methods*, v. 65, p. 55-63.
- Moss, T. J., and L. L. Wallrath, 2007, Connections between epigenetic gene silencing and human disease: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 618, p. 163-174.
- Mottet, D., and V. Castronovo, 2008, Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy: *Clinical & experimental metastasis*, v. 25, p. 183-189.
- NCI, 2016, What Is Cancer? - National Cancer Institute <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Consultado por última vez en Marzo de 2017.

- Nissink, J. W. M., C. Murray, M. Hartshorn, M. L. Verdonk, J. C. Cole, and R. Taylor, 2002, A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 49, p. 457-471.
- Ouaissi, M., I. Sielezneff, R. Silvestre, B. Sastre, J.-P. Bernard, J. S. Lafontaine, M. J. Payan, L. Dahan, N. Pirro, and J. F. Seitz, 2008, High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas: *Annals of surgical oncology*, v. 15, p. 2318-2328.
- Parker, T. M., E. G. Hohenstein, R. M. Parrish, N. V. Hud, and C. D. Sherrill, 2013, Quantum-mechanical analysis of the energetic contributions to π stacking in nucleic acids versus rise, twist, and slide: *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, p. 1306-1316.
- Parr, R., and W. Yang, 1989, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*: New York, Oxford.
- Parr, R. G., 1980, *Density functional theory of atoms and molecules*, Springer. Chapter: Horizons of Quantum Chemistry. Volume 3 of the series Académie Internationale Des Sciences Moléculaires Quantiques / International Academy of Quantum Molecular Science pp 5-15.
- Paul, S. M., D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, and A. L. Schacht, 2010, How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge: *Nature reviews Drug discovery*, v. 9, p. 203-214.
- Pontiki, E., and D. Hadjipavlou-Litina, 2012, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs). Structure—Activity relationships: History and new QSAR perspectives: *Medicinal research reviews*, v. 32, p. 1-165.
- Rahman, A., 1964, Correlations in the motion of atoms in liquid argon: *Physical Review*, v. 136, p. A405.
- Rodenhiser, D., and M. Mann, 2006, Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications: *Canadian Medical Association Journal*, v. 174, p. 341-348.
- Rodriguez-Gonzalez, A., T. Lin, A. K. Ikeda, T. Simms-Waldrip, C. Fu, and K. M. Sakamoto, 2008, Role of the aggresome pathway in cancer: Targeting histone deacetylase 6–dependent protein degradation: *Cancer Research*, v. 68, p. 2557-2560.
- Rose, P. W., B. Beran, C. Bi, W. F. Bluhm, D. Dimitropoulos, D. S. Goodsell, A. Prlić, M. Quesada, G. B. Quinn, and J. D. Westbrook, 2011, The RCSB Protein Data Bank: redesigned web site and web services: *Nucleic acids research*, v. 39, p. D392-D401.
- Saillard, C., J. El Cheikh, A. Granata, D. Coso, J.-M. Schiano, R. Bouabdallah, D. Blaise, N. Charrier, and F. Broussais, 2016, Histone deacetylase inhibitor abexinostat (S78454/PCI-24781) as a successful approach in a case of refractory peripheral angio-immunoblastic T-cell lymphoma, as a bridge to reduced intensity conditioning haplo-identical allogeneic stem cell transplant: *Leukemia & lymphoma*, v. 57, p. 714-716.
- Saji, S., M. Kawakami, S.-i. Hayashi, N. Yoshida, M. Hirose, S.-i. Horiguchi, A. Itoh, N. Funata, S. L. Schreiber, and M. Yoshida, 2005, Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer: *Oncogene*, v. 24, p. 4531-4539.
- Saldívar-González, F., F. D. Prieto-Martínez, and J. L. Medina-Franco, 2016, Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional: *Educación Química*. v. 28, p. 51-58.
- Schuetz, A., J. Min, A. Allali-Hassani, M. Schapira, M. Shuen, P. Loppnau, R. Mazitschek, N. P. Kwiatkowski, T. A. Lewis, and R. L. Maglathin, 2008, Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity: *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 11355-11363.
- Schwab, M., 2011, *Encyclopedia of cancer*, v. 1, Springer Science & Business Media. Publisher Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Edition Number 2, eReference ISBN 978-3-540-47648-1.
- Sengupta, N., and E. Seto, 2004, Regulation of histone deacetylase activities: *Journal of cellular biochemistry*, v. 93, p. 57-67.
- Sertkaya, A., H.-H. Wong, A. Jessup, and T. Beleche, 2016, Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States: *Clinical Trials*, v. 13, p. 117-126.
- Shao, Y., L. F. Molnar, Y. Jung, J. Kussmann, C. Ochsenfeld, S. T. Brown, A. T. Gilbert, L. V. Slipchenko, S. V. Levchenko, and D. P. O'Neill, 2006, Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package: *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 8, p. 3172-3191.
- Sharma, S., T. K. Kelly, and P. A. Jones, 2010, Epigenetics in cancer: *Carcinogenesis*, v. 31, p. 27-36.
- Shirts, M. R., J. W. Pitera, W. C. Swope, and V. S. Pande, 2003, Extremely precise free energy calculations of amino acid side chain analogs: Comparison of common molecular mechanics force fields for proteins: *The Journal of chemical physics*, v. 119, p. 5740-5761.

- Sigalotti, L., E. Fratta, S. Coral, E. Cortini, A. Covre, H. J. Nicolay, L. Anzalone, L. Pezzani, A. M. Di Giacomo, and E. Fonsatti, 2007, Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications: *Journal of cellular physiology*, v. 212, p. 330-344.
- Sinnokrot, M. O., E. F. Valeev, and C. D. Sherrill, 2002, Estimates of the *ab initio* limit for π - π interactions: The benzene dimer: *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, p. 10887-10893.
- Somoza, J. R., R. J. Skene, B. A. Katz, C. Mol, J. D. Ho, A. J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J. J. Buggy, and E. Chi, 2004, Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases: *Structure*, v. 12, p. 1325-1334.
- Song, J., J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, and J. Y. Lee, 2005, Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer: *Apmis*, v. 113, p. 264-268.
- Sternson, S. M., J. C. Wong, C. M. Grozinger, and S. L. Schreiber, 2001, Synthesis of 7200 small molecules based on a substructural analysis of the histone deacetylase inhibitors trichostatin and trapoxin: *Organic letters*, v. 3, p. 4239-4242.
- Stewart, J. J., 1989, Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method: *Journal of Computational Chemistry*, v. 10, p. 209-220.
- Suzuki, T., A. Kouketsu, Y. Itoh, S. Hisakawa, S. Maeda, M. Yoshida, H. Nakagawa, and N. Miyata, 2006, Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate: *Journal of medicinal chemistry*, v. 49, p. 4809-4812.
- Sygula, A., F. R. Fronczek, R. Sygula, P. W. Rabideau, and M. M. Olmstead, 2007, A double concave hydrocarbon buckycatcher: *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 3842-3843.
- Thomas, L. H., 1927, The calculation of atomic fields: *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, p. 542-548.
- Thomsen, R., and M. H. Christensen, 2006, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking: *Journal of medicinal chemistry*, v. 49, p. 3315-3321.
- Tsuzuki, S., K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, and K. Tanabe, 2002, Origin of attraction and directionality of the π/π interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction: *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, p. 104-112.
- Valenzuela-Fernandez, A., J. R. Cabrero, J. M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid, 2008, HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions: *Trends in cell biology*, v. 18, p. 291-297.
- Van Der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. Berendsen, 2005, GROMACS: fast, flexible, and free: *Journal of computational chemistry*, v. 26, p. 1701-1718.
- Vanhaecke, T., P. Papeleu, G. Elaut, and V. Rogiers, 2004, Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view: *Current medicinal chemistry*, v. 11, p. 1629-1643.
- Vannini, A., C. Volpari, G. Filocamo, E. C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, and P. Gallinari, 2004, Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 15064-15069.
- Villar-Garea, A., and M. Esteller, 2003, DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why?: *Current drug metabolism*, v. 4, p. 22-31.
- Villar-Garea, A., and M. Esteller, 2004, Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents: *International Journal of Cancer*, v. 112, p. 171-178.
- Weinberg, R. A., 1996, How cancer arises: *Scientific American*, v. 275, p. 62-71.
- Wermuth, C., C. Ganellin, P. Lindberg, and L. Mitscher, 1998, Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998): *Pure and Applied Chemistry*, v. 70, p. 1129-1143.
- WHO, 2014, World cancer report, 2014: WHO Report. Geneva: WHO.
- WHO, 2015, WHO | Cancer, WHO, World Health Organization.
- Yang, J. M., and C. C. Chen, 2004, GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 55, p. 288-304.
- Yang, X., and E. Seto, 2007, HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention: *Oncogene*, v. 26, p. 5310-5318.
- Yang, X.-J., and E. Seto, 2008, The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men: *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 9, p. 206-218.

- Young, D. C., 2009, Computational drug design: a guide for computational and medicinal chemists, John Wiley & Sons.
- Zhang, L., H. Fang, and W. Xu, 2010, Strategies in developing promising histone deacetylase inhibitors: Medicinal research reviews, v. 30, p. 585-602.
- Zhang, S., 2011, Computer-aided drug discovery and development, Drug Design and Discovery, Springer, Volume 716 of the series Methods in Molecular Biology. Series ISSN 1064-3745 Publisher Humana Press, p. 23-38.

APÉNDICES

Apéndice A. Simulaciones de Dinámica Molecular

Las proteínas fueron obtenidas del *Protein Data Bank*. Los códigos PDB de las proteínas que se utilizaron en este proyecto son los siguientes:

Isoforma	Código PDB
HDAC2	<i>4LXZ</i>
HDAC4	<i>4CBT</i>
HDAC7	<i>3C0Z</i>
HDAC8	<i>4QA3</i>

Cada una de las proteínas presentaba errores estructurales. Los errores estructurales fueron corregidos, es decir que los residuos incompletos fueron reparados. Los residuos reparados de cada una de las isoformas son los siguientes:

Isoforma								
HDAC2	<i>Lys 13</i>							
HDAC4	<i>Arg 61</i>	<i>Thr 941</i>	<i>Leu 1005</i>					
HDAC7	<i>Arg 596</i>	<i>Lys 598</i>	<i>Arg 655</i>	<i>Lys 658</i>	<i>Lys 818</i>	<i>Arg 900</i>		
HDAC8	<i>Lys 33</i>	<i>Lys 36</i>	<i>Lys 52</i>	<i>Lys 60</i>	<i>Lys 81</i>	<i>Glu 85</i>	<i>Asp 101</i>	<i>Glu 658</i>

Las dimensiones de las cajas cúbicas hipotéticas donde se hicieron las simulaciones de Dinámica Molecular, el número de moléculas de agua contenidas en cada caja, el número de iones Sodio Na⁺ presentes en cada caja y el número de iones Cl⁻ presentes en cada caja fueron las siguientes:

Isoforma	Dimensiones	Moléculas de agua	Iones Na ⁺	Iones Cl ⁻
HDAC2	823 \AA^3	<i>16411</i>	<i>51</i>	<i>50</i>
HDAC4	893 \AA^3	<i>21634</i>	<i>69</i>	<i>61</i>
HDAC6	937 \AA^3	<i>24936</i>	<i>78</i>	<i>74</i>
HDAC8	818 \AA^3	<i>16057</i>	<i>56</i>	<i>49</i>

Una vez preparados los sistemas se corrieron simulaciones de DM de 15 nanosegundos para cada uno de los sistemas en original y dos réplicas con un tiempo promedio de 18.75 días para cada corrida. Todas las simulaciones fueron llevadas a cabo empleando los recursos de súper cómputo del

Laboratorio Nacional Guanajuato (CONACyT 123732), con el programa Gromacs versión 5.0.4 utilizando para cada sistema 16 procesadores AMD Opteron(tm) Processor 6378 a 2.4 GHz bajo la distribución GNU/Centos 6.9 Kernel 2.6.32-573.12.1.el6.x86_6.

El campo de fuerzas empleado fue el propuesto por Duan y colaboradores en 2003:

$$E_{\text{Total}} = \sum_{\text{Enlaces}} k_b(b-b_{\text{Eq}})^2 + \sum_{\text{Ángulos}} k_\theta(\theta-\theta_{\text{Eq}}) + \sum_{\text{Dihedrales}} [V_n/2][1+\cos(n\phi-\gamma)] \\ + \sum_{i<j} [A_{ij}/R_{ij}^{12} - B_{ij}/R_{ij}^6 + q_iq_j/\epsilon R_{ij}].$$

Donde k_b y k_θ son las constantes de fuerza para enlaces y ángulo de enlace respectivamente, b y θ son las longitudes de enlace y ángulo de enlace respectivamente, b_{Eq} y θ_{Eq} son las longitudes de enlace y ángulos de enlace en el equilibrio respectivamente, ϕ es el ángulo dihedral y V_n es la constante de fuerza correspondiente; los ángulos de fase γ tienen valores entre 0° y 180° . La parte que corresponde a los átomos no enlazados es un potencial representado por términos de van der Waals (A_{ij}) y de dispersión de London (B_{ij}) y las interacciones entre cargas atómicas (q_i y q_j) y ϵ es la constante dieléctrica.

Apéndice B. Acoplamiento Molecular *in silico*

Las proteínas fueron obtenidas del *Protein Data Bank*. Los códigos PDB de las proteínas que se utilizaron en este proyecto son los siguientes:

Isoforma	Código PDB
HDAC2	4LXZ
HDAC4	4CBT
HDAC7	3C0Z
HDAC8	4QA3

Cada una de las proteínas tenía un ligando co-cristalizado experimentalmente. Los ligandos co-cristalizados experimentalmente en las proteínas empleadas en este proyecto son los siguientes:

Isoforma	Ligando co-cristalizado
HDAC2	Ácido suberoilánilida hidroxámico, SAHA.

HDAC4	(1R,2R,3R)-2-[4-(5-fluoranylpirimidin-2-il)fenil]-N-oxidanil-3-fenil-ciclopropano-1-carboxamida.
HDAC7	N-hidroxiopropanamida
HDAC8	(2E,4E,6R)-7-[4-(Dimetilamino)fenil]-N-hidroxy-4,6-dimetil-7-oxo-2,4-heptadienamida, Tricostatin A, TSA.

La serie de acoplamientos moleculares se llevó a cabo utilizando los siguientes parametros para cada una de las isoformas seleccionadas:

Isoforma	Tamaño de malla	Radio de la esfera que delimita la zona de acoplamientos	Número máximo de iteraciones	Coordenadas del centro de la esfera para hacer los acoplamientos
HDAC2	0.2 Å	15 Å	10 000	-0.50, -35.31, -39.93
HDAC4	0.2 Å	15 Å	10 000	9.04, 5.55, 139.04
HDAC6	0.2 Å	15 Å	10 000	-36.48, -25.46, -19.43
HDAC8	0.2 Å	15 Å	10 000	-17.22, 0.54, -18.93

La función de evaluación empleada en este proyecto fue la propuesta originalmente por Gehlhaar y colaboradores en 1995 y extendida por Yang y colaboradores en 2004:

$$E_{\text{Evaluación}} = E_{\text{Interacciones Intermoleculares}} + E_{\text{Interacciones Intramoleculares}}$$

Donde:

$$E_{\text{Interacciones Intermoleculares}} = \sum_i \sum_j [E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 83 q_i q_j / r_{ij}^2]$$

y

$$E_{\text{Interacciones Intramoleculares}} = \sum_i \sum_j E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + \sum_{\text{Enlaces flexibles}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{\text{Choque}}$$

Donde $E_{\text{PLP}}(0) = A_0$, $E_{\text{PLP}}(R_1) = 0$, $E_{\text{PLP}}(R_2) = E_{\text{PLP}}(R_3) = A_1$ y $E_{\text{PLP}}(r) = 0$, para $r \geq R_4$ interpolado de manera lineal entre estos valores.

E_{PLP} es un potencial lineal a tramos que usa dos diferentes conjuntos de parámetros, uno para los enlaces de hidrógeno y otro para las interacciones estéricas. E_{PLP} es función únicamente de la distancia entre cada par de átomos, sin embargo existen factores de corrección para los enlaces de hidrógeno, que están en función del ángulo que existe entre el átomo al que está unido covalentemente el hidrógeno, el átomo de hidrógeno y el átomo con el que se forma el enlace de hidrógeno, la introducción de estos factores de corrección fue motivada por otros trabajos (McDonald and Thornton, 1994). El potencial lineal está definido a partir de los valores adoptados (ver **Tabla 1** **Tabla 1**. Parámetros del Potencial Lineal a Tramos, PLP.) del método para acoplamientos moleculares denominado GEMDOCK (Yang and Chen, 2004).

Tabla 11. Parámetros del Potencial Lineal a Tramos, PLP.

	A₀	A₁	R₁	R₂	R₃	R₄
Enlaces de hidrógeno	20.0	-2.5	2.3	2.6	3.1	3.6
Interacciones estéricas	20.0	-0.4	3.3	3.6	4.5	6.0

La suma del producto de las cargas corresponde a un potencial bajo la ley de Coulomb, donde q_i es la carga de cada uno los i átomos pesados de la molécula candidato a fármaco y q_j es la carga de cada uno de los j átomos pesados presentes en la región del acoplamiento y r_{ij} es la distancia entre cada i átomo y j átomo, para calcular la energía debida a las interacciones electrostáticas en las unidades requeridas, en este caso kilocalorías por mol y se calcula para $r \geq 2 \text{ \AA}$.