



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

---

## **Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa PI utilizando simulación numérica.**

P R E S E N T A:

**I.Q. MARIO RAYMUNDO HERNANDEZ**

Para obtener el Título de:

**MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

ASESORES DE TESIS

**Dr. Francisco Noé Mendoza Ambrosio**

**Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP-2618-065
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 15 de agosto de 2018

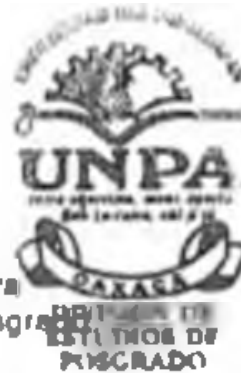
**L. P. YESENA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Biotecnología del **C. Mario Raymundo Hernández** matrícula 14140017, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima glutatión S-transferasa P1 utilizando simulación numérica" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes

Alientamiento

Atte. *[Firma]*  
San Juan Bautista, Oax., 15 de agosto de 2018



**Dra. Sandra T. del Moral Ventura**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Mario Raymundo Hernández  
C.c.p. Archivo



**CAMPUS TUXTEPEC**

C. Centro escolar No. 308, Cal. Playa Bismarck  
C.P. 6801, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(207)8719240

[www.unpa.mx](http://www.unpa.mx)

**CAMPUS LOMA BOMBA**

Av. Revolución N, Ciudad Universitaria  
C.P. 6800, Loma Bamba, Oax.  
Tel. 01(207)8719230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

UNPA | INP 2018 MHD52  
ANP/10 | Tercer asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 12 de marzo de 2018

**C. Mario Rufino Hernández**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores:

Dra. Leticia Navarro Moreno	UNPA	Presidenta
Dr. F. Noé Mendoza Ambrosio	UNPA	Secretario
Dra. María de Jesús E. Guzmán Porco	UNPA	Vocal
Dra. Alma Xochil Ávila Alzate	UNPA	1er Suplente
Dr. Guillermo Ramírez Cebal	UNPA	2º Suplente

En más por el momento le envío saludos cordiales



**Dra. Sandra Del Moral Ventura**  
Jefa de División de Estudios  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Atentamente

*sera aherrina, meci agerit  
Bou Lu-tama, chí jí jí*



**M. en C. Héctor López Agaña**  
Vice-rector Académico  
Vo. Bo. VICE-RECTORIA ACADÉMICA

C.c.p. Dr. F. Noé Mendoza Ambrosio – Director de tesis  
C.c.p. Dr. Yessica Barrios Arred – Jefa de Servicios Académicos

C.c.p. Arred

## **Agradecimientos**

**A CONACYT por haberme apoyado con la beca de estudios en el periodo 2014-2016.**

**A mi asesor de tesis Dr. Noé gracias por el tiempo y su paciencia.**

**A mi asesora de tesis a la Dra. Leticia, muchas gracias por su apoyo y por sus enseñanzas nunca voy a olvidar los buenos momentos en el laboratorio de bioquímica, usted es una gran persona y la estimo mucho.**

**Al Dr. Guillermo, gracias por sus consejos y enseñanzas, es una gran persona.**

**A mis padres Carlos y Rosalia y mis hermanas Karla y Lupita por siempre apoyarme en cada proyecto que deseo emprender, ellos son mi motor para salir adelante.**

**A mi novia por apoyarme en todo momento Narelle tu ocupas un lugar especial en mi corazón.**

**A mis amigos y compañeros de la universidad, por apoyarme en todo momento con cualquier duda de Bioquímica, principalmente a mis amigos Abad y Gustavo.**

**A Dios por haberme brindado buena salud y estar conmigo en las buenas y en las malas y sobre todo darme los ánimos necesarios en todo momento.**

## INDICE.

INTRODUCCIÓN.....	1
EL PLOMO.....	2
CONTAMINACIÓN CON PLOMO.....	2
ABSORCIÓN Y EXCRECIÓN DEL PLOMO.....	3
DAÑOS POR PLOMO EN EL ORGANISMO.....	4
CONTAMINACIÓN CON PLOMO EN MÉXICO.....	4
RELACIÓN ENTRE LA INTOXICACIÓN CON PLOMO Y DAÑO RENAL EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN.....	6
EL CASO DE TIERRA BLANCA, VERACRUZ.....	6
BIOMARCADORES.....	7
GLUTATION S-TRANSFERASA.....	8
EFECTO DE LOS METALES PESADOS EN LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA.....	12
RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GLUTATION S- TRANSFERASA Y EL CÁNCER GÁSTRICO.....	13
BASE DE DATOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS: THE PROTEIN DATA BANK.....	15
MECANICA MOLECULAR.....	17
CÁLCULO DE ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN PROTEÍNA-LIGANDO.....	18
Funciones de <i>Scoring</i> .....	19
Función de <i>Scoring</i> de AUTODOCK.....	19
DINÁMICA MOLECULAR.....	20
MECANICA CLASÍCA.....	20
POTENCIALES INTRAMOLECULARES.....	21
Distancias de enlace.....	21
Ángulos de enlace.....	22
Ángulo de torsión.....	22
POTENCIALES INTERMOLECULARES.....	23
POTENCIAL DE LENNARD JONES.....	23
POTENCIAL DE COULOMB.....	23
ALGORITMOS DE MOVIMIENTO.....	23
CONDICIONES DE CONTORNO PERIÓDICAS.....	25
LISTA DE VECINOS O LISTA DE VERLET.....	26
DINÁMICA MOLECULAR EN DIFERENTES ENSAMBLES.....	28
DINÁMICA MOLECULAR A NVE CONSTANTE.....	28

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

<b>DINÁMICA MOLECULAR A NVT CONSTANTE</b> .....	28
<b>DINÁMICA MOLECULAR A NPT CONSTANTE</b> .....	30
<b>ANTECEDENTES</b> .....	31
<b>ANTECEDENTES EXPERIMENTALES</b> .....	32
<b>ANTECEDENTES COMPUTACIONALES</b> .....	35
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	38
<b>HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>GENERAL</b> .....	43
<b>ESPECIFICOS</b> .....	43
<b>METODOLOGÍA</b> .....	45
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	46
<b>METODOLOGÍA COMPUTACIONAL</b> .....	47
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	50
<b>ENSAYOS EXPERIMENTALES in vitro.</b> .....	51
<b>Efecto de la variaci6n del pH sobre la actividad de GST.</b> .....	51
<b>Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a diferentes temperaturas de incubaci6n.</b> .....	53
<b>Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a diferentes concentraciones de iones fosfatos.</b> .....	54
<b>Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal incubados con una concentraci6n de 0.05 M de acetato de plomo.</b> .....	56
<b>Efecto de la incubaci6n de la enzima GST con una concentraci6n final 1 M de acetato de plomo.</b> .....	57
<b>Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal incubando al glutati6n reducido (GSH) por 5 min con acetato de plomo.</b> .....	59
<b>Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a pH 1.</b> .....	61
<b>RESULTADOS COMPUTACIONALES. SISTEMA IN SILICO.</b> .....	62
<b>Acoplamiento molecular.</b> .....	62
<b>DINAMICA MOLECULAR</b> .....	65
<b>ANÁLISIS DE LA GST P1 EN AGUA.</b> .....	65
<b>ANÁLISIS DE LA GST P1 CON GSH</b> .....	69
<b>Calculo del potencial electrostático de la GST P1 con glutati6n reducido.</b> .....	73
<b>ANÁLISIS DE LA GST P1 CON DNCB.</b> .....	75
<b>Cálculo del potencial electrostático de la GST P1 con el DNCB.</b> .....	78
<b>ANÁLISIS DE LA GST P1 CON GDN</b> .....	80
<b>Calculo del potencial electrostático de la GST P1 con el GDN.</b> .....	82
<b>Dinámica molecular de plomo con glutati6n reducido (GSH).</b> .....	84
<b>Radio de giro de la GST P1 con el Pb.</b> .....	85
<b>Desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de la proteína con plomo.</b> .....	86

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

<b>Calculo de potencial electrostático</b> .....	89
<b>Distancia mínima entre el Pb y la proteína</b> .....	90
CONCLUSIONES .....	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

# INTRODUCCIÓN

## **EL PLOMO.**

El plomo es un metal pesado que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza sin embargo no es esencial para los seres vivos ya que no posee ninguna funci6n metab6lica. Debido a sus caracteristicas f6sicas y qu6micas ha formado parte esencial en la vida diaria de los seres humanos. Bastar6a con realizar una b6squeda a lo largo de las diferentes etapas en la vida del hombre para comprobar que este elemento ha sido utilizado por la mayor6a de las civilizaciones desde tiempos anteriores a la era cristiana (Aguilar, 1996; Chang, 1996).

La contaminaci6n por plomo (Pb), ha sido y sigue constituyendo uno de los principales problemas de salud p6blica, no tan solo en los pa6ses en v6as de desarrollo, sino tambi6n en los pa6ses del primer mundo (Meneses, 2003).

## **CONTAMINACI6N CON PLOMO.**

Se han identificado diversas fuentes de exposici6n al plomo como la natural y la antropog6nica. Esta 6ltima depende del uso excesivo que el humano ha hecho de este elemento al aprovechar las propiedades del mismo. Debido a la alta actividad humana hoy en d6a se pueden citar como las fuentes m6s importantes de exposici6n las siguientes: el plomo acumulado en el suelo, especialmente en las 6reas de fundiciones de metales, minas y reciclaje de bater6as; el agua y algunos alimentos dentro de los hogares y sobre todo el mal manejo de los residuos generados por su uso en muchas de las actividades que el hombre ha constituido a partir de su descubrimiento (Jim6nez, 1993).

Varios estudios sobre metales pesados, incluidos los realizados por el grupo de Canfiel (2003) y Bellinger (1994) sugieren que no existen l6mites m6nimos seguros de exposici6n al metal, ya que se han observado da6os a la salud en individuos que presentan diferentes concentraciones de plomo en sangre. De esta manera en 1960 el "nivel seguro de plomo en sangre" se estableci6 como 60 microgramos/dL; en 1970 fue de 40 y desde 1990 se determin6 como nivel m6nimo permitido de plomo en sangre el de 10 microgramos/dL. Los mismos autores detectaron efectos neurot6xicos a niveles mayores a los 10 microgramos/dL.

A nivel renal se ha establecido que a mayor carga corporal de plomo puede existir mayor da1o, lo que podr3a confirmar una posible relaci6n de da1o dependiente de la dosis (Bellinger, 1994). Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que personas con carga corporal de plomo mayor a los niveles permitidos pueden no presentar da1os fisiol6gicos aparentes en comparaci6n con personas que han mostrado da1os fisiol6gicos severos y presentan concentraciones menores de plomo a las consideradas no t6xicas (Mountain, 1963; Calder6n, 1996; Brieger, 2005).

## **ABSORCI6N Y EXCRECI6N DEL PLOMO.**

El organismo absorbe diversos compuestos org3nicos e inorg3nicos de plomo principalmente por las v3as respiratoria y gastrointestinal. El plomo metilado tambi6n se absorbe por piel. La v3a m3s importante de absorci6n desde el punto de vista ocupacional es la respiratoria pero debido a su toxicodin3mica, este elemento entra en contacto con la circulaci6n sangu3nea. Se sabe que el metal presenta gran afinidad por las membranas de los eritrocitos, por lo que el 95% de la fracci6n circulante de plomo se une a ellos, dando como resultado que su toxicidad se convierta en un fen6meno sist6mico, el cual involucrar3 a la gran mayor3a de los 6rganos de los organismos expuestos a este xenobi6tico (Ellehorn, 1996).

La extracci6n del plomo del subsuelo (minas) y las emisiones de las fundiciones afectan tanto a ni1os como a adultos. La ingesti6n de polvo, alimentos, agua o alcohol contaminados con el metal constituyen la forma m3s com6n de ingreso del plomo al organismo. Los ni1os absorben una proporci6n mayor que los adultos. La inhalaci6n constituye la v3a de ingreso m3s com6n en personas que laboran en industrias mineras, metal6rgicas, automotrices y refiner3as (Ram3rez, 2005).

La mayor parte del plomo que ingresa al cuerpo es excretada v3a renal por la orina o v3a enterohep3tica a trav3s de la bilis por las heces. La forma m3s com6n de plomo (la no metilada) no es metabolizada en el h3gado; mientras que el plomo metilado ingerido (presente en aditivos de la gasolina) se absorbe casi en su totalidad y si es metabolizado en el h3gado (Reyes, 1999).

## **DAÑOS POR PLOMO EN EL ORGANISMO.**

Cuando el plomo entra a los organismos es capaz de afectar células, tejidos, órganos y sistemas. Al ingresar a las células, el metal en estado iónico ( $Pb^{2+}$ ) interactúa con proteínas que poseen grupos sulfhidrilos, aminas, fosfatos y grupos carboxilo. Además, se ha reportado interacción con macromoléculas que poseen grupos con carga negativa como lípidos y ácidos nucleicos (Okhi, 1991).

Entre los daños sistémicos que puede ocasionar la exposición a plomo se pueden mencionar los siguientes.

- a) En mujeres embarazadas con niveles elevados de plomo en sangre (mayores a 10 mg/dL) existe un riesgo mayor de partos prematuros, abortos espontáneos y muertes fetales.
- b) Niños expuestos al metal presentan problemas en su desarrollo fisiológico, daños en el sistema renal, mismos que se presentan como disfunción del túbulo contorneado proximal conocido como síndrome de Fanconi.
- c) Daño al sistema neurológico provocando cefaleas y la alteración en el nivel de aprendizaje (Needleman, 1992, Chang, 1996).

## **CONTAMINACIÓN CON PLOMO EN MÉXICO.**

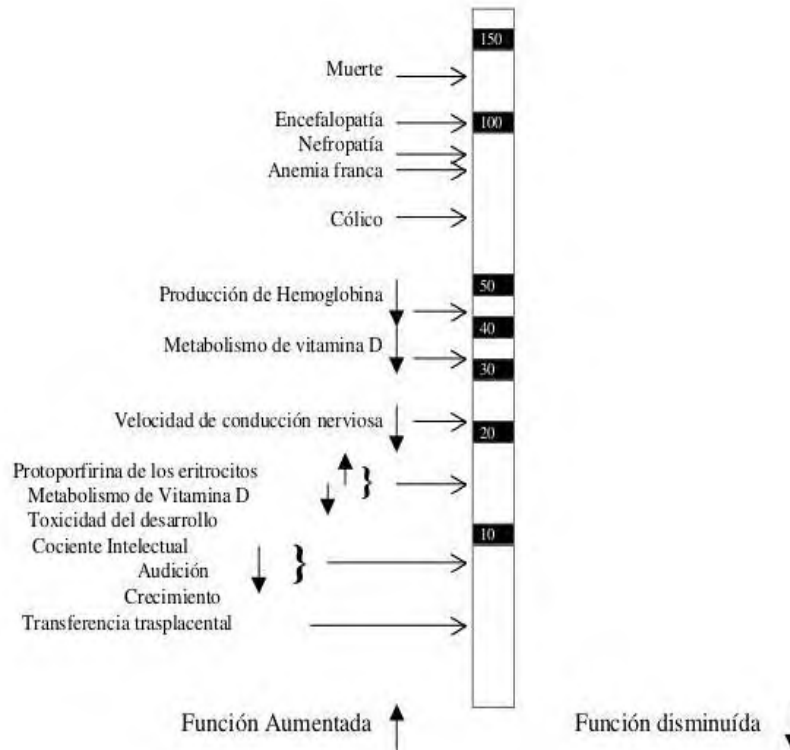
Recientemente, se han observado diversos casos de envenenamiento por metales pesados entre la población infantil de la región Norte-Centro de México específicamente en Torreón, Coahuila. Este problema ha sido estudiado y denunciado desde hace más de veinte años por instituciones y grupos ambientalistas, sin embargo, el problema si bien no ha sido solucionado, sigue en aumento y de manera lamentable se está propagando a estados de la república que no cuentan con un nivel industrial alto como es el caso del estado de Oaxaca. El problema de la Ciudad de Torreón ha sido provocado por la contaminación con plomo, cadmio y arsénico; El daño a la población se debe principalmente a las industrias fundidoras cercanas a la región (Dalton, 1999).

Los niños de corta edad son especialmente vulnerables a los efectos tóxicos del plomo. En ellos la exposición al metal puede generar consecuencias graves y

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

permanentes en su salud, afectando en particular al desarrollo del cerebro y del sistema nervioso (Salud Publica, 1995).

La Figura 1 muestra el daño asociado a concentraciones crecientes de plomo en sangre en niños. El autor indica que a niveles mayores de 100 mg/dl los niños podrían llegar a morir. Sin embargo, lo anterior no resulta del todo una afirmación que se cumpla en todos los casos ya que la susceptibilidad individual juega un papel fundamental dentro del fenómeno de la intoxicación por plomo en los seres humanos (Calderón, 2013).



**Figura 1.** Efectos de la exposición a plomo en niños, en función de la concentración del elemento en sangre (modificado de Dalton, 1991)

Un estudio comparativo de exposición en la población general realizado en los años 1981 y 1983 en los países Bélgica, Malta, México y Suecia demostró que los valores medios de concentración de plomo en sangre en los cuatro países fueron distintos en función con la región y el año de cuantificación. Los autores concluyeron que las fuentes de exposición más importantes fueron los alimentos y el aire contaminados. (Centro Panamericano de Ecología Humana, 1989).

## **RELACI6N ENTRE LA INTOXICACI6N CON PLOMO Y DAÑO RENAL EN LA CUENCA DEL PAPALOAPAN.**

### **EL CASO DE TIERRA BLANCA, VERACRUZ.**

Hace 10 a6os se detect6 el aumento en el n6mero de casos de insuficiencia renal terminal (IRT) en ni6os y j6venes del municipio de Tierra Blanca, Veracruz, que es una poblaci6n muy cercana al Distrito Tuxtepec en el estado de Oaxaca, lo que lo convierte en un caso muy importante de estudiar ya que muchas de las costumbres de vida y fuentes de trabajo son compartidas entre las dos localidades.

Los datos preliminares indicaron la existencia de 3 a 4 casos en menores de edad en comunidades de mil habitantes (Mendoza, 2013). La mayoría de los pacientes con IRT presentaron un promedio de vida poco mayor de un a6o. Este problema de salud renal podría ser, muy posiblemente, de origen ambiental y estar relacionado con la gran cantidad de agentes t6xicos provenientes de las zonas industriales de varias ciudades contiguas, quienes liberan sus desechos en el Rio blanco, mismo que desemboca al Rio tonto, el cual a su vez llega al Rio Papaloapan, constituyendo el agua como el vehículo por el cual los contaminantes pueden llegar a los seres vivos. Un estudio realizado en la Universidad del Papaloapan revel6 la existencia de metales pesados (plomo, cadmio y cromo) en las aguas del rio Papaloapan en la zona que atraviesa la regi6n centro de Tuxtepec, Oaxaca (Galicía, 2014).

Resulta casi imposible se6alar una sola causa del problema, sin embargo, se puede afirmar que el problema de la IRT puede ser provocado por la contaminaci6n por metales pesados, entre ellos el plomo. En el Rio Blanco se han identificado muchos metales pesados desechados por las industrias de C6rdoba y Orizaba, pero por la falta de recursos hospitalarios y la falta de recursos clínicos para identificar el problema estos casos no se han podido erradicar por completo en la zona (Mendoza, 2013).

Los da6os por plomo generan alteraciones celulares, sin embargo, se carece de herramientas bioquímicas certeras para la detecci6n de da6o renal ocasionado por

exposición a metales pesados como el plomo. Existen reportes de bioindicadores de daño por diferentes xenobióticos. En el caso de la intoxicación renal por plomo, se ha propuesto que la enzima Glutación S-Transferasa (GST) podría constituir un posible indicador de daño por este metal debido a que se corroboró una relación entre exposición a plomo, aumento en especies reactivas de oxígeno (EROs) y el incremento en la actividad de la GST en riñón, además de una correlación directa entre la actividad de la enzima en suero y orina con la actividad de GST en riñón (Navarro, 1997; Hernández, 2013, 2015).

## **BIOMARCADORES.**

El término biomarcador se utiliza para medir la interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico ya sea interno o externo. Dicha interacción es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad (Ramírez, 2006).

Los biomarcadores se encuentran diferenciados en tres tipos: a) de Exposición, el cual evalúa en un organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana; b) de Efecto, que valora la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo que puede ser asociada con una enfermedad y c) de Susceptibilidad, que indica la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica (Arango, 2006).

Los factores que requieren ser considerados en proceso de selección y validación del biomarcador de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud se enumeran a continuación (WHO- ICPS, 1993; Arango, 2012).

- 1) Identificación y definición del proceso biológico de interés.
- 2) Estudios previos de la relación entre el agente de exposición, el biomarcador y el efecto a evaluar (estudios *in vitro*, en humanos y otros organismos).

- 3) Identificación de la variable a cuantificar, para evaluar la sensibilidad y especificidad del marcador en relación con la exposición.
- 4) Selección de exámenes disponibles para el análisis, confiabilidad de la integridad de la muestra entre la recolección y el análisis.
- 5) Revisión de los procedimientos analíticos disponibles para la cuantificación del marcador y sus limitaciones con respecto a la detección, sensibilidad, precisión y exactitud.
- 6) Estandarización de un protocolo que garantice un adecuado nivel de calidad y control.
- 7) Evaluación de la variación intra e interindividual de una población no expuesta.
- 8) Análisis de datos para establecer la relación dosis-efecto y dosis-respuesta y su variación teniendo en cuenta la susceptibilidad individual.
- 9) Predicción del riesgo para la salud humana de la población en general o del subgrupo.
- 10) Revisión de consideraciones éticas y sociales.

De acuerdo con lo mencionado en el párrafo anterior, la enzima Glutación S-transferasa (GST) podría considerarse como un biomarcador de Efecto, por lo cual su uso nos ayudaría a detectar el daño debido a la presencia de plomo en el riñón. A continuación, se mencionan las generalidades de la enzima y algunos casos en los cuales se ha relacionado como bioindicador en diferentes procesos patológicos.

## **GLUTATION S-TRANSFERASA.**

La Glutación S-transferasa pertenece a una familia de enzimas cuya importancia se relaciona con los mecanismos de desintoxicación celular, y que tienen como función principal la de eliminar sustancias endógenas (metabolitos) y sustancias exógenas (xenobióticos). Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutati6n reducido ( $\gamma$ -glutamylcisteinylglycine; GSH) sobre el centro electrofílico de un gran n6mero sustratos (Wang, 1993). La reacci6n general involucra la formaci6n

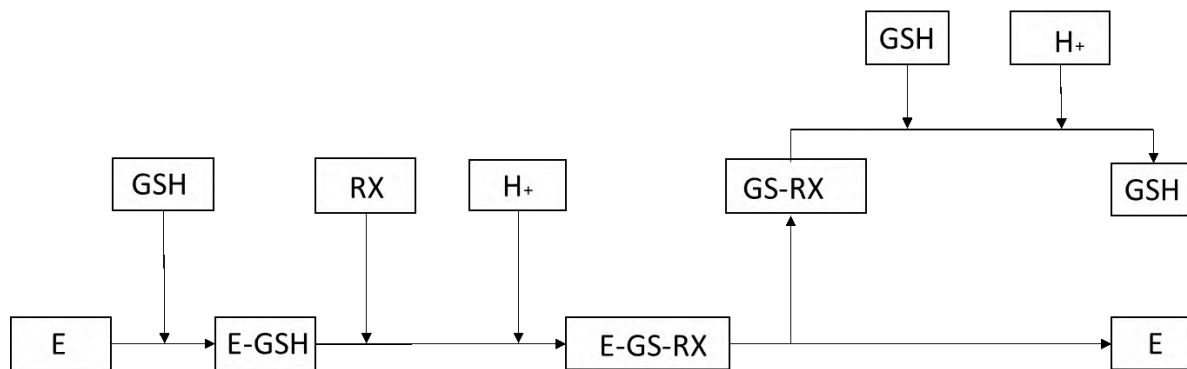
# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

de un complejo ternario, el cual se hidroliza regenerando la enzima a su estado inicial y eliminando el complejo glutati6n-xenobi6tico (Armstrong, 1992).

Tomando en cuenta la literatura relacionada con la reacci6n general catalizada por este grupo de enzimas, se podr3a establecer una posible secuencia de pasos que la enzima puede realizar para eliminar ya sea metabolitos o xenobi6ticos.

Esta propuesta se plantea a continuaci6n y podr3a corresponder a un mecanismo enzimático tipo ping-pong (propuesta elaborada por el grupo de investigaci6n de la Dra. Leticia Guadalupe Navarro Moreno, en estudio y no publicado).



Donde:

E representa a la enzima GST P1

GSH representa al glutati6n reducido.

E-GSH representa al complejo enzima-glutati6n

RX representa un compuesto electrof3lico (metabolito o xenobi6tico).

E-GS-RX representa el complejo ternario enzima-glutati6n-xenobi6tico.

En mam3feros estas isoenzimas existen como homod3meros o como heterod3meros; poseen una masa molecular aproximada de 25 kDa por subunidad y un sitio activo por mon6mero. Se clasifican en siete familias (alpha, kappa, mu, pi, sigma, theta y zeta) que se diferencian tanto en su secuencia, propiedades inmunol6gicas y papel fisiol6gico en funci6n de la especie y del 6rgano en el que se localicen (Wang, 1993).

Las enzimas de la familia GST se clasifican en citos6licas, mitocondriales y

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

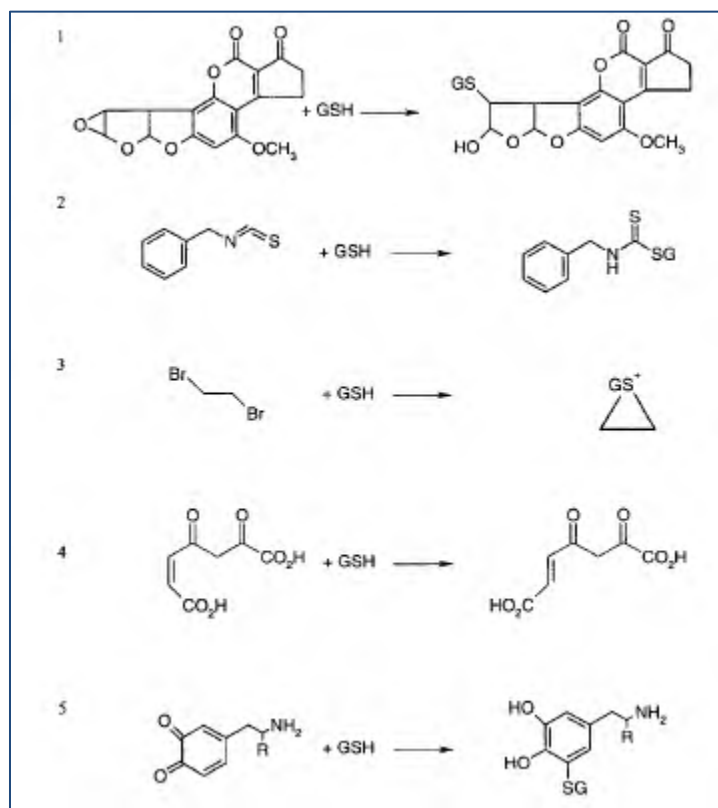
---

microsomales. Independientemente de la clasificación las diferentes isoformas e isoenzimas, todas tienen la capacidad de unir diferentes compuestos xenobióticos al glutatión incluyendo aflatoxinas, epóxidos, tiocianatos y quinonas llevando a cabo posiblemente el mecanismo anterior. En la Figura 2 se muestran diferentes compuestos endógenos unidos al glutatión por acción de las enzimas de la familia GST. La Tabla 1 indica algunos de los sustratos endógenos y exógenos y las clases de GST que los unen al glutatión (Serrat,2002). Entre ellos se encuentra el compuesto 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) que se utiliza en la determinación de la actividad total de la enzima. Debido a que la mayoría de las enzimas pueden unir este compuesto, la medición de la actividad se realiza empleando una técnica general de determinación de la actividad enzimática, utilizada por la mayoría de los investigadores que estudian esta enzima.

Estas enzimas también participan dentro del metabolismo celular catalizando otras reacciones diferentes a las del metabolismo de los xenobióticos. Tienen actividades peroxidasa e isomerasa, y son capaces de unirse-catalíticamente a una amplia gama de sustratos endógenos y ligandos exógenos (Serrat, 2002).

Entre las isoenzimas de GST que participan dentro del metabolismo anabólico se encuentran las pertenecientes a la superfamilia MAPEG (Membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) que actúan como sintasas de prostaglandina E2 y leucotrieno C4. Participando dentro de la formación de mediadores de los procesos de inflamación e hipertensión. GST  $\alpha$  cataliza la síntesis de prostaglandinas F2 $\alpha$ . La clase  $\delta$  se conoce como sintetasa de prostaglandina D2 dependiente de glutatión. Las clases  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\pi$  catalizan la conjugación de prostaglandinas A2 y J2 con glutatión. De esta manera son eliminadas de la célula a través del transportador MRP, regulando, de esta manera, la vida media de algunos prostanoides dentro de la célula (Serrat, 2002).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutathión S-Transferasa P1



**Figura 2.** Conjugación del glutathión a 1) Aflatoxina B1-8,9-epóxido, 2) bencilisotiocianato, 3) dibromoetano, 4) maleilacetoacetato, 5) o-quinina (Tomado de Armstrong, 1991).

**Tabla 1.** Sustratos unidos a glutathión por algunas de las enzimas pertenecientes a las clases alfa, mu, pi, sigma, teta, zeta, omega, kapa y microsomal (Adaptado de Serrat, 2002).

Clase	Enzima	Sustratos
Alfa	GST A1-1	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); 7-cloro-4-nitrobenceno-2-oxo-1,3-diazol; $\Delta^5$ -androstreno-3,17-diona
	GST A2-2	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); 7-cloro-4-nitrobenceno-2-oxo-1,3-diazol; cumenohidropeóxido.
	GST A3-3	No determinado.
	GST A4-4	Ácido etacrínico; 4-hidroxinonenal; 4-hidroxidecenal
Mu	GSTM1-1	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); trans-4-fenil-3-buten-2-ona; aflatoxina B1-epóxido; óxido de trans-estilbeno.
	GSTM2-2	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); 1,2-dicloro-4-nitrobenceno; aminocromo.
	GSTM3-3	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); peróxido de hidrógeno.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

	GSTM4-4 GSTM5-5	No determinado. 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB).
Pi	GSTP1-1	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); acroleína, adenina propenal, bencilisotiocianato; ácido etacrínico.
Sigma	GSTS1-1	Prostaglandina D2 sintasa
Teta	GSTT1-1 GSTT2-2	1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano; diclorometano; dibromoetano. 1-menaftilsulfato; cumeno hidroperóxido.
Zeta	GSTZ1-1	Dicloroacetato, fluoroacetato; maleilacetato.
Omega	GSTO1-1	Tioltransferasa, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); 7-cloro-4-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol
Kapa	GSTK1-1	No determinado
Microsomal	MGST-1 MGST-1-1 MGST-2 MGST-3	1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); 7-cloro-4-nitrobenceno-2-oxo-1,3-diazol, cloruro de 4-nitrobeno; cumeno hidroperóxido Prostaglandina E2 sintasa 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB); leucotrieno c4 sintasa; 5-HPETE Leucotrieno C4 sintasa, 5-HPETE

## EFFECTO DE LOS METALES PESADOS EN LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA.

Se han realizado investigaciones consistentes en exponer algunas enzimas a diferentes metales pesados y se ha observado la inhibición de la actividad enzimática. En bacterias se ha detectado la inhibición de la actividad de la enzima GSTP1 en presencia de mercurio (Goodrich.2012).

En riñón las formas predominantes de la GST son alfa, mu y pi, las cuales juegan un papel importante dentro de la fisiología de este órgano y cuya actividad es alterada bajo ciertas patologías renales o por intoxicación con metales pesados. Algunos autores han encontrado una relación directamente proporcional entre la intoxicación con plomo o con mercurio (aguda o crónica) y las vías de administración (oral e intraperitoneal) con la generación de estrés oxidativo y el aumento de la actividad de la GST renal (Caccuri, 1999; Hernandez, 2013) (Mendez, 2016) (Cruz, 2016).

En animales expuestos, de manera aguda, a plomo se ha observado una relación

entre la distribución celular de las enzimas GST A1, GST A2, GST A3, GST A4, GST M1, GST M2 y GST P1 en riñón y en hígado siendo este fenómeno independiente del estrés oxidativo (Dagget, 1998). Por otro lado, empleando una intoxicación crónica con altos niveles de plomo se reportó un incremento en las isoformas Yb1 y Yp de riñón (Moser, 1995). De la misma manera experimentos realizados empleando una intoxicación aguda con plomo mostraron el aumento del RNAm de las clases Ya1, Ya2 y Yc en riñón, pero una disminución en hígado, indicando que el efecto de la intoxicación con plomo es dependiente del órgano afectado (Dagget, 1997).

Lo anterior demuestra que, si bien se ha iniciado el estudio del efecto de la intoxicación con metales pesados sobre la actividad y/o la expresión de las diferentes isoenzimas de GST, aún es necesario realizar mucho trabajo de investigación que nos ayude a entender la posible relación entre la exposición a plomo y su efecto en la GST renal, para poder así proponerla como un bioindicador de efecto. Relacionado con lo anterior, Hernández en 2015 reportó una relación directa entre el aumento de las especies reactivas de oxígeno y el aumento de la actividad de GST en riñón de ratas macho expuestas de forma aguda a plomo. Sin embargo, varios trabajos han relacionado la actividad de esta enzima con ciertas patologías como el cáncer. Por esta razón a continuación se describen algunos trabajos en los cuales se ha relacionado la actividad de GST y el cáncer.

## **RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD Y LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA Y EL CÁNCER GÁSTRICO.**

Actualmente las principales enzimas conocidas involucradas en el metabolismo de sustancias cancerígenas pertenecen a las familias citocromo P 450 y Glutación S-transferasa. Estas participan en la activación y desintoxicación de sustancias que podrían actuar como factores de riesgo o de protección de cáncer gástrico. (Lang y Pelkonen 1999). Los individuos que portan la forma más activa de la GST relacionada con la activación de los carcinógenos, o los alelos menos eficientes de

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

las enzimas de desintoxicaci6n, podrían presentar un mayor riesgo de desarrollar c6ncer (Krajinovic et al. 1999).

La familia de enzimas GST tambi6n est6 involucrada en la respuesta al estr6s, la oncog6nesis, la progresi6n de tumores, resistencia a f6rmacos, la biosíntesis y el metabolismo de las prostaglandinas, esteroides, y los leucotrienos. M6s recientemente, tambi6n se han encontrado isoenzimas GST capaces de modular las vías de seálizaci6n celular que controlan la proliferaci6n y la muerte celular.

Muchos estudios han demostrado que los polimorfismos de las diferentes familias de GST est6n asociados con diferentes tipos de c6ncer (Strange,1998). En 2012 se report6 una posible relaci6n entre algunas isoformas de GST (GST M1 y GST T1) en pacientes con insuficiencia renal (Akgul, 2012). Se ha reportado la existencia de variaciones de la enzima en casos de hepatocarcinoma en humanos, indicando la implicaci6n de diversos polimorfismos gen6ticos (White, 2007). Se ha implicado a la GST M2 en posibles casos de c6ncer de colon, en donde la actividad de esta enzima se ve incrementada (Ebert, 2003). De la misma manera se ha observado un aumento en la actividad de la GST M1 en casos de c6ncer cervical (Liu, 2012).

Todo lo escrito anteriormente demuestra la importancia de esta proteína en la salud y a su vez la complejidad y la importancia que representa el estudio de esta enzima.

Existen dos maneras de estudiar a las proteínas y a las enzimas. La primera es mediante la experimentaci6n con modelos animales o, como en el caso de la GST, con humanos, como se ha descrito en la parte anterior de este trabajo. La segunda forma se relaciona con estudios computacionales que incluyen simulaciones, alineamientos o acoplamientos gen6ticos, cuya finalidad es llevar a cabo un estudio te6rico molecular del comportamiento de las estructuras biol6gicas.

Actualmente se cuenta con un n6mero considerable de m6todos computacionales y bases de datos que ayudan al estudio te6rico de las proteínas, entre los que se encuentran los programas de visualizaci6n de proteínas como VMD (Visual Molecular Dynamics) y PyMol, que presentan característicasy que ayudan a estudiar

el comportamiento estructural de las proteínas solas o realizando interacciones con otras moléculas.

A continuación, se describen tanto la base de datos como los procesos de simulación molecular usados en este trabajo.

## **BASE DE DATOS ESTRUCTURALES DE PROTEÍNAS: THE PROTEIN DATA BANK**

La base de datos de la estructura de las proteínas también llamado Proteín Data Bank (PDB), contiene los archivos de la posición de cada átomo en las coordenadas tridimensionales que conforman una proteína. Este archivo de coordenadas no solo considera el esqueleto de la proteína sino todas aquellas moléculas con las que se haya resuelto en conjunto la estructura de la misma, por ejemplo, los grupos prostéticos de algunas hemo-proteínas, inclusive las moléculas del solvente que están unidos a las proteínas también aparecen. Esta información es utilizada por algunos programas tales como RasMol, PyMol y VMD. La información que está contenida en este tipo de archivos, proviene de la estructura tridimensional de proteínas obtenidas hasta la fecha mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN).

Hoy en día la base de datos Protein Data Bank no solo contiene la colección de la estructura tridimensional de proteínas, sino además información estructural de ácidos nucleicos, carbohidratos y una variedad de complejos de macromoléculas o modelos estructurales creadas por otras técnicas biofísicas.

Es importante conocer algunas características básicas de este tipo de archivo, porque en ocasiones es necesario editar los archivos a través de cualquier programa editor de textos o recurrir a la información contenida en el archivo, previo a realizar el análisis de la estructura. Por ejemplo, cuando se inicia el análisis de la estructura de una proteína es fundamental conocer si la estructura fue resultada en ausencia o presencia de ligandos, algún cosolvente o crioprotector

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

ya que estas mol6culas pueden interactuar con las prote6nas y modificar algunos detalles de la estructura.

A continuaci6n, se describe la informaci6n b6sica que contiene el archivo PDB que se denota con una palabra clave en ingles seguido de la explicaci6n. (Gonz6lez, 2005)

- ✚ Encabezado (HEADER), que se refiere al n6mero de identificaci6n de cada estructura, este n6mero est6 compuesto de cuatro d6gitos, el primero es un n6mero y los siguientes tres suelen ser letras por ejemplo 2LAO. Tambi6n contiene la fecha de dep6sito de la estructura en el banco de datos.
- ✚ T6tulo (TITLE), contiene informaci6n 6nica de la biomol6cula o condiciones de la experimentaci6n.
- ✚ Nombre (CMPND), incluye el nombre com6n de la mol6cula.
- ✚ Fuente de obtenci6n de la mol6cula (SOURCE), se refiere al origen ya sea qu6mico o biol6gico de la mol6cula, por ejemplo, si proviene de un organismo recombinante.
- ✚ Referencia de publicaci6n (JRNL), contiene la cita original donde se describe la estructura depositada en la base de datos.
- ✚ Cometarios libres de los autores del trabajo (REMARK).
- ✚ Secuencia primaria de la prote6na (SEQRES), la secuencia se indica en el c6digo de tres letras
- ✚ Hetero6tomos (HET), nombre de los residuos de 6tomos no comunes en las prote6nas por ejemplo los grupos prost6ticos, o los ligandos que se unen a las prote6nas.
- ✚ F6rmula qu6mica de los hetero6tomos (FORMUL).
- ✚ Localizaci6n de los residuos con estructura secundaria tipo h6lice\_ (HELIX).
- ✚ Localizaci6n de los residuos con estructura secundaria tipo hebras beta (SHEET).
- ✚ Localizaci6n y existencia de enlaces disulfuro (SSBOND).
- ✚ Coordenadas at6micas que corresponden a la prote6na (ATOM).

- ✚ Coordinadas atómicas de los residuos que no corresponden a la proteína se denominan heteroátomos (HETEROATOM).

## MECANICA MOLECULAR

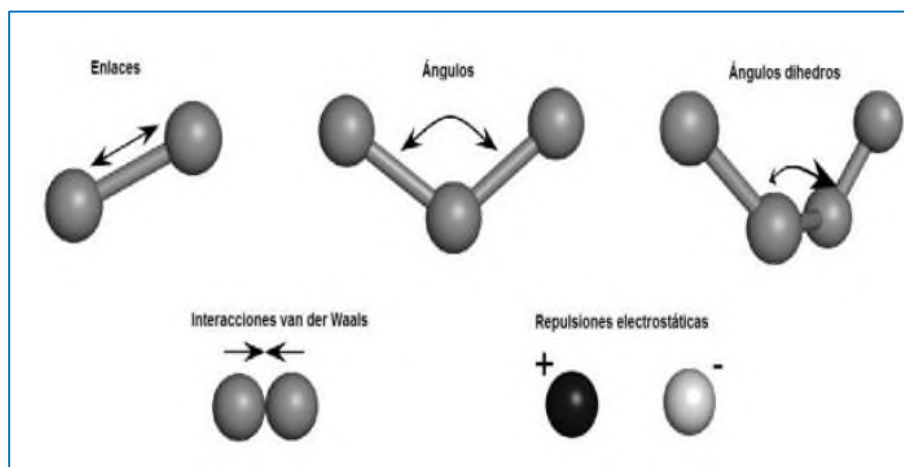
Claude Cohen menciona que la mecánica molecular es el “*Conjunto de técnicas informáticas basadas en los métodos de química teórica y en los datos experimentales que pueden ser usados para analizar las moléculas o sistemas moleculares y/o para predecir las propiedades moleculares y biológicas*”. (Cohen, 1973) El objetivo de la mecánica molecular es la caracterización completa de compuestos, obteniéndose los valores de sus propiedades dependientes de su estructura 3D, que resulten de interés para el estudio que se esté realizando, de manera objetiva, rápida y adecuada. Los cálculos de mecánica molecular requieren tiempos considerablemente menores que los mecánico-cuánticos, se pueden aplicar a compuestos de mayor magnitud y complejidad y reproducen los valores experimentales referentes a geometrías y energías con buena precisión.

La idea central de la mecánica molecular es que los enlaces poseen valores de longitudes y ángulos ideales o naturales, los cuales van a condicionar la geometría molecular y utilizan un conjunto de ecuaciones para reproducir la superficie de energía potencial. A este conjunto de ecuaciones, cuya forma matemática deriva de la mecánica clásica, se denomina *campo de fuerzas* y contiene un conjunto de parámetros ajustables, optimizados de forma que se obtenga la mejor concordancia posible entre las propiedades moleculares.

Puesto que la mecánica molecular sólo considera el movimiento nuclear, prescindiendo de los electrones, una molécula se puede representar mediante un

modelo mecánico como un conjunto de masas (los átomos) unidas (a través de los enlaces) por fuerzas armónicas o elásticas.

Estas funciones se pueden describir como funciones de energía potencial de los parámetros estructurales tales como longitudes, ángulos de enlace, ángulos diedros, interacciones no enlazantes, etc. La combinación de las funciones de energía potencial representa el campo de fuerzas y la energía  $E$ , de la molécula surge como resultado de las desviaciones de estos parámetros de los valores ideales. De acuerdo con esta suposición, la energía del sistema se puede desglosar en una suma de términos energéticos que representarán todas las interacciones posibles: deformaciones de los enlaces por elongación, plegamiento o rotación e interacciones entre masas, como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.-** Longitudes, ángulos de enlace, ángulos diedros, interacciones no enlazantes (Tomado de García,2017).

## CÁLCULO DE ENERGÍAS LIBRES DE UNIÓN PROTEÍNA-LIGANDO.

En esta sección se describen los métodos y funciones utilizadas en este trabajo para evaluar la afinidad proteína-ligando. Como se ha introducido, por una parte, se encuentran las funciones de *scoring* aplicadas en *docking*, con simplificaciones en su formulación, y por otra los métodos propiamente dedicados a calcular la energía libre de interacción.

## Funciones de Scoring

Las funciones de *scoring* utilizadas en este trabajo para el VS con *docking* son todas empíricas. Se trabajó con los programas AUTODOCK y GOLD.

Estos métodos utilizan la aproximación de una ecuación maestra (*master ecuación*) formulada por Ajay y Murcko 1995, que asume el carácter aditivo de los componentes de la energía libre, de acuerdo con la siguiente ecuación.

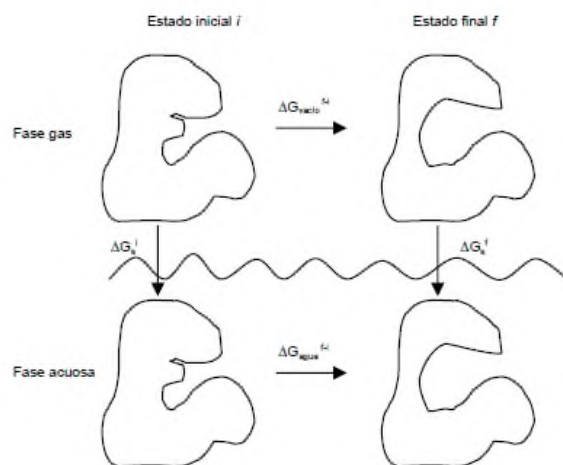
$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{puenteH} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Donde los cuatro primeros términos corresponden a los términos típicos de mecánica molecular que consideran la interacción de van der Waals, formación de puentes de hidrógeno, interacción electrostática y desviaciones de la geometría covalente, respectivamente.  $\Delta G_{tor}$  modela la traslación y rotación globales y  $\Delta G_{sol}$  incluye la desolvatación tras la unión del ligando y el efecto hidrofóbico.

## Función de Scoring de AUTODOCK.

La *master equation* de AUTODOCK 3.0, basada en el ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg (Figura 4) y consta de cinco términos que son los siguientes.

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdw} \cdot \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \\ & \Delta G_{puenteH} \cdot \sum_{i,j} E(t) \cdot \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{puenteH} \right) + \\ & \Delta G_{elec} \cdot \sum_{i,j} \frac{q_i \cdot q_j}{\epsilon(r_{ij}) \cdot r_{ij}} + \\ & \Delta G_{tor} \cdot N_{tor} + \\ & \Delta G_{sol} \cdot \sum_{i,j} S_i \cdot V_j \cdot \exp\left(-\frac{r_{ij}^2}{2 \cdot \sigma^2}\right) \end{aligned}$$



**Figura 4.**-Esquema del ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg (Tomado de Rabal, 2006).

## DINÁMICA MOLECULAR

La dinámica molecular (DM) es un tipo de simulación molecular computacional que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton. Operacionalmente, es un método para generar las trayectorias de un sistema compuesto de  $N$  partículas por integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, con especificaciones de un potencial de interacción interatómico de condiciones iniciales y de frontera adecuadas. La dinámica molecular es un método de modelado y simulación a nivel atomístico cuando las partículas en cuestión son los átomos que constituyen el material o sistema de estudio. Por medio de DM, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema como la energía libre, entropía, solubilidad, viscosidad, presión, temperaturas de cambio de fase, y en sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus dianas biomoleculares o receptores, e incluso, describir el comportamiento de una proteína y moléculas complejas bajo ciertas condiciones, por mencionar algunas de sus capacidades. Si bien, las ecuaciones del movimiento no describen el sistema a nivel cuántico (lo cual requeriría una capacidad de cálculo extremadamente grande), este tipo de estudios han mostrado buena correlación con resultados experimentales, y se pueden realizar con equipos de cómputo ciertamente convencionales, pero que cumplan ciertas especificaciones técnicas (Lozano-Aponte, 2014).

## MECANICA CLASICA

El método de DM se basa en resolver numéricamente las ecuaciones de movimiento para un sistema de  $N$  partículas con masa  $m_i$  y posiciones  $r_i$  a un tiempo  $t$  a través de la segunda ley de Newton, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad i = 1, \dots, N$$

Donde  $F_i$  representan las fuerzas que actúan sobre cada partícula debidas a la presencia de las otras partículas  $j$  un potencial por pares  $U(r_{ij})$ .

$$F_i = \sum_{i \neq j}^N F_{ij}$$
$$F_{ij} = - \frac{dU(r_{ij})}{dr_{ij}} \frac{r_{ij}}{r_{ij}}$$

Donde  $r_{ij} \vee r_{ij} \vee r_i - r_j \vee$  es la distancia relativa entre las partículas  $ij$ . Como puede observarse, el corazón de una simulación con DM depende de una descripción adecuada del sistema en términos de potenciales clásicos como lo indica la ecuación.

Los potenciales que se van a utilizar para la simulación dinámica se describen a continuación (Chipot, 2007).

## POTENCIALES INTRAMOLECULARES

El potencial intramolecular se refiere a las contribuciones dentro de una molécula. Los grados de libertad considerados son: la distancia de enlace (la cual se puede mantener fija), el ángulo de enlace que se forma entre tres átomos adyacentes modelados por una función de tipo armónico y el ángulo de torsión que se forma entre los planos de cuatro átomos consecutivos de una molécula (Ramírez, 2017).

### Distancias de enlace

Se pueden modelar a partir de una función de sitio armónico

$$U(r_{ij}) = \frac{k_r}{2} (r_{ij} - r_0)^2$$

Donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos  $r_{ij}$ ,  $r_0$  es su distancia de equilibrio y  $k_r$  representa la constante del enlace.

Los parámetros  $r_0$  y  $k_r$  pueden obtenerse por medio de técnicas experimentales o

bien por métodos teóricos.

## Ángulos de enlace

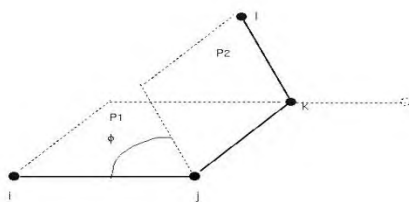
Los ángulos de enlace están relacionados con la estructura de la molécula que a su vez está relacionada con la disposición de los pares de electrones. Estos ángulos de enlace no varían mucho del ángulo de equilibrio a temperatura ambiente. Para simularlos se utiliza un potencial armónico que depende del ángulo que forman los enlaces en los átomos como se muestra en la siguiente ecuación.

$$U(\theta_{ijk0}) = \frac{k_{\theta}}{2} (\theta_{ijk} - \theta_0)^2$$

Donde  $\theta_{ijk}$  es el ángulo entre los átomos  $ij$  y  $k$ ,  $\theta_0$  es el ángulo de equilibrio y  $k_{\theta}$  es la constante del ángulo de enlace, que se puede obtener experimentalmente o teóricamente.

## Ángulo de torsión

Las torsiones tienen que ver con los cambios de energía que se presentan en una molécula cuando los átomos giran alrededor de los enlaces sencillos, hay rotaciones que son de baja energía o permitidas y otras de alta energía que dependen de la estructura molecular. La manera en que se puede ver esta torsión es usando el ángulo diedro. Lo anterior se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Ángulo diedro 1 formado por la intersección de dos planos cada uno conformados por tres átomos, la torsión es referida a los átomos  $j$  y  $k$ .

## POTENCIALES INTERMOLECULARES

Como su nombre lo sugiere el potencial intermolecular se refiere al potencial entre mol6culas, cada 6tomo de una mol6cula interactúa con los 6tomos de otra mol6cula, con un potencial por pares. Se pueden clasificar estos potenciales en dos tipos: de largo alcance y de corto alcance. En este trabajo usamos el potencial de Lennard-Jones que es de corto alcance (Ramírez, 2017).

## POTENCIAL DE LENNARD JONES.

El potencial de Lennard-Jones se considera como un potencial de corto alcance adem6s es muy usado en simulaciones de din6mica molecular para mol6culas no polares. El uso frecuente del potencial de Lennard-Jones se debe a su sencillez, y a que, con dos par6metros, se puede obtener el diagrama de fases de un solo componente o de mezclas. Para mol6culas se utiliza la siguiente forma del potencial (Ramírez, 2017).

$$U(r_{iajb}) = 4\epsilon_{ab} \left[ \left( \frac{\sigma_{ab}}{r_{iajb}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ab}}{r_{iajb}} \right)^6 \right]$$

## POTENCIAL DE COULOMB.

El potencial de Coulomb es un potencial de largo alcance. El m6todo fue introducido en 1921 para sumar eficientemente las interacciones de largo alcance entre part6culas y todas sus im6genes peri6dicas infinitas (Ramírez, 2017).

## ALGORITMOS DE MOVIMIENTO.

Para poder integrar las ecuaciones de movimiento se usan algoritmos desarrollados a partir de m6todos de diferencias finitas. Se trata de un problema

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

de condiciones iniciales, es decir, dadas las posiciones y velocidades a un tiempo  $t$ , hemos de obtenerlas a un tiempo  $t + dt$ . La Base del método de diferencias finitas consiste en sustituir el intervalo de tiempo infinitesimal  $dt$  por un intervalo finito  $\Delta t$ , durante el cual se supone que las fuerzas que actúan sobre las partículas son constantes. De este modo, las ecuaciones de movimiento se resuelven paso a paso, integrándolas a cada intervalo  $\Delta t$ . La elección de la longitud del paso de integración depende del algoritmo numérico utilizado y del sistema en particular.

La mayoría de los métodos de diferencias finitas están basados en un desarrollo en serie de Taylor de la variable a propagar. Así, por ejemplo, la componente  $x$  de la posición puede expresarse de la siguiente manera.

$$x(t + \Delta t) = x(t) + \frac{dx(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 x(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \frac{1}{3!} \frac{d^3 x(t)}{dt^3} \Delta t^3 + \dots + \frac{1}{n!} \frac{d^n x(t)}{dt^n} \Delta t^n$$

La cual es la expresión que se buscaba para las velocidades que debe truncarse en el término  $\Delta t$  y son consistentes con las posiciones. De esta manera es como se pueden evaluar tanto las posiciones como las velocidades simultáneamente.

Estas ecuaciones se conocen como algoritmo de Verlet cuyas relaciones son las siguientes.

$$r_i(\Delta t) = r_i(0) + v_i(0)\Delta t + \frac{F_i(0)}{2m_i} \Delta t^2$$
$$v_i(\Delta t) = v_i(0) + \frac{\Delta t}{2m_i} [F_i(0) + F_i(\Delta t)]$$

El cual se escribe de la siguiente manera:

$$v_i\left(\frac{\Delta t}{2}\right) = v_i(0) + \frac{\Delta t}{2m_i} F_i(0)$$
$$r_i(\Delta t) = r_i(0) + \Delta t v_i\left(\frac{\Delta t}{2}\right)$$
$$v_i(\Delta t) = v_i\left(\frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\Delta t}{2m_i} F_i(\Delta t)$$

Sobre esta base teórica, el esquema básico de funcionamiento de una simulación de DM será:

1. Se establecen los parámetros para la simulación: temperatura inicial, paso del tiempo  $\Delta t$ , tiempo total de la simulación, etc.
2. Se ajusta el sistema, asignando las posiciones y velocidades iniciales: las posiciones iniciales de los átomos se pueden obtener a partir de estructuras experimentales, determinadas por rayos X o por RMN, o bien modelizadas teóricamente. Por su parte las velocidades iniciales  $v_i$  se suelen escoger aleatoriamente a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann, la cual da la probabilidad  $\mathcal{P}$  de que un átomo  $i$  tenga una velocidad  $v_\alpha$  en la dirección  $\alpha$  ( $x, y, z$ ) a una temperatura  $T$

$$P(v_{i\alpha}) = \left( \frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[ -\frac{m_i v_{i\alpha}^2}{2k_B T} \right] \text{ siendo } \alpha (x, y, z)$$

Normalmente, las velocidades se ajustan de forma que  $\vec{p} = \sum_{i=1}^N m_i \vec{v}_i = 0$  (momento global nulo).

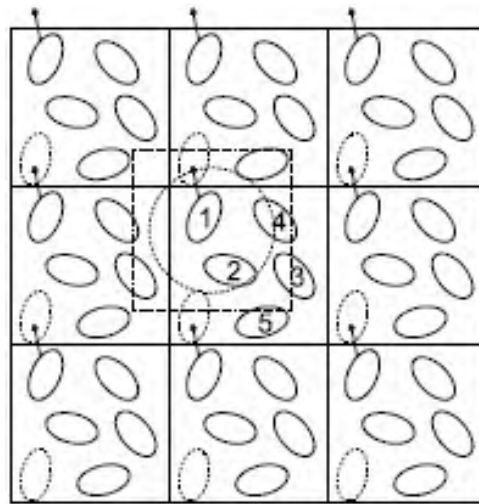
3. Se calculan las fuerzas sobre todas las partículas.
4. Se integran las ecuaciones de movimiento. Este paso y el anterior se van repitiendo, durante el tiempo total de simulación estipulado para calcular la evolución temporal del sistema. Alfonso. (A. Javier)

## CONDICIONES DE CONTORNO PERIÓDICAS

Para simular un sistema macroscópico “estado líquido” (bulk) se suelen emplear condiciones de contorno periódicas, ya que así se minimizan los efectos superficiales. Si consideramos un sistema con una serie de átomos encerrados en un cubo, incluso si tuviéramos un millón de átomos, casi un 6% estarían sobre la superficie de dicho cubo, lo cual ya afecta a los cálculos de las propiedades del sistema. Esto se soluciona rodeando el cubo de réplicas del mismo; ahora bien, si consideramos el cálculo de la fuerza sobre la partícula 1 de la Figura 5 y la

energía potencial que la involucra, teniendo en cuenta solo las interacciones diatómicas, deberíamos calcular las interacciones entre la partícula 1 y el resto de las partículas y además con todas las imágenes de las réplicas, lo que daría lugar a un número infinito de interacciones que harían no viable su cálculo.

Para solucionar esto, se recurre al convenio de la mínima imagen, el cual indica que, si la fuerza es de corto rango, se consideraran solo las partículas cercanas a la partícula 1 y si la interacción es a mayor distancia, simplemente se ignorará. Lo que se hace es lo siguiente: tomando como centro a la partícula 1, se construye una caja de del mismo tamaño y forma que la caja original (en la Figura 6, el cubo con línea discontinua) y solo se consideran las interacciones entre la partícula 1 y el resto de las partículas que se encuentran dentro de esta última caja, por lo que solo habrá ahora  $N - 1$  interacciones a calcular en la partícula 1 (Aguirre, 2009).



**Figura 6.** Condiciones periódicas de frontera (Tomado de Aguirre, 2009).

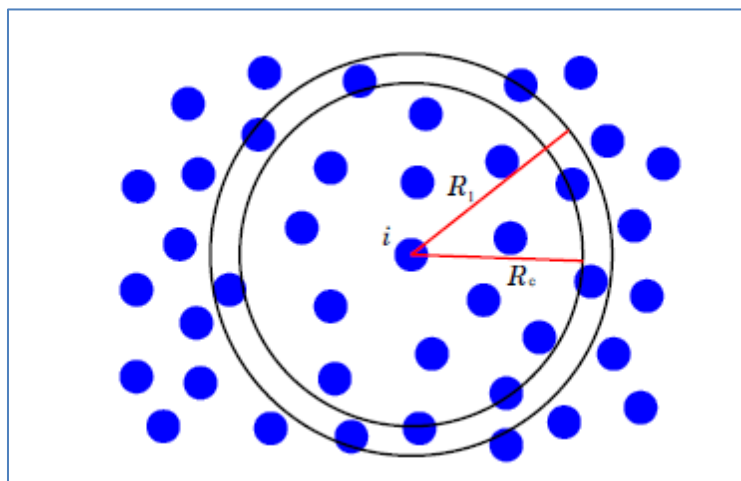
## **LISTA DE VECINOS O LISTA DE VERLET.**

Por otra parte, la contribución de energía y a las fuerzas sobre una partícula provienen de sus vecinos más cercanos, por lo que se suele tener en cuenta solo los potenciales de corto alcance que normalmente no van más allá de quintos vecinos e introducir un radio de corte (cut off).

El uso de distancias de corte reduce el número de interacciones a evaluar, la utilización de potenciales truncados requiere de calcular todas las distancias entre partículas del sistema y su comparación con  $R_c$  para definir si se trunca o no la interacción, lo que en sí mismo consume tiempo de computo, Por lo que Verlet propuso una técnica para reducir el número de distancias a evaluar en cada paso de integración, y se conoce como *lista de vecinos* o *lista de Verlet*.

Esta técnica consiste en generar una lista de vecinos cercanos para cada partícula del sistema que se actualizará cada cierto número de pasos de integración, usando el hecho de que las partículas que pueden entrar o salir de la esfera definida por  $R_c$ , serán esencialmente las mismas unos pocos pasos de integración después. Por lo que se define una esfera adicional de radio  $R_l$  mayor que la esfera de corte y se almacena una lista con las posiciones de las partículas contenidas en su interior.

El valor típico de  $R_l$  es  $R_l = R_c + \Delta l$  donde  $\Delta l$  varía de  $0.2\sigma$ - $0.3\sigma$ . Así, durante un cierto número de pasos de integración, solo se evalúan las distancias entre cada partícula y aquellas incluidas en la lista de Verlet. Esta lista ha de actualizarse periódicamente, ya que transcurrido cierto tiempo el movimiento de las partículas es el suficiente para que salgan o entren en la esfera de radio igual al radio de lista (Aguirre, 2009, Ramírez, 2017).



**Figura 7.** Lista de vecinos cercanos a la partícula  $i$ .  $R_c$  es el radio de corte para la interacción

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

con las partículas restantes y  $R_l$  es el radio de la lista de vecinos cercanos. (Tomado de Ramírez, 2017).

## **DINÁMICA MOLECULAR EN DIFERENTES ENSAMBLES.**

Los ensambles nos proporcionan una conexión entre el mundo microscópico clásico descrito por las ecuaciones de movimiento de Newton y las observables macroscópicas que pueden ser medidas en un experimento. Siendo un ensamble una colección imaginaria de sistemas descritos por el mismo hamiltoniano, con cada sistema en un único estado microscópico en un momento determinado en el tiempo, el concepto de ensamble permite realizar un análisis estadístico de dicho conjunto. Los ensambles que se pueden generar en la dinámica molecular pueden ser el microcanónico (NVE), canónico (NVT) y el isobárico-isotérmico (NPT), entre otros (Frenkel, 1996).

## **DINÁMICA MOLECULAR A NVE CONSTANTE**

La dinámica molecular es una técnica que permite estudiar la evolución temporal natural de un sistema de  $N$  partículas interactuantes en un volumen  $V$ , en dichas simulaciones. La energía total  $E$  es una constante de movimiento. Si se asume que los promedios temporales son equivalentes a los promedios de ensamble, entonces el promedio temporal de una propiedad obtenido en una dinámica molecular convencional es equivalente al promedio de tal propiedad en el ensamble microcanónico. Siendo el ensamble microcanónico generado de manera natural. En este, un sistema termodinámico no intercambia energía, ni partículas con el alrededor, el volumen y el número de partículas permanecen constante. Dicho ensamble provee un punto de partida desde el cual otros ensambles de equilibrio son derivados (Frenkel, 1996).

## **DINÁMICA MOLECULAR A NVT CONSTANTE**

En este tipo de dinámica se mantiene el número de partículas, el volumen y la temperatura fijos. La forma de mantener la temperatura fija es a través de un termostato. En la literatura existen varios termostatos uno de ellos es el

*escalamiento de velocidades*, el cual consiste en usar el teorema de equipartición de la energía, lo que permite encontrar una relación entre la temperatura del sistema  $T(t)$  al tiempo  $t$  y la energía cinética de las partículas  $k(t)$ , a través de  $T(t) = 2k(t)/dNk_B$  donde  $d$  es la dimensión. Con esta relación se puede definir un factor de escala que consiste en relacionar la temperatura externa, que le imponemos al sistema, con la temperatura interna a través de  $\sqrt{T_{ext}/T(t)}$ .

Existe una gran variedad de termostatos para añadir o remover energía para mantener la temperatura promedio constante. Incluyen la reescalación de velocidades, dinámica Langevin, termostato Nosé-Hoover y el termostato Berendsen. No es fácil obtener una distribución de microestados correspondiente a la colectividad canónica, ya que ello depende del tamaño del sistema, selección del termostato, parámetros del termostato, paso de tiempo e integrador utilizados (Frenkel, 1996).

## **Termostato Berendsen.**

El termostato suprime fluctuaciones de la energía cinética del sistema y por lo tanto no puede producir trayectorias coherentes con el conjunto canónico. La temperatura del sistema se corrige de tal manera que la desviación decae exponencialmente con una constante de tiempo.

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{t}$$

Aunque el termostato no genera un correcto ensamble canónico (especialmente en sistemas pequeños), para grandes sistemas en el orden de cientos o miles de átomos, la aproximación produce resultados más o menos correctos para propiedades calculadas. Es ampliamente usado debido a la eficiencia con que se relaja un sistema en cierta temperatura.

En muchos casos los sistemas se equilibran inicialmente en un ensamble Berendsen, mientras que las propiedades se calculan utilizando el termostato NOSE-Hoover, que genera correctamente las trayectorias consistentes con un conjunto canónico.

## **DINÁMICA MOLECULAR A NPT CONSTANTE**

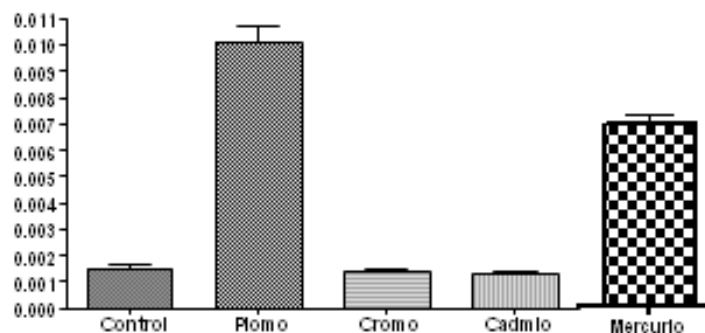
Algunos experimentos son realizados a presión constante en lugar de volumen constante, por lo que se han desarrollado técnicas que permitan simular este tipo de condiciones. Para mantener la presión constante en simulaciones de dinámica molecular es necesario considerar al volumen como una variable dinámica que cambie durante la simulación. Al igual que para los ensambles a temperatura constante, existen muchos y muy variados métodos los cuales han sido propuestos bajo el contexto de espacio fase extendido, nuevos algoritmos en los cuales el volumen es introducido como una variable dinámica adicional, y agrega una variable correspondiente al momento con la finalidad de mantener las condiciones isobáricas del sistema. El método utilizado consiste en usar un algoritmo similar al método de Cadenas de Nose-Hover usa una cadena de baróstatos y termostatos que permitan al sistema mantener la presión y temperatura fijas (Frenkel, 1996).

# ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

Anteriormente a la enzima Glutación S-transferasa (GST) no se consideraba como una proteína que sugiriera algún tipo de daño celular debido a la exposición a plomo en células renales. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que, en riñón, la actividad de la GST podría estar indicando el efecto de la exposición a plomo *in vivo* e *in vitro* en bacterias y en riñones de animales de laboratorio expuestos al elemento. (Hernández, 2013, Galicia, 2014).

Estudios *in vivo* en roedores expuestos mediante una intoxicación aguda a cuatro metales demostraron que la actividad de GST aumentó cuando los animales fueron expuestos a plomo y a mercurio, siendo el primero el elemento que aumentó más la actividad de la proteína (Navarro, 2015). La Figura 8 muestra los resultados obtenidos, en ella se puede observar que los metales cromo y cadmio no afectaron la actividad enzimática sugiriendo, de esta manera, que cada metal ejerce un efecto diferente sobre la actividad de la GST renal. Si se considera la propuesta sobre la relación existente entre la generación de especies reactivas de oxígeno por exposición a plomo y mercurio con la consecuente elevación de la actividad de la enzima, entonces se podría afirmar que los metales cromo y cadmio no se comportaron de la misma forma que el plomo y mercurio.



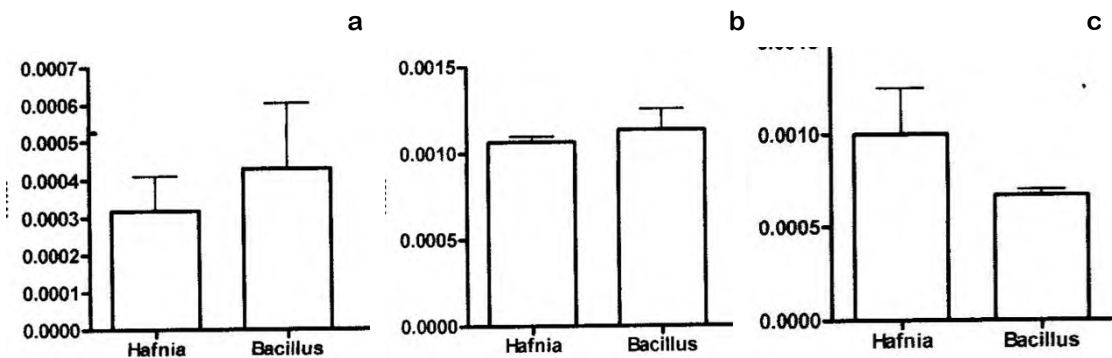
**Figura 8.** Actividad *in vivo* de GST renal en ratas expuestas de forma aguda a plomo (25 mg/kg), cromo (15 mg/kg), cadmio (50 mg/kg) y mercurio (5 ppm/200g). (Tomado de Navarro, 2015)

En bacterias aisladas de ambientes acuosos contaminados con metales pesados

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

se encontró que la actividad de GST medida *in vivo* en presencia de concentraciones crecientes de plomo depende de la cepa y la concentración de metal utilizado. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos al incubar las cepas bacterianas *Hafnia alvey* y *Bacillus pumilus* en presencia de 0.32 y 0.62 mM de plomo en el medio de cultivo.



**Figura 9.** Actividad de GST en *Hafnia alvey* y *Bacillus pumilus* a) sin exponer y expuestas a b) 0.32 y c) 0.62 mM de plomo en el medio de cultivo. (Modificado de Galicia, 2014).

Estudios realizados *in vitro* en homogeneizados de corteza renal de ratas expuestas a plomo, indicaron que la actividad de la enzima GST se vio disminuida en presencia de concentraciones crecientes del metal en función del tiempo de exposición. La tabla 2 muestra la cuantificación de la actividad a una concentración de plomo 0.05M en función del tiempo de incubación. (Hernández, 2013, Galicia, 2014).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

**Tabla 2.** Actividad de la Glutación S-transferasa renal *in vitro* a diferentes tiempos de exposición (Hernández, 2013, Galicia, 2014).

Actividad de la enzima GST.		
Grupo	Muestra	Actividad GST en riñón ( $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{min}$ )
Sin exposición a plomo	Control	$7.92 \pm 1.26$
Ensayo <i>in vitro</i> . Exposición a de plomo 0.05 mM sobre la enzima GTS de riñón, en función del tiempo.	60 segundos	$7.73 \pm 0.44$
	120 segundos	$6.99 \pm 3.74$
	300 segundos	$6.40 \pm 2.61$
	600 segundos	$4.61 \pm 0.32$

En bacterias, los experimentos realizados *in vitro* en las cepas *Hafnia alvey* y *Bacillus pumilus* demostraron que en general al aumentar la concentración del plomo la actividad de la enzima aumenta en la primera cepa, mientras que al incubar *Bacillus pumilus* en concentraciones crecientes de metal, la actividad tiende a bajar. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 3.** Actividad de GST ( $\mu\text{M}/\text{mg}/\text{min}$ ) determinada *in vitro* en cepas de *Hafnia alvey* y *Bacillus pumilus* utilizando concentraciones crecientes de plomo a dos tiempos (promedio de tres mediciones) (Tomado de Galicia, 2013)

Plomo ( $\mu\text{M}$ )	GST 1 minuto <i>Hafnia alvey</i>	GST 5 minutos <i>Hafnia alvey</i>	GST 1 minuto <i>Bacillus pumilus</i>	GST 5 minutos <i>Bacillus pumilus</i>
17	0.40	0.45	0.87	1.43
50	0.69	0.53	0.54	0.40
83	0.74	0.54	0.92	1.08
167	0.81	0.84	0.96	0.92
333	0.07	0.87	0.06	0.36

Lo anterior podría indicar que el muy posiblemente el plomo actúa de dos diferentes maneras sobre la actividad de la enzima GST. En primer lugar, se podía sugerir que el metal presente efectos directos como especie ionizada uniéndose a

especies cargadas negativamente como las enzimas. Los datos de los experimentos *in vitro* muestran este efecto, indicando que el plomo pudo unirse a sitios con carga negativa que conforman la estructura de la proteína GST y que por ello la actividad enzimática disminuyó. Sin embargo, en los microorganismos el efecto *in vitro* depende de la cepa, el tiempo y la dosis del metal. El segundo efecto de la exposición a plomo se podría relacionar con la generación de especies reactivas de oxígeno (efecto secundario) los cuales posiblemente activarían la actividad de la GST. Los experimentos *in vivo* demostraron que la actividad aumentó y que para estas bacterias y este metal existe, muy posiblemente, una relación entre la exposición a plomo, la generación de estrés oxidativo y la actividad de GST, semejante a la descrita anteriormente.

## **ANTECEDENTES COMPUTACIONALES**

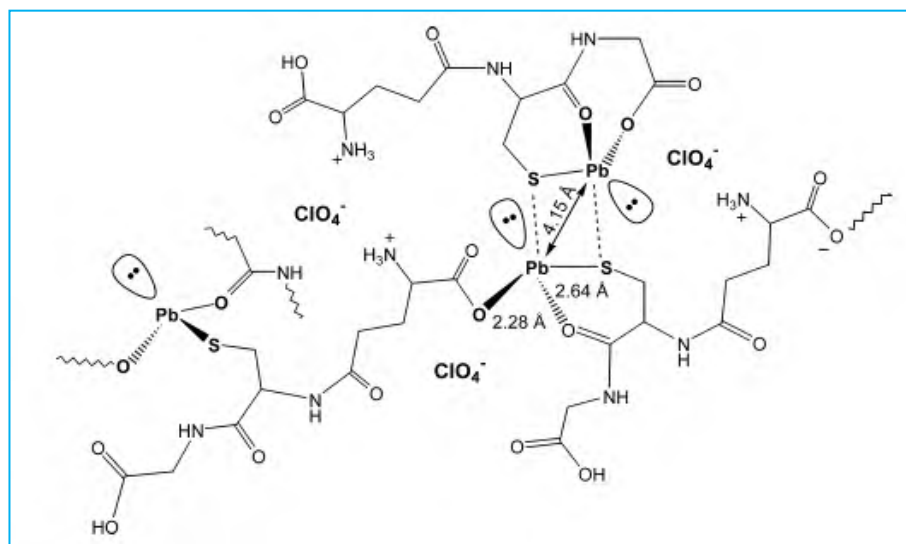
Se han realizado estudios relacionados con el acoplamiento molecular como los realizados por Lannutti y sus colaboradores. Entre los estudios realizados se encuentran los de docking de la GST PI y su ligante GSH, debido al alto grado de flexibilidad que caracteriza a esta familia de enzimas. Se utilizó un enfoque de acoplamiento transversal sobre la base de un conjunto de estructuras de rayos X de complejos unidos de la GST PI para modelar los efectos de flexibilidad de la proteína sobre la unión de los conjugados de GSH. El estudio de acoplamiento molecular que se utilizó en este artículo permitió analizar el impacto de flexibilidad de la proteína y el efecto de ajuste inducido en el GSH conjugado con la GST PI. La inclusión de moléculas de agua conservadas en el modelo permitió incluir más variables en el modelo de acoplamiento. A partir de estos estudios se generó un mapa de las interacciones ligando-proteína que describe de manera profunda como el GSH se unen a la GST PI (Lannutti, 2012).

En otra investigación Mah y colaboradores estudiaron la estructura de complejos formados entre el ion  $Pb^{2+}$  y el glutación (que es el tiol más abundante en muchos sistemas biológicos). Se realizaron experimentos en una serie de soluciones acuosas a pH de 8.5 con una concentración de plomo de 10 mM. También se

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

realizaron estudios de absorción de rayos X y los resultados obtenidos demostraron que las distancias entre el Pb-S del dipéptido son de  $2.64 \pm 0.04 \text{ \AA}$ . De manera similar los resultados obtenidos a partir de los análisis de espectrofotometría uv/vis mostraron que las distancias obtenidas entre el Pb-S fueron de  $2.65 \pm 0.04$ . Finalmente, el análisis de espectroscopia de masas reveló que las distancias obtenidas entre el Pb-S fueron de  $2.65 \pm 0.04$  resultando idénticas al análisis de espectrofotometría uv/vis (Mah, 2012).

La Figura 10 muestra las posibles interacciones del ion  $\text{Pb}^{2+}$  con diferentes residuos de aminoácidos indicando que los posibles sitios de interacción son los grupos sulfhidrilos y carboxilos del dipéptido.



**Figura 10.-** Posible estructura de la interacción de plomo con el glutatión reducido (Mah, 2012).

Las investigaciones de dinámica molecular realizadas por Johnson y colaboradores relacionadas con la adsorción de cadmio y plomo en peptidoglicano y ácido teicoico de la pared celular bacteriana se llevaron a cabo usando métodos de campo de fuerza de energía clásica. Las simulaciones se llevaron a cabo tanto en fase gaseosa y en celdas periódicas solvatadas. Los valores de los parámetros de Lennard-Jones para cadmio y plomo y su interacción con el oxígeno fueron previamente desconocidos, por lo cual ellos utilizaron un potencial analógico apropiado como el  $\text{Ba}^{2+}$ . Posteriormente estos datos fueron validados simulando el

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

plomo en agua en fase gas calculando el número de coordinación y las energías para ambos metales comparándolos experimentalmente.

La simulación se llevó a cabo en una caja periódica con 216 moléculas de agua.

Los valores utilizados para Pb fueron  $D0 = 0.0470$  kcal/mol and  $R0 = 3.8364$  Å°.

Los resultados de las dinámicas moleculares se muestran en la Figura 10.

Peptidoglycan					Teichoic acid				
Run	Shell	Avg CN	R	$\sigma$	Run	Shell	Avg CN	R	$\sigma$
Cd-2Carb	O <sub>L</sub>	4	2.33	0.102	Cd-2Phos	O <sub>L</sub>	3	2.13	0.339
	O <sub>w</sub>	4	2.33	0.087		O <sub>w</sub>	4	2.31	0.080
	C	2	2.67	0.074		P	2	2.95	0.317
	O <sub>T</sub>	8	2.33	0.096		O <sub>T</sub>	7	2.31	0.115
Cd-1Carb	O <sub>L</sub>	2.2	2.27	0.086	Cd-1Phos	O <sub>L</sub>	2	2.19	0.093
	O <sub>w</sub>	5	2.29	0.076		O <sub>w</sub>	5	2.33	0.075
	C	1	2.63	0.061		P	1	2.99	0.056
	O <sub>T</sub>	7	2.27	0.080		O <sub>T</sub>	7	2.27	0.086
Pb-2Carb	O <sub>L</sub>	4	2.51	0.195	Pb-2Phos	O <sub>L</sub>	3	2.45	0.117
	O <sub>w</sub>	5	2.59	0.108		O <sub>w</sub>	4.8	2.59	0.101
	C	2	2.93	0.113		P	2	3.19	0.338
	O <sub>T</sub>	8.8	2.59	0.153		O <sub>T</sub>	7.8	2.57	0.125
Pb-1Carb	O <sub>L</sub>	2	2.55	0.121	Pb-1Phos	O <sub>L</sub>	1	2.47	0.065
	O <sub>w</sub>	6.6	2.61	0.104		O <sub>w</sub>	7	2.59	0.126
	C	1	2.97	0.091		P	1	3.79	0.154
	O <sub>T</sub>	8	2.61	0.111		O <sub>T</sub>	8	2.59	0.140

O<sub>L</sub>, carboxylate or phosphoryl oxygen; O<sub>w</sub>, water oxygen; O<sub>T</sub>, total oxygens; C, carboxylate carbon; and P, phosphoryl phosphorus.

**Figura 11.-** Coordinación y distancias de unión de cationes 1:1 y 1:2 de estequiometrias metal-ligando derivados del ensamble NPT de las dinámicas moleculares de los peptidoglicanos hidratados y los fragmentos de ácidos teicoicos.

# JUSTIFICACIÓN

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

Varios investigadores han dedicado su trabajo a tratar de encontrar una relación entre la exposición a plomo y el daño renal. Lo anterior se ha estudiado debido a que en muchos países se han reportado una gran cantidad de casos de enfermedades renales derivadas de la exposición al metal. Dicha exposición puede ser tanto ocupacional como no ocupacional; en regiones urbanas y en regiones rurales; en niños y en adultos y por varias vías de acceso al organismo. A nivel celular y fisiológico se ha observado que como consecuencia de exposiciones continuas o repetitivas al metal se puede generar una tensión tóxica en el riñón dañando la función de las células de túbulo contorneado proximal, afectando a proteínas importantes y ocasionando una nefropatía asociada al plomo.

A lo largo de varias décadas se ha tratado de establecer varios métodos para detectar el daño ocasionado por la intoxicación por plomo en riñón. Algunas investigaciones han mostrado que existe una relación entre algunos resultados de pruebas bioquímicas realizadas en muestras de sangre o de orina y el daño a nivel renal por varios agentes tóxicos. Por esta razón se han establecido algunos perfiles enzimáticos para detectar daño ocasionado por agentes patógenos o algunos xenobióticos. En el caso del plomo, lo anterior se ha basado principalmente en la detección de plomo en sangre, la actividad de enzimas como la de la ácido delta aminolevulínico deshidratasa o la detección de proteínas de bajo peso molecular en orina, sin embargo no se cuenta con un bioindicador de daño que indique la presencia de plomo en células renales.

En este trabajo se realizará un análisis del comportamiento enzimático de la Glutación S-Transferasa renal (PI), tanto de manera experimental como teórica, para comprender el efecto que el metal tiene sobre la actividad enzimática y profundizar en el estudio de esta enzima como posible bioindicador renal de exposición al plomo. Lo anterior se llevará a cabo con el conocimiento de que esta enzima cumple con muchos de los requisitos para poder considerarse como un indicador biológico de intoxicación por plomo.

# HIPÓTESIS

Si existe una interacción molecular entre el plomo y los sitios activos o reguladores de la enzima Glutación S-transferasa PI (GST), entonces la actividad de ésta podrá ser modificada al bloquear los sitios de unión con su sustrato y su ligando.

## **OBJETIVOS**

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

## **GENERAL**

Estudiar de manera experimental y teórica la actividad de la enzima Glutación S-transferasa renal (P1) en ausencia y presencia de plomo.

## **ESPECIFICOS**

1.- Medir la actividad de la enzima Glutación S-transferasa en homogeneizados de riñón en ausencia y presencia de plomo.

2.- Medir la actividad de la enzima Glutación S-transferasa en homogeneizados de riñón en ausencia y presencia de plomo, variando las condiciones de pH.

3.- Medir la actividad de la enzima Glutación S-transferasa en homogeneizados de riñón en ausencia y presencia de plomo, variando las condiciones de temperatura.

4.- Medir la actividad de la enzima Glutación S-transferasa en homogeneizados de riñón en ausencia y presencia de plomo, variando la concentración de iones.

5.- Realizar el acoplamiento molecular entre la enzima Glutación S-transferasa P1 con el ligando glutatión reducido, el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) y el complejo ligando-sustrato.

6.- Medir la Energía Libre de Gibbs del ligando glutatión reducido, el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) y el complejo ligando-sustrato.

7.- Determinar los residuos de los aminoácidos que interaccionan con el ligando glutatión reducido, el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB) y el complejo ligando-sustrato.

8.- Realizar una simulación molecular de la interacción de los diferentes ligandos a

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

partir de las coordenadas encontradas a partir del acoplamiento molecular.

9.- Caracterizar el sitio de unión de los ligandos y el plomo más probables dentro de la enzima.

10.- Obtener propiedades moleculares del sistema de estudio que se puedan correlacionar con datos experimentales conocidos.

11.- Realizar una simulación molecular de la enzima y el plomo en el sitio de interés para medir sus efectos en la estructura de la proteína.

12.- Realizar las correlaciones necesarias para establecer la relación entre los resultados experimentales y los teóricos y explicar el mecanismo por el cual la enzima cataliza la reacción de acoplamiento entre su sustrato y el ligante.

13.- Realizar las correlaciones necesarias para establecer la relación entre los resultados experimentales y los teóricos y explicar el mecanismo por el cual el plomo disminuye la actividad catalítica de la enzima.

# METODOLOGÍA

## **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Los animales utilizados en esta investigación fueron alimentados con una dieta balanceada que incluyó los nutrientes necesarios para su buen desarrollo. Se les proporcionó agua normal y fueron sometidos a periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en un ambiente con temperatura controlada.

### **a) Obtención de las muestras biológicas.**

Para realizar las cinéticas enzimáticas de la Glutación S-transferasa P1 se sacrificaron grupos de seis ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 200 gramos. El tejido de la corteza renal fue homogenizado en un amortiguador de fosfatos 1M y pH 7.2 en un homogeneizador Ultra turrax IKAT18 basic.

### **b) Cuantificación de proteína total.**

Se cuantificó la concentración de proteínas por el método modificado de Lowry de la siguiente manera. En un tubo de ensaye se colocaron 790 microlitros de agua destilada a la cual se le adicionaron 10 microlitros de la muestra, 100 microlitros de desoxicolato de sodio al 1% ( $C_{24}H_{39}NaO$ ) y 2 mililitros de una solución compuesta por sulfato de cobre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) al 0.5%, 2 gramos de hidróxido de sodio (NaOH) y 0.134 gramos de tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) y 100 microlitros del reactivo de Folin-Ciocalteau ( $C_6H_6O$ , usando una dilución 1:3). Se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de este tiempo se procedió a realizar la lectura de absorbancia a 750 nm en un espectro uv/visible (Pekín Elmer Lamda 25). Se realizó una curva de calibración utilizando un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (Navarro, 2004).

### **c) Determinación de la actividad de la enzima Glutación S-transferasa.**

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando el siguiente procedimiento. Se utilizó una celda de vidrio a la cual se le agregó el volumen correspondiente de un amortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 6.5, el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno a una concentración final de 1 mM y el ligante glutación

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

reducido a una concentración final de 1 mM. Esta mezcla se homogenizó por inversión y finalmente se adicionó el volumen correspondiente a 1 mg/ml de proteína total. Se midió el aumento de absorbancia a 350 nm por un tiempo de cinco minutos con intervalos de 20 segundos en un espectrofotómetro UV/Vis (Perkin Elmer Lamda 25).

## **d) Medición de la actividad enzimática variando pH, temperatura e iones.**

Se determinó la actividad enzimática variando el pH usando el amortiguador de fosfatos a diferentes valores de pH (3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 8.5 y 9.5).

Se determinó la actividad enzimática empleando diferentes temperaturas (10, 20, 35, 45, 60 grados centígrados) incubando la muestra por cinco minutos en un baño maría.

Se determinó la actividad enzimática variando la concentración de iones en el amortiguador de fosfatos (25, 50, 100, 150, 250 mM) usando un tiempo de incubación de cinco minutos.

## **e) Ensayos *in vitro* con plomo.**

Se realizó la medición de la actividad de GST en presencia de acetato de plomo [ $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ] a diferentes concentraciones, en condiciones normales y utilizando las diferentes condiciones de temperatura, pH y concentración de iones, todas descritas en los puntos 4, 5 y 6.

## **METODOLOGÍA COMPUTACIONAL.**

### **a) Docking molecular.**

Antes de comenzar a hacer la dinámica molecular, se buscaron en la literatura las estructuras cristalinas de los diferentes componentes involucrados en el estudio, esto es la enzima Glutación S-Transferasa, el ligando dinitroclorobenceno (DNCB) y el glutatión reducido (GSH) en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Una vez descargadas las estructuras se pudieron visualizar mediante un software de proteínas como VMD. Con la idea de comparar la enzima GST P1 de las

diferentes fuentes reportadas del PDB. Teniendo los ligandos y la enzima listos se procedi6 a realizar el acoplamiento molecular. Para ello se utiliz6 el programa AutoDock v4.2 (G6mez, 2008). Se realiz6 un docking ciego entre cada uno de los complejos prote6na– ligando y su respectivo receptor, solicit6ndose para tal fin la generaci6n de 100 poses en cada caso. La preparaci6n de los receptores y ligandos se llev6 a cabo utilizando el programa Pymol. El tratamiento de los receptores consisti6 en la extracci6n del ligando y la eliminaci6n de mol6culas de agua y cofactores con los cuales vienen resueltas sus estructuras cristalinas. El acoplamiento se realiz6 bajo los siguientes par6metros: libre rotaci6n de todos los enlaces de los ligandos con libertad conformacional, adici6n de cargas de Gasteiger a la prote6na y al ligando, adici6n de hidr6genos a la prote6na, generaci6n de 100 poses para cada ligando y utilizando el algoritmo gen6tico Lamarckiano (LGA).

Para seleccionar la mejor pose para cada ligando se utilizaron los siguientes criterios: Criterio 1. Energ6a de uni6n del complejo: se tom6 como mejor pose aquella que report6 la menor energ6a de uni6n entre todas las poses obtenidas. Criterio 2. Distribuci6n de energ6a (cluster): se tom6 como mejor pose aquella que ocupa la primera posici6n dentro del cl6ster m6s poblado (Vel6squez, 2013)

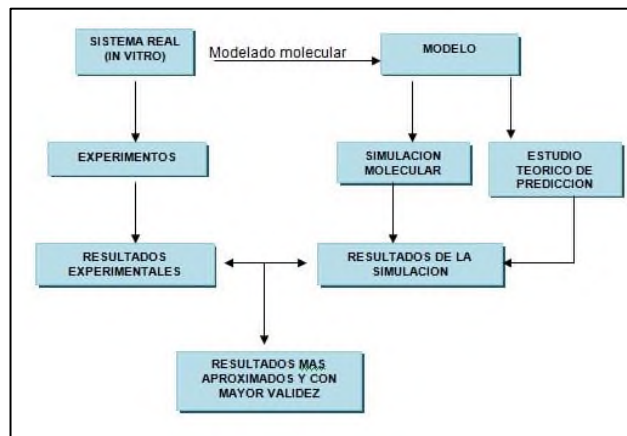
## **a) Din6mica molecular.**

A partir del acoplamiento molecular, se obtuvieron las coordenadas de la interacci6n entre los diferentes ligantes con la enzima GST P1. Posteriormente se utiliz6 el software de simulaci6n molecular GROMACS 4.6.5, el cual se evalu6 mediante los potenciales de interacci6n y el algoritmo de movimiento de Newton el comportamiento de nuestros ligantes con respecto a la prote6na en funci6n del tiempo. Los resultados de la din6mica se analizaron con herramientas externas y de GROMACS para observar los cambios conformacionales y estructurales que tiene la enzima en funci6n del tiempo con sus diferentes ligandos. A partir de los resultados de las din6micas moleculares se realiz6 una segunda simulaci6n molecular en la cual se puso a interactuar el plomo con la enzima, con un

potencial del plomo propuesto en la literatura para un sistema biol6gico. Se evalu6 la interacci6n en funci6n del tiempo de exposici6n del metal con la enzima. Utilizando las herramientas de GROMACS y el visualizador de prote6nas se analizaron los resultados para observar del comportamiento del metal con la prote6na y con qu6 amino6cidos esta interactuando, esto con la finalidad de saber d6nde se podr6 llevar a cabo la inhibici6n de esta. Se realiz6 una tercera prueba de simulaci6n molecular, pero ahora agregando el sustrato (DNCB) el cofactor (GSH) y el inhibidor, para conocer el cambio conformacional de la enzima con respecto a sus ligantes e inhibidor y tener una idea del tipo de inhibici6n (Lozano, 2014).

### c) Correlaciones entre resultados experimentales y computacionales.

A partir de los resultados obtenidos de los experimentos *in silico* y los experimentos *in vitro* se lograr6 conocer y comparar el tipo de inhibici6n existente entre el plomo y la enzima GST P1 al realizar las correlaciones correspondientes entre los resultados experimentales y te6ricos obtenidos para el modelado molecular. Lo anterior se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Relaci6n entre un sistema *in vitro* (experimental) y un sistema *in silico* (te6rico) (Fuente: elaboraci6n propia).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

## ENSAYOS EXPERIMENTALES *in vitro*.

Medici6n de la actividad de GST en homogeneizados de corteza renal.

En condiciones normales la GST tiene una actividad basal que depende del tipo celular y de las condiciones metab6licas celulares. Se debe tener en cuenta que lo anterior es debido a que esta enzima tiene un gran n6mero de actividades tanto como enzima detoxificante (en la fase II del metabolismo de los xenobi6ticos) como dentro del metabolismo oxidativo celular (Krajinovic et al. 1999).

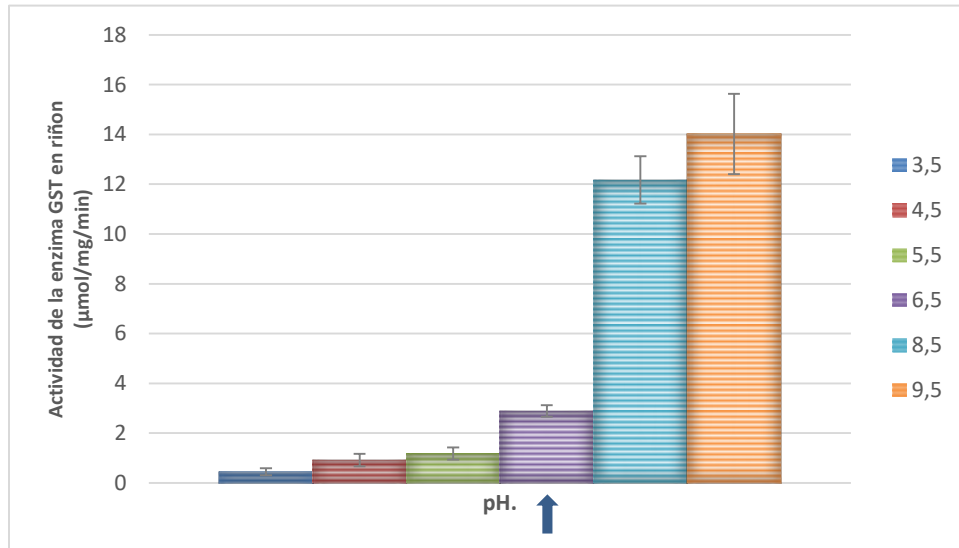
En el sistema utilizado para la realizaci6n de este trabajo de Tesis, la actividad encontrada al usar como sustrato el compuesto 1-cloro-2,4-dinitroclorobenceno un pH de 6.5 y una temperatura de 25 grados cent6grados en un homogeneizado de corteza renal fue. Las actividades enzimáticas dependen de factores f6sicos y qu6micos mismos que pueden influir tanto en su activaci6n como en su inhibici6n. Para conocer el efecto de la variaci6n del pH sobre la actividad de GST se realizaron ensayos variando el valor de pH del amortiguador.

### **Efecto de la variaci6n del pH sobre la actividad de GST.**

La gráfca 1 muestra la actividad de la enzima al variar el pH. La actividad de la enzima se mide usando un ensayo reportado por Habit y Jacobi a un valor de pH de 6.5 (Jim6nez, 1984) En este ensayo se utilizaron tres valores por debajo del pH normal (3.5, 4.5 y 5.5) y dos valores por arriba (8.5 y 9.5). A valores de pH básiico (8.5 y 9.5) la actividad catalítica aument6 4.2 ( $12.5 \pm 0.8$ ) y 4.9 ( $14 \pm 1.2$ ) veces, en relaci6n con el control ( $1.5 \pm 0.007$ ) (pH de 6.5). Cuando se usaron valores de pH ácido la actividad disminuy6 6.6 veces al valor de pH de 3.5 ( $0.5 \pm 0.007$ ); 3.1 veces al valor de pH de 4.5 ( $0.9 \pm 0.007$ ) y 2.4 veces ( $1.3 \pm 0.007$ ) a pH 5.5, en relaci6n con el control. Lo anterior podr6a estar indicando que la enzima actúa fisiol6gicamente a pH de 6.5 pero que al aislarla y cambiar el pH del entorno la actividad aumenta debido al entorno básiico que se genera en el ambiente. No se conocen reportes relacionados con los experimentos anteriores, por lo cual solo se puede afirmar que en preparaciones *in vitro*, le enzima tiene mayor actividad a pH básiico.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---



**Gráfica 1.** Efecto del pH sobre la actividad de la enzima GST.

La flecha indica la actividad de la enzima bajo condiciones control (pH 6.5).

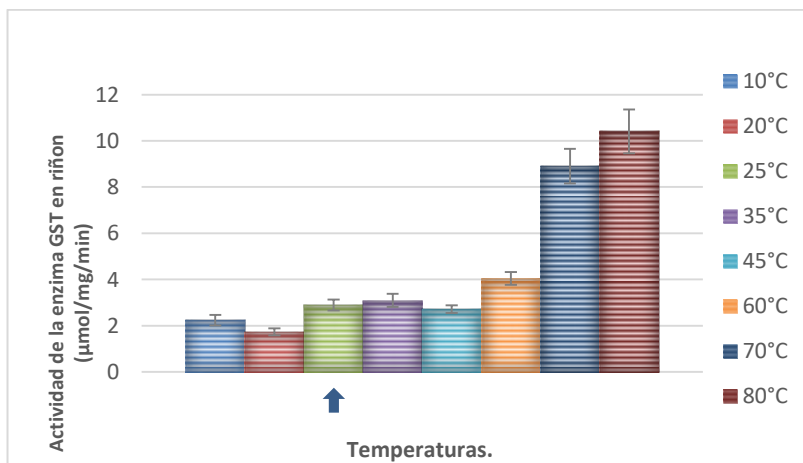
Tomando en cuenta la reacción catalizada por la enzima, estos resultados podrían indicar que, a pH ácido, al existir una alta concentración de protones, el ligando glutatión tendría menos posibilidades de ionizarse, por lo cual su unión con el sustrato disminuiría. Cuando va disminuyendo la concentración de protones (esto es a valores de pH más altos) el glutatión tendrá mayores posibilidades de ionizarse. De acuerdo a lo anterior, cuando el pH es básico, la concentración de protones disminuye y la concentración de iones hidroxilo aumenta, lo cual podría favorecer la ionización del glutatión y su unión con el sustrato, por lo cual la actividad enzimática aumentará, como se observa en la gráfica 1.

Por lo tanto, se puede decir que la reacción es favorecida a valores de pH básicos.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

## Medici6n de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a diferentes temperaturas de incubaci6n.

Uno de los factores f6sicos que m6s puede afectarla actividad de las enzimas es la temperatura. Para llevar a cabo este estudio se incubaron las muestras de corteza renal durante cinco minutos a las diferentes temperaturas y posteriormente se midi6 la actividad enzim6tica. La gr6fica 2 muestra los resultados obtenidos al incubar 5 minutos a 10, 20, 35, 45, 60, 70 Y 80 grados cent6grados. La actividad del grupo control se determin6 a 25°C y un pH de 6.5.



**Gr6fica 2.** Efecto de la temperatura sobre la actividad de la GST. La flecha indica la actividad enzim6tica en condiciones control a 25°C.

La gr6fica 2 muestra que, en relaci6n con el control, solo se observ6 un aumento de actividad al incubar la muestra a 60 (4.0 ± 0.9), 70 (8.2 ± 2.3), y 80 (10.2 ± 2.2) grados, lo cual podr6a indicar que esta enzima es termoestable. Posiblemente el aumento de temperatura provoc6 que la enzima adquiriera una mayor flexibilidad y por ello incrementara su afinidad por el ligando y el sustrato. A 35 (3.2 ± 0.9), y 45 (3.0 ± 0.4), grados no se observa un incremento significativo de la actividad en relaci6n con el control.

El aumento en la rapidez de reacci6n se produce, posiblemente, porque con temperaturas m6s altas, existen m6s mol6culas de sustrato con suficiente energ6a para reaccionar; la disminuci6n de la velocidad de la reacci6n es debida a la

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

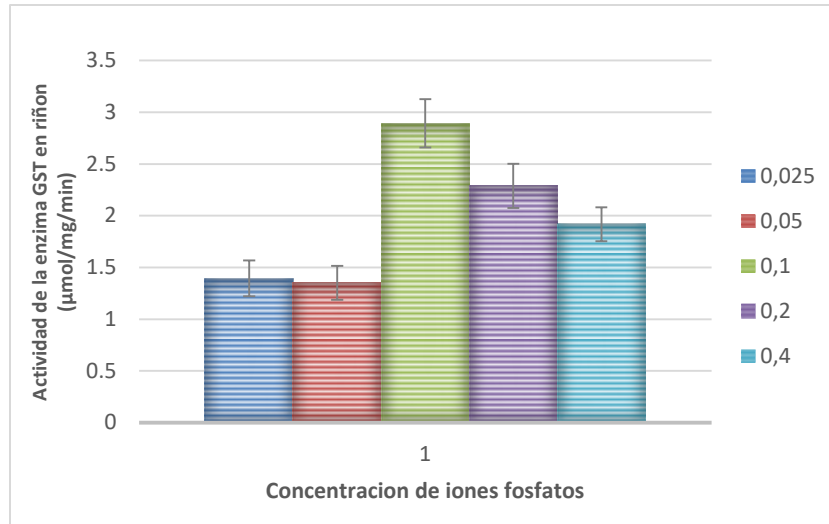
desnaturalización de la enzima (la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de 60 - 70°C) (Lehninger, 2006).

## **Medición de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a diferentes concentraciones de iones fosfatos.**

La gráfica 3 muestra el efecto de dos las concentraciones 25, 50, 100, 200 y 400 mM de fosfato en relación con el control, el cual se determinó a una concentración final de 100 mM. Se observó que, al disminuir la concentración de iones en el amortiguador de reacción, esto es con las concentraciones de 25 y 50 mM de fosfatos la actividad de la enzima disminuyó aproximadamente dos veces en relación con el control. A concentraciones mayores de iones fosfato (200 y 400 mM) se observó que de igual manera la actividad de la enzima disminuyó 1.9  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  en relación con la muestra control, pero que a comparación con las dos concentraciones de 25 y 50 la actividad a 200 y 400 es mayor.

Esto podría deberse a que al disminuir los iones se podría estar afectando la estructura terciaria de la proteína al igual que aumentando la concentración de estos. Se ha observado que muchas enzimas necesitan que para una correcta actividad enzimática la adición de cofactores, que son determinados iones minerales (magnesio, zinc, cobre, etc.). En algunos casos, los enlaces entre los iones y los radicales de ciertos aminoácidos ayudan a mantener la estructura terciaria o a estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína (Lehninger, 2006).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1



**Gráfica 3.** Efectos de la concentraci3n de iones sobre la actividad de GST.

En la estabilidad de las prote3nas est3n involucrados tanto aspectos termodin3micos como aspectos cin3ticos (Bisswanger, 2002). Una prote3na es termodin3micamente estable cuando el cambio de energ3a libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para el proceso de desnaturizaci3n es positivo y por tanto, desfavorable. As3, cuando en una prote3na se cumple que  $\Delta G > 0$ , a ciertas condiciones de temperatura, presi3n, concentraci3n y pH se dice que la prote3na es estable, lo que permite estudiarla *in vitro* desde muy diversos puntos de vista. Sin embargo, esta estabilidad termodin3mica no garantiza que la prote3na permanecer3 en el estado nativo (es decir, en el estado biol3gicamente funcional) por un tiempo ilimitado. Ello se debe a que las prote3nas en el estado nativo sufren alteraciones irreversibles que “vac3an” ese estado de manera dependiente del tiempo. Es decir, la estabilidad de la prote3na tiene tambi3n aspectos cin3ticos (Bisswanger, 2002).

En este contexto, es interesante se3alar que muchas de las acciones que realizamos para conservar a una prote3na en el estado nativo y poder entonces estudiarla (es decir la b3squeda del amortiguador y el pH adecuados, la conservaci3n mediante la precipitaci3n con sulfato de amonio, mantenerla a bajas temperaturas, etc3tera) tienen, de hecho, el prop3sito de reducir la cin3tica de desnaturizaci3n, de tal manera que el estado nativo se mantenga

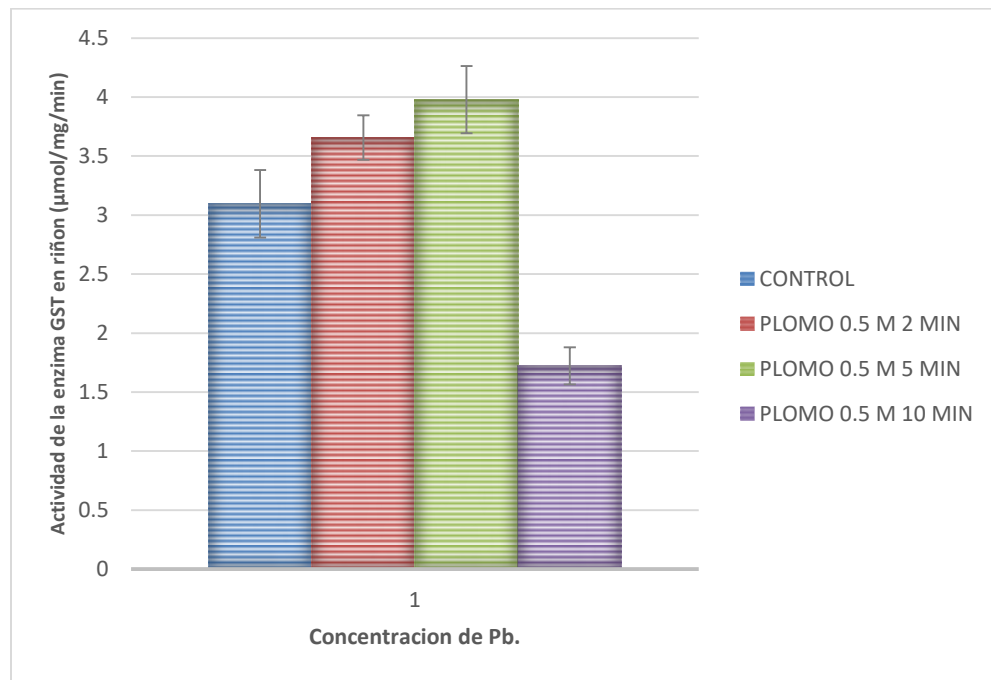
significativamente poblado por un período de tiempo que permita hacer experimentos con ella. Cuando una proteína permanece en el estado nativo funcional por un período de tiempo largo, se dice que es cinéticamente estable (Gutiérrez-Quezada, 2010).

No se han reportado estudios de cinéticas de inhibición de la GST por metales pesados, sin embargo, y como parte importante de este trabajo, se realizó el estudio del efecto que, la incubación con plomo tiene en la actividad de la enzima en condiciones estándares de medición.

## **Medición de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal incubados con una concentración de 0.05 M de acetato de plomo.**

La gráfica 4 muestra el efecto que tiene sobre la actividad la incubación de la enzima en presencia de una solución 0.5 M de plomo a diferentes periodos de tiempo de incubación. En ella se puede observar que la actividad de la enzima a los 2 y 5 minutos de incubación presenta una tendencia a aumentar, pero sin alcanzar el valor del control. A los 10 min de incubación la actividad de la Glutación S-transferasa disminuye aproximadamente un 53% ( $1.75 \pm 0.6$ ) con respecto al control ( $4.0 \pm 1.1$ ).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1



**Gráfica 4.** Efectos de la concentración de acetato de plomo sobre la actividad de la GST PI.

Posiblemente el efecto anterior se deba a que a los 10 minutos de incubación el plomo logró unirse a un número tal de sitios cargados negativamente dentro de la estructura cuaternaria de la enzima logrando disminuir la actividad. Esta disminución refleja un efecto inhibitorio del plomo sin embargo el tipo de inhibición que ejercería el metal no puede ser dilucidada con una sola concentración y tres tiempos de incubación. Para ello es necesario realizar más investigaciones variando concentraciones y tiempos de incubación, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que a 10 minutos de incubación de la enzima con plomo a una concentración final de 0.05 M la actividad enzimática es inhibida un 50 %.

En base a la idea anterior se realizó la medición de la actividad de GST incubándola con 1 M con los tiempos de incubación de 2, 5 y 10 minutos.

## **Efecto de la incubación de la enzima GST con una concentración final 1 M de acetato de plomo.**

En la gráfica 5 se muestra la actividad de la Glutación S-transferasa renal incubada

## Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

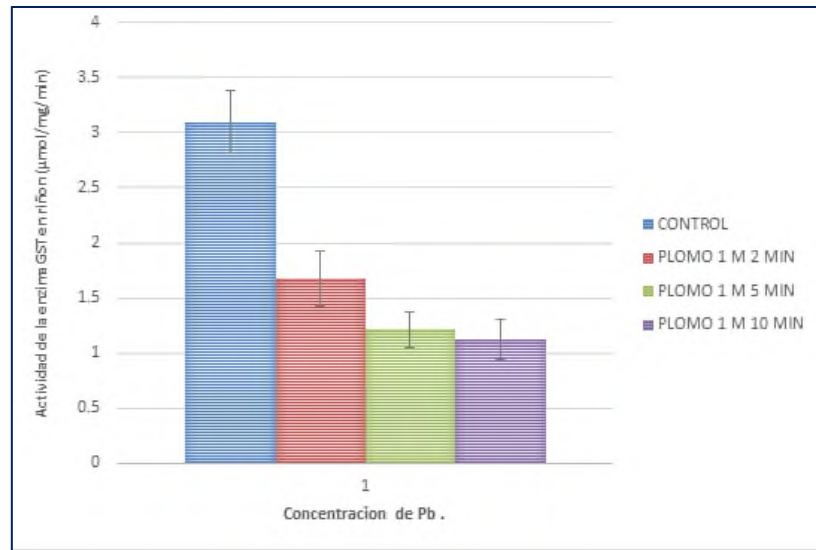
por 2, 5 y 10 minutos con una concentraci6n de acetato de plomo 1 M. Se puede observar que al cabo de 2 minutos de exposici6n con el metal, la actividad de la enzima disminuy6 un 50% ( $1.65 \pm 0.43$ ) con respecto a la muestra control ( $3.05 \pm 0.41$ ), a los 5 min la actividad disminuye m1s del 50 % ( $1.31 \pm 0.38$ ) y a los 10 min de incubaci6n la enzima muestra una actividad dos unidades menor ( $1.20 \pm 0.44$ ) con respecto a la muestra control.

Como observaciones generales en relaci6n con el efecto de una concentraci6n 1M de acetato de plomo se observa que a los 10 minutos de incubaci6n la actividad es inhibida en un 60%. Por ello se puede afirmar que la actividad de la enzima GST es inhibida al aumentar la concentraci6n de plomo que interactúa en la enzima por un periodo de incubaci6n de 10 minutos.

Con los experimentos anteriores se puede decir que la enzima pierde su actividad catalítica en presencia del plomo y es muy probable que la inhibici6n sea debida a las interacciones que el plomo puede establecer con algunos grupos ionizados que se encuentren en la enzima. Sin embargo, la posibilidad de encontrar grupos ionizados depender1 del valor de pH usado para realizar los experimentos, ya que los residuos de amino1cidos poseen un valor de pKa mismo que depende del pH. Dentro de los posibles grupos de uni6n con plomo se encuentran los grupos carboxilo y los grupos sulfhidrilo de la cisteína.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---



**Gráfica 5.** Efectos de la concentración de acetato de plomo sobre la actividad de la GST PI.

Como se observó en la gráfica 1, la actividad de la enzima aumenta a valores de pH básicos (8.5 y 9.5), lo que indica que los grupos carboxilo y sulfhidrilo se encuentran ionizados (con carga negativa) y constituyen sitios probables de unión con plomo (carga positiva).

## **Medición de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal incubando al glutatión reducido (GSH) por 5 min con acetato de plomo.**

Para continuar con el estudio del efecto que la incubación con plomo tiene sobre la enzima se procedió a realizar ensayos en los cuales se trató de bloquear al ligante glutatión con plomo y observar el efecto en la actividad de GST. Posteriormente se realizó la incubación de la enzima con plomo y se midió la actividad enzimática. Las observaciones fueron las siguientes.

1) Cuando se incubó el glutatión reducido con plomo por 5 min y se midió la actividad se encontró que el efecto no fue significativo, lo cual puede indicar que, bajo estas condiciones, el glutatión no logró unirse al plomo de manera significativa, por lo que la enzima pudo catalizar su reacción de manera normal. Se ha reportado que el plomo puede unirse a GSH por lo cual la actividad de la enzima se podría ver afectada (Wang, 1993).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

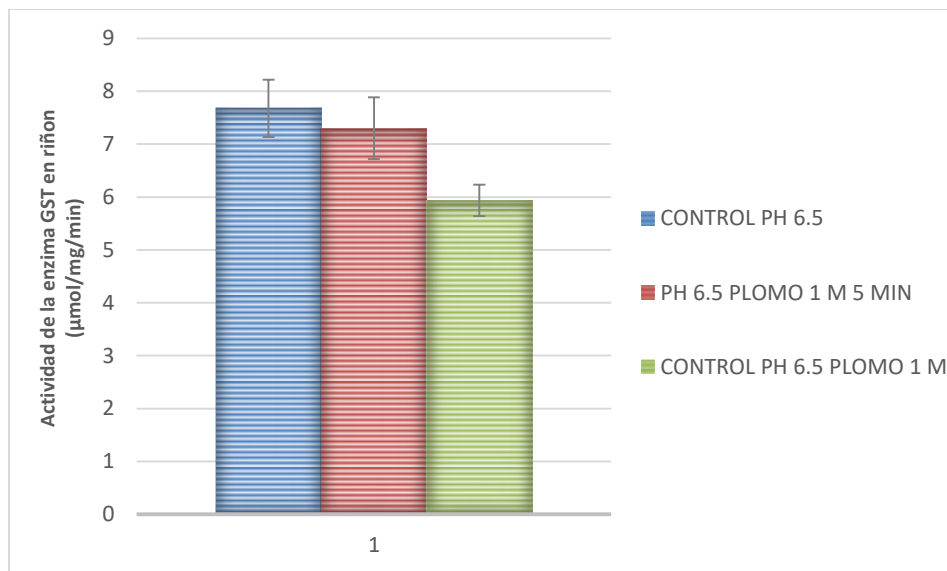
---

2.) Cuando se incub6 la enzima con plomo por dos minutos se observ6 una disminuci6n de 1.5 unidades de actividad la GST con respecto al control. Este resultado puede sugerir que bajo estas condiciones el metal posee mayor afinidad por los sitios de uni6n localizados en la enzima que por el glutati6n reducido.

La gr6fica 6 muestra los resultados mencionados anteriormente.

Analizando el comportamiento de la enzima en los ensayos experimentales se puede afirmar que la enzima GST es una prote6na que cataliza su reacci6n (usando al 1-cloro-2,4-dinitrobenceno) tanto en condiciones est6ndar (pH 6.5, 24 grados cent6grados y 0.1 M de fosfatos) como en otras condiciones. Se observ6 que su actividad aumenta tanto a temperaturas elevadas como a valores de pH b6sicos. El efecto de la exposici6n a plomo depende de la concentraci6n de plomo utilizado y del tiempo de exposici6n y que la incubaci6n de glutati6n con plomo no altera la actividad de la enzima.

Finalmente se llev6 a cabo un estudio variando el pH de incubaci6n estableci6ndolo a un valor de 1 con la finalidad de bloquear los sitios carboxilo y medir el efecto de la exposici6n a plomo.

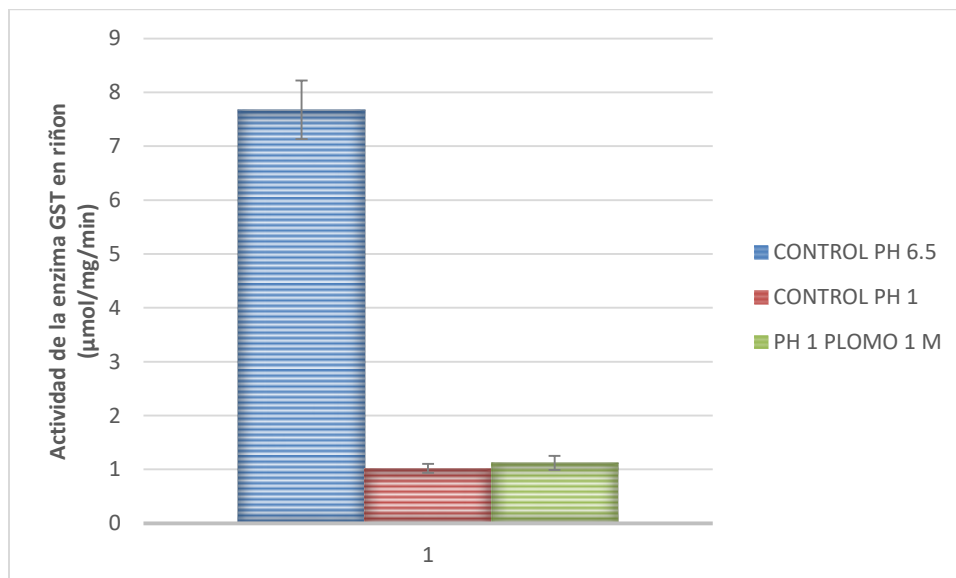


**Gr6fica 6.** Efectos de la actividad de la GST PI encubando GSH reducido con acetato de plomo a una concentraci6n de 1 M por 5 min.

## Medición de la actividad de GST en homogenizados de corteza renal a pH 1.

Para evaluar el efecto del bloqueo de los posibles sitios de unión (que deben encontrarse ionizados a pH 6.5) se evaluó la actividad de la enzima usando un amortiguador de fosfatos con pH de 1 con el propósito de protonar todos los grupos sulfhidrilo y carboxilo, que posiblemente hagan factible la actividad enzimática. La gráfica 7 muestra los resultados encontrados tanto en la actividad normal como al incubar con plomo. En ambos casos la actividad disminuyó aproximadamente el 90 % en relación con el control ( $7.7 \pm 0.87$ ), sin incubar con plomo ( $1.1 \pm 0.07$ ) e incubando con plomo ( $1.0 \pm 0.05$ ).

Se sabe que entre los factores que afectan la actividad de las enzimas se encuentra el pH. Según las curvas de pH de muchas enzimas existe un pH óptimo, en el caso de la GST el pH de medición es de 6.5 aunque los resultados de este trabajo indican que la actividad aumenta a valores básicos y disminuye a valores ácidos. Podría ser que los sitios se encuentren protonados o que la enzima se encuentre desnaturizada a estos valores de pH por lo cual la disminución resultó muy notoria.



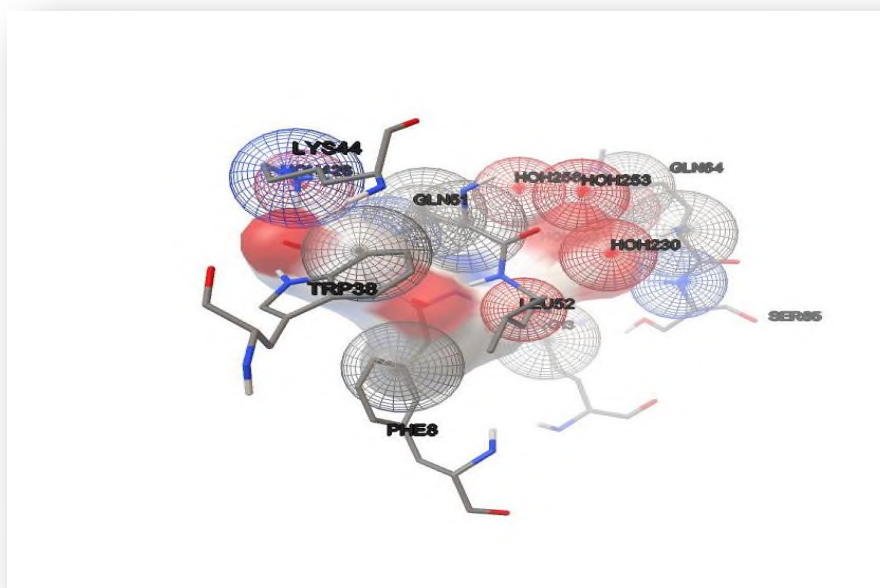
**Gráfica 7.** Actividad de Glutación S-transferasa a pH 1 en ausencia y presencia de plomo.

## RESULTADOS COMPUTACIONALES. SISTEMA *IN SILICO*.

### Acoplamiento molecular.

Se realizó el acoplamiento molecular de los compuestos Glutación reducido (GSH), 1,4-dinitroclorobenceno (DNCB) y del complejo glutatióndinitrobenceno (GDN) con la enzima Glutación S-transferasa (GST).

La Figura 13 muestra la interacción que tiene el ligando GSH reducido con los diferentes aminoácidos de la proteína. Los resultados indican que estos aminoácidos son el triptófano en la posición 38 de la cadena polipeptídica (Trp 38), la leucina 52 (Leu 52), la lisina 44 (Lys 44) y la serina 65 (Ser 65). Los criterios que se evaluaron para tomar en cuenta esta interacción fueron la menor energía de Gibbs de la proteína y el sitio en donde existen mayor número de aminoácidos (clúster más poblado) que puedan interactuar con el ligando (GSH).



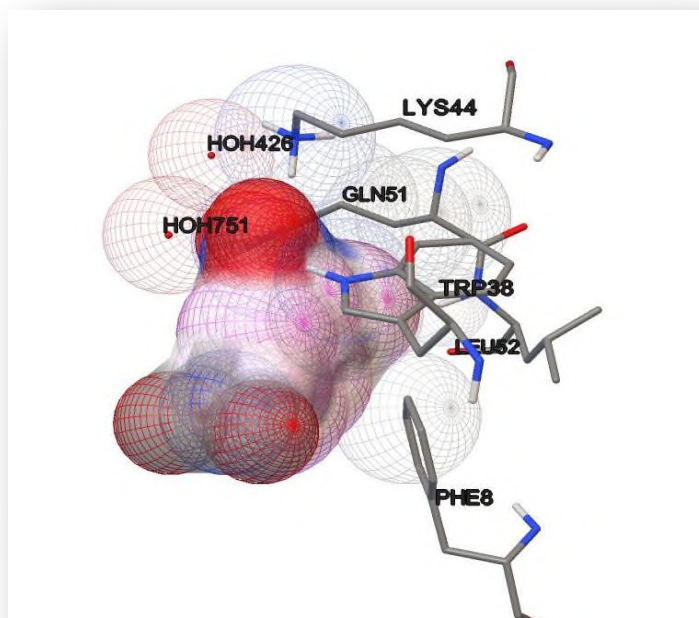
**Figura 13.** Interacción de residuos de la enzima con el glutatió (GSH).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

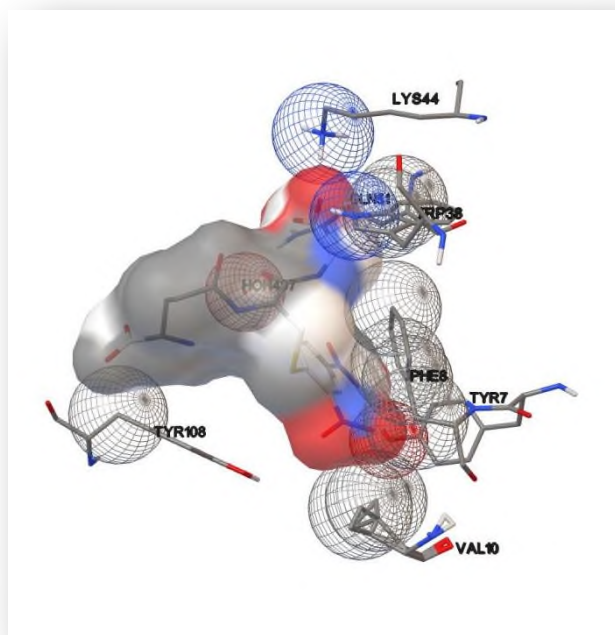
---

La Figura 14 muestra los resultados de la realización del acoplamiento molecular de la enzima GST P1 y el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB). En esta imagen se aprecia que los residuos de la proteína que interactúan con el sustrato son el triptófano 38, la lisina 44 y la glutamina 51. Esto indica que la interacción de glutatión reducido y DNCB con la enzima coinciden en dos residuos de aminoácidos, indicando que esta región está involucrada posiblemente con la zona catalítica de la enzima o bien representa un sitio probable de unión de los compuestos que participan en la reacción enzimática.

La interacción entre los residuos de aminoácidos y el complejo ligante-sustrato, al cual se le ha nombrado glutatión dinitro cloro benceno (GDN) se muestran en la Figura 15. Los residuos de aminoácidos implicados son la lisina 44, el triptófano 7, el triptófano 38 y la glutamina 51. Estos datos podrían ayudar a soportar la idea de que este lugar es el sitio en el cual se esta llevando a cabo la actividad enzimática.



**Figura 14.** Interacción de residuos con 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB).



**Figura 15.** Interacción de residuos con el complejo ligante-sustrato (GDN).

La Tabla 1 muestra los diferentes residuos de aminoácidos que interaccionan con el ligando (GSH), el sustrato (DNCB) y el complejo (GDN) así como la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ). El valor negativo de la energía libre indica que la reacción es favorable termodinámicamente al ser espontánea. Esto podría sugerir que en ese sitio se favorecerá la formación del complejo ternario ENZIMA-GSH-DNCB.

**Tabla 1.** Residuos de aminoácidos implicados en la unión de GSH, DNCB y GDN con la GST y la energía libre involucrada.

ENZIMA	LIGANDO	RESIDUO	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)
GST P1	GSH	Trp 38, Lys 44, Leu 52, Ser 65	-7.0
GST P1	DNCB	Trp 38, Lys 44, Gln 51	-6.5
GST P1	GDN	Tir 7, Trp 38, Lys 44, Gln 51	-8.0

A partir de las coordenadas obtenidas del acoplamiento molecular del ligante, el sustrato y el complejo de formación con la enzima GST P1 se realizó una dinámica

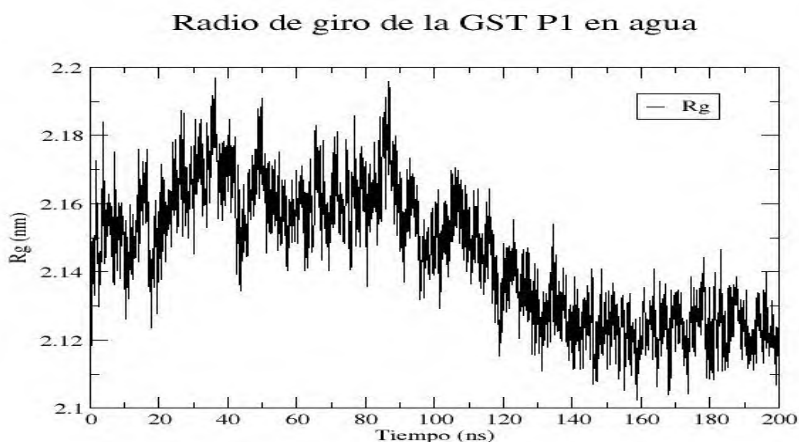
molecular para evaluar el comportamiento enzimático al interactuar con estos componentes. Los resultados se muestran a continuación.

## DINAMICA MOLECULAR

Se realizó la dinámica molecular entre el ligante, el sustrato y el complejo ligante-sustrato con la enzima Glutación S-transferasa P1. Los diversos aspectos analizados dentro de esta dinámica, así como los resultados obtenidos se muestran a continuación.

## ANÁLISIS DE LA GST P1 EN AGUA.

En la figura 16 se puede observar el radio de giro de la GST P1. El radio de giro indica la elasticidad que tiene la proteína en función del tiempo. En la figura se puede apreciar como al inicio, la enzima poseía un radio de giro inicial que oscilaba entre 2.14 y 2.18 nm. Este radio de giro se conservó así hasta los 100 nanosegundos (ns) y con ello se puede observar como la elasticidad de la proteína fue bajando y a partir de los 140 ns se vio como el radio de giro osciló entre 2.1 y 2.12 nm. Este comportamiento mostró que al parecer se estaba estabilizando, ya que al final se comprobó que el radio de giro se conservó oscilando así hasta los 200 ns.



**Figura 16.** Radio de giro de la GST P1 en agua

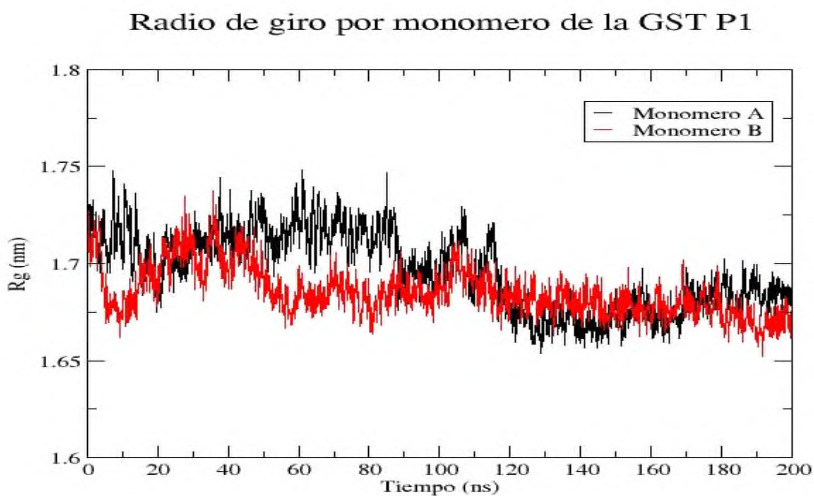
# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

Los resultados anteriores mostraron el comportamiento de la enzima en condiciones normales indicando que existe un movimiento de la misma cuando se enfrenta a sus ligantes naturales.

Las enzimas son macromoléculas que tienen movimientos debido a que deben de interactuar con sustratos, cofactores y/o coenzimas que interactúen normalmente con ellas para llevar a cabo su actividad. Los datos encontrados mediante los estudios de dinámica molecular anteriores han demostrado los probables sitios de unión de los ligantes con la enzima a las condiciones empleadas para su estudio.

Se sabe que la GST es una enzima dimérica, por lo cual también se hicieron los análisis de radio de giro por monómero esto con la finalidad de ver el comportamiento enzimático por monómero y así tener idea de que monómero se mueve más respecto al otro y los resultados se muestran en la figura 17.



**Figura 17.** Radio de giro de la GST P1 por monómero

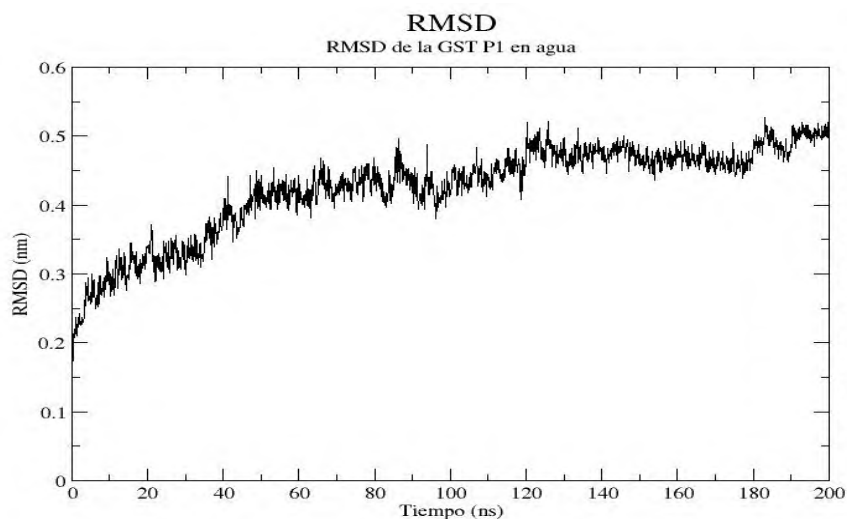
La figura 17 indica que al inicio de la dinámica el monómero A presentaba un radio de giro ligeramente mayor al del monómero B, dicho cambio se notó más en los 10 nanosegundos; a los 20 nanosegundos se observó que el radio de giro de los monómeros A y B fue relativamente igual. De los 50 hasta los 80 ns, se vio que el monómero A se volvió ligeramente más elástico que el monómero B. Después de

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

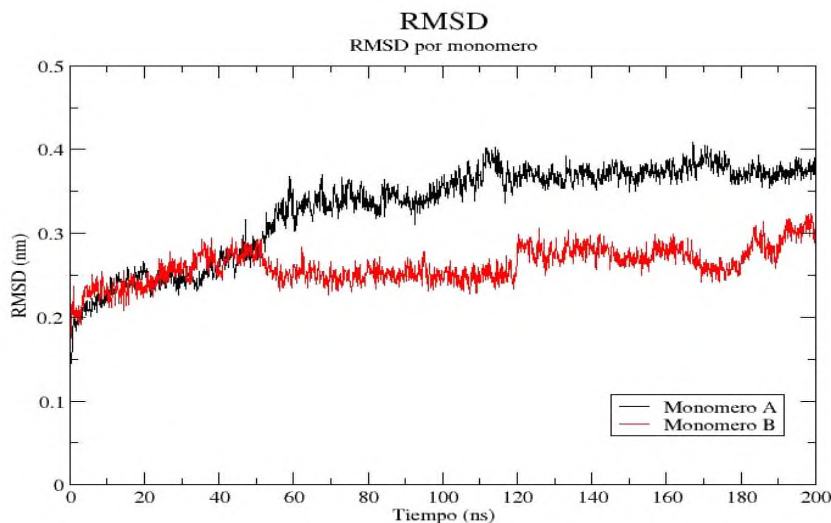
ese tiempo los monómeros al parecer vuelven a estar ligeramente iguales hasta los 200 ns lo que podría estar indicando que la proteína se está relajando y llegando a su punto de equilibrio termodinámico.

Como parte del estudio de la proteína en agua se calculó el desplazamiento cuadrático medio o mejor conocido como RMSD (de sus siglas en ingles Root Mean Square Displacement) de toda la proteína, esto con la finalidad de ver que tanto se estaba moviendo la proteína con respecto a la original. Los resultados que se obtuvieron fueron los mostrados en la figura 7.



**Figura 18.** Desplazamiento cuadrático medio de la GST PI

En la Figura 18 se aprecia un RMSD muy alto (0.5 nm), el cual indica que la proteína se está moviendo mucho con respecto a la estructura original. Debido a lo anterior se calculó el RMSD por monómero para poder discernir que monómero fue el que causó que el RMSD fuera alto.



**Figura 19.** RMSD de la GST P1 por monómero

En la Figura 19 se muestra el RMSD por monómero y se puede observar que en el monómero A oscila entre 0.3 a 0.4 nm con respecto a la estructura original, mientras que en el monómero B el RMSD está entre 0.2 y 0.3 lo cual podría indicar que el monómero A se mueve más que el monómero B y esto se ve reflejado en el cálculo del radio de giro por monómero que se encuentra en la gráfica 4. Esta gráfica nos dice que en el monómero A hay mayor elasticidad que en el monómero B, esto nos ayuda a reforzar la idea de que la enzima GST P1 es una enzima cooperativa es decir que los monómeros trabajan en conjunto para cumplir su función común.

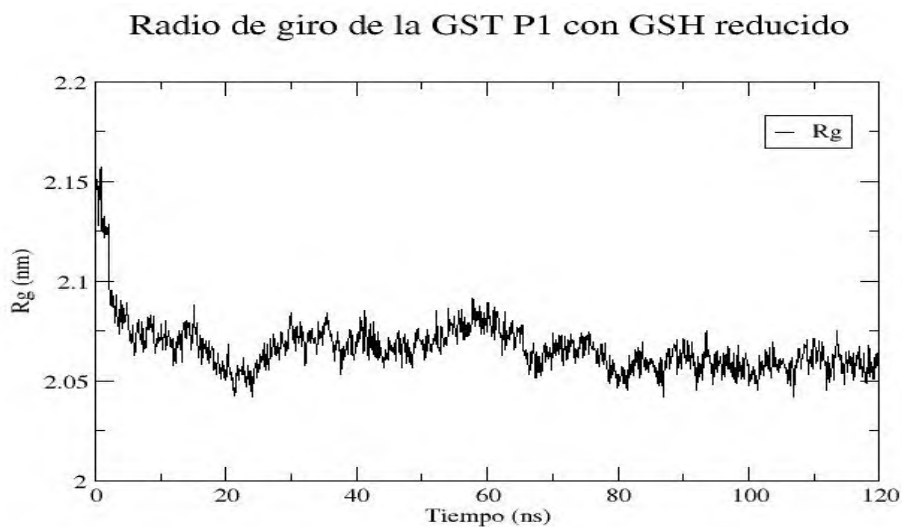
Los análisis que se hicieron para la enzima GST P1 fueron para evaluar el comportamiento que tiene la proteína en agua por un determinado tiempo y saber qué cambios conformacionales podrían tener. Lo anterior resulta de importancia ya que, como se sabe, las enzimas actúan en un ambiente celular que se encuentra inmerso en un medio acuoso, y depende de las concentraciones de iones, el pH y la temperatura usada. El agua tiene importancia ya que envuelve los sitios cargados o con densidades de carga para protegerlos o para facilitar reacciones,

es por ello que estos resultados nos indican el papel que juega este compuesto en la actividad de la enzima.

## ANÁLISIS DE LA GST P1 CON GSH

Se simuló la interacción del glutatión reducido (GSH) con la enzima GST P1, a un tiempo de 120 ns, con la finalidad de evaluar el comportamiento que tiene la proteína con su ligante y los resultados se muestran a continuación.

Se realizó un cálculo de radio de giro para evaluar que tanta elasticidad tenía la enzima con respecto a este ligante. En la Figura 20 se observa el radio de giro de la GST P1, se puede observar que fluctúa entre 2.05 y 2.06 nm lo cual indica que la proteína se vuelve más flexible cuando interacciona con el ligando GSH con respecto a su estado sin ligando. Al principio la proteína empieza con un radio de giro de 2.15 nm, pero al cabo de 5 ns aproximadamente baja a 2.1 nm y al cabo de los 20 ns solamente está fluctuando entre 2.05 y 2.06 nm lo cual lleva a pensar que está cerca de su estado de equilibrio termodinámico.

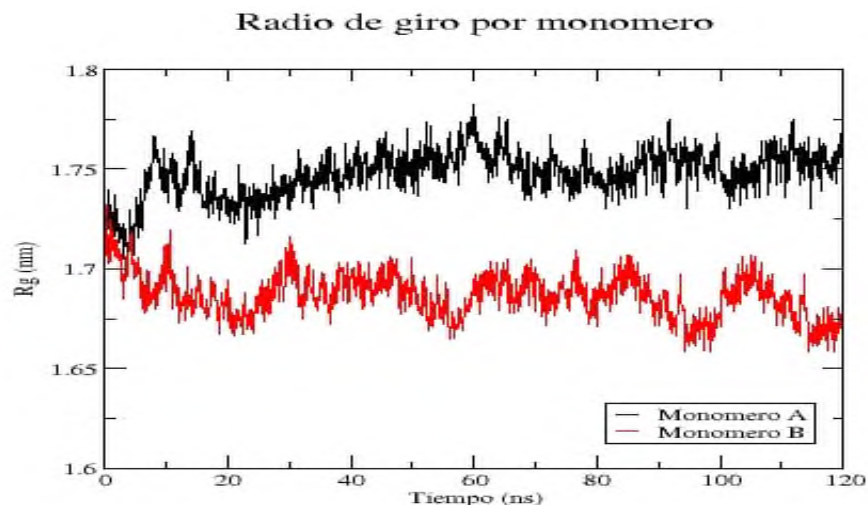


**Figura 20.** Radio de giro de la GST P1 con GSH reducido.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

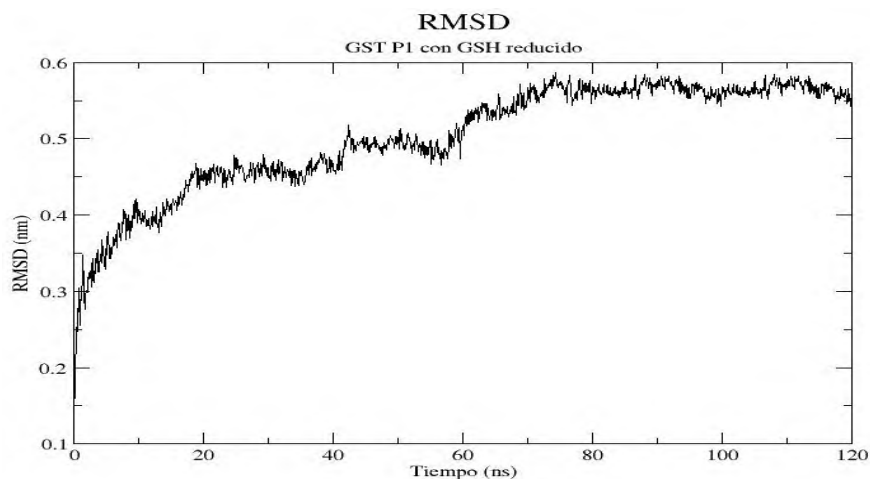
De igual manera de cálculo el radio de giro por monómero para evaluar la flexibilidad por monómero. La figura 21 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 21.** Radio de giro de la GST PI con GSH por monómero

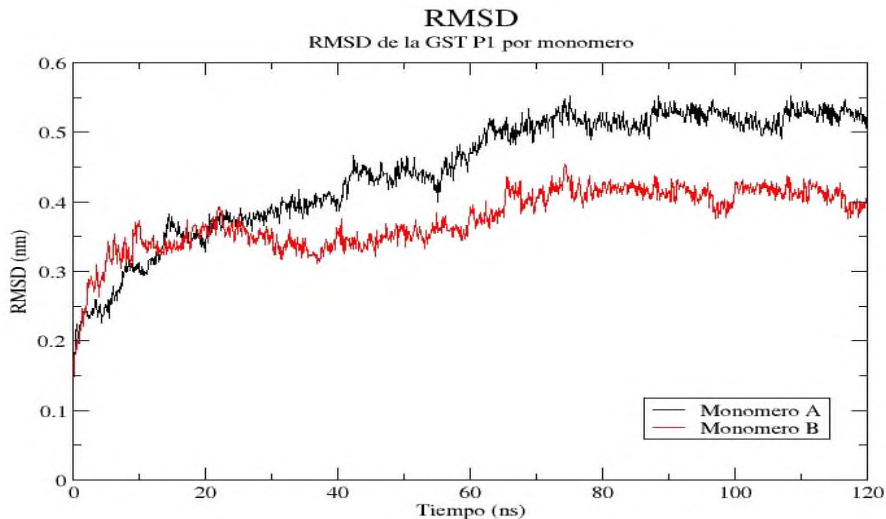
En la Figura 21 se aprecia el radio de giro por monómero de la proteína; en ella se puede observar que en el monómero A existe mayor flexibilidad que en el monómero B, esto debido a que el glutatión reducido está interaccionando con la región del sitio activo del monómero A, lo cual explica que en ese monómero halla mayor movimiento de flexibilidad. Estos resultados pueden explicarse si se tiene en cuenta que las GST es una enzima dimérica, la cual podría tener una actividad de tipo cooperativa lo que indica que uno de los monómeros debe unir primero a una molécula de sustrato y de esta manera inducir al segundo monómero para que active su sitio catalítico y reciba a la segunda molécula de sustrato (Lehninger, 2006).

Posteriormente se realizó el cálculo del RMSD de toda la proteína para saber si había una variación con respecto a la original y los resultados se muestran en la figura 10



**Figura 22.** RMSD de la GST P1 con glutatión reducido

En la Figura 22 se puede observar que el RMSD de la GST-P1, al estar interaccionando con su ligando GSH, se desplaza más hacia arriba con respecto a la gráfica original, lo cual indica que hay un efecto causado por el ligando en la enzima, por lo que el RMSD aumentó de 0.2 nm hasta oscilar entre los 0.5 y 0.6 nm, por lo que se realizó el cálculo de RMSD por monómero y de esta manera observar que región estaba causando ese efecto. Los resultados se muestran en la Figura 23.

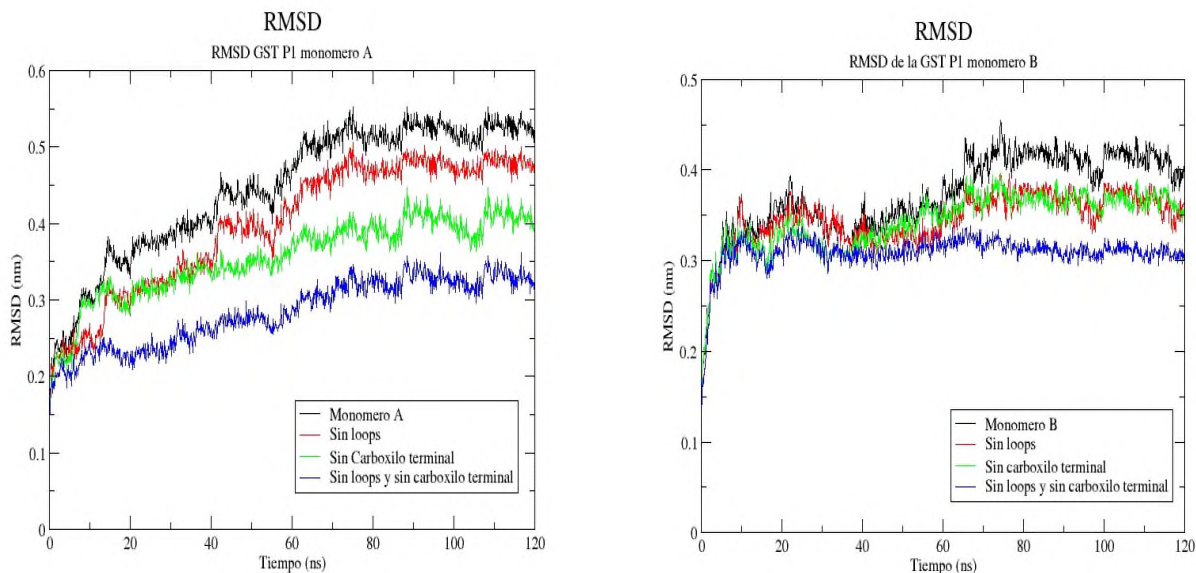


**Figura 23.** RMSD de la GST P1 con glutatión reducido por monómero

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

En la figura se puede observar que en el monómero A el RMSD fluctúa entre 0.4 y 0.5 nm indicando la flexibilidad que tiene ese monómero con respecto al monómero B en quién su RMSD se mantiene prácticamente por debajo de los 0.4 nm debido, posiblemente, a la fuerte presencia que tiene el glutatión reducido con respecto a la enzima.

En la Figura 24 se muestra la comparación de los RMSD por monómero, en ella se pueden observar que, en el monómero A los loops y los carboxilos terminales, son los causantes de que el RMSD sea superior a los 0.5 nm. Se calculó un RMSD sin los loops y los carboxilos terminales cercanos al sitio activo y el RMSD pasó de 0.2 a 0.3 nm, mientras que en el monómero B al calcular el RMSD sin los loops y carboxilos terminales se mantienen completamente estable en 0.3 en comparación con el monómero A. Todo esto sugiere que hay una interacción fuerte entre el ligando, la periferia que rodea al sitio activo y el mismo sitio activo.

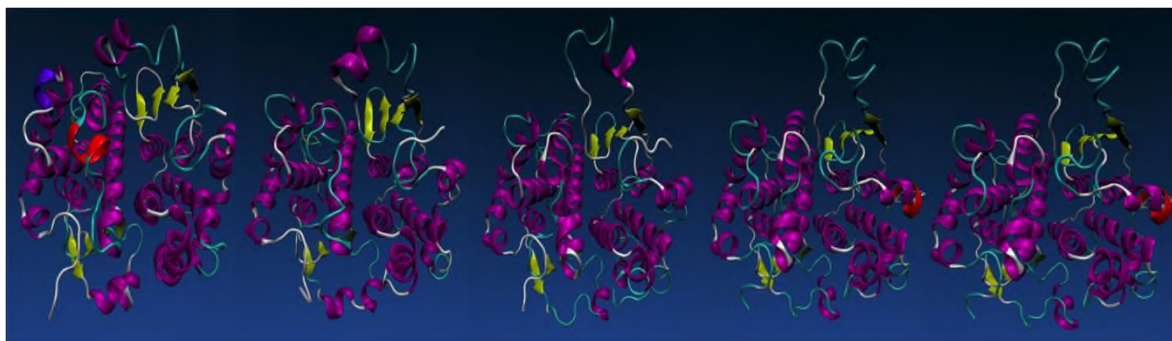


**Figura 24.** RMSD de la GST PI con GSH reducido sin loops y sin carboxilos terminales por monómero

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

En la Figura 25 se muestra el comportamiento que tiene la proteína al interaccionar con el ligante GSH, se observa que en el monómero A hay un cambio significativo en el sitio más probable de interacción, se observa como el hueco del sitio activo se va haciendo más flexible y esto es debido a que el ligante es electrofílico, provocando así que los loops y los carboxilos terminales se vuelvan más flexibles.



**Figura 25.** Monitoreo de la GST PI en función del tiempo de exposición.

Los resultados anteriores soportan la idea de que la enzima GST es, muy probablemente una proteína dimérica y que el monómero A es el primero que se mueve para iniciar la catálisis enzimática, induciendo así la activación del monómero B. Esta enzima tiene un ligante y un sustrato y su reacción consiste en unir el sustrato con el ligante, por lo cual es lógico pensar que si tiene dos sitios activos entonces el primero deberá inducir la actividad del segundo. Esta idea es soportada por los resultados encontrados hasta el momento.

## **Calculo del potencial electrostático de la GST PI con glutatión reducido.**

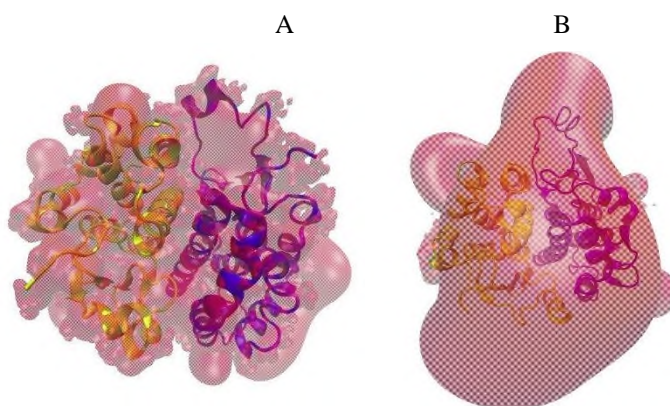
Para determinar las cargas negativas y positivas de la enzima para poder determinar el sitio más probable de interacción de la proteína con sus ligantes.

Se calculó el potencial electrostático de la GST PI a 20 y a 100 ns. Las observaciones obtenidas se muestran en la Figura 25. En ella se muestra el modelo a 20 ns (A) y a 100 ns (B), cada modelo está compuesto por dos

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

monómeros de los cuales la parte que representa al monómero A esta de color morado y la que representa al monómero B esta de color amarillo, las cargas negativas son representadas con un color rosa transparente. En la parte izquierda de la primera imagen que se encuentra la proteína a 20 ns en ella se puede observar que las cargas son uniformes, pero que a partir de los 100 ns las cargas negativas aumentan en función del tiempo de interacción con el glutatión reducido; esto se debe, posiblemente, al cambio conformacional que tiene la proteína al interactuar con el ligante, haciendo que en la región del sitio activo que se encuentra en el monómero A sea más flexible dejando expuesto al sitio más probable de interacción dejando así la entrada a las moléculas de agua, que están en la caja de simulación.

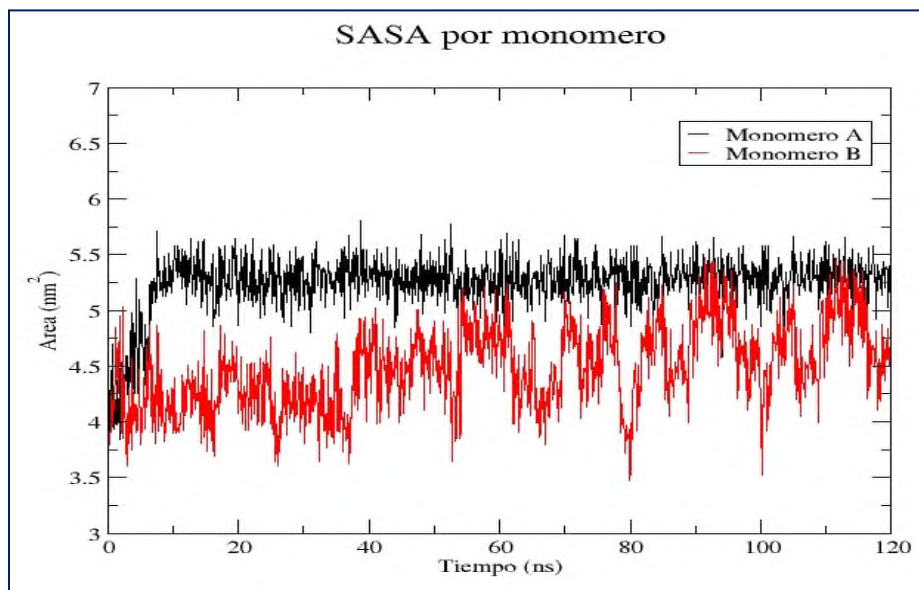


**Figura 26.** A) Cálculo de potencial electrostático de la GST P1 a 20 ns B) Cálculo de potencial electrostático de la GST P1 a 100 ns.

Para estar más seguros de en qué región había más entrada de moléculas de agua. Se calculó el área accesible al solvente (SASA) para el sitio activo del monómero A y para el monómero B.

Los resultados mostrados en la Figura 26 indican que el sitio activo del monómero A presenta una mayor área accesible al solvente que el monómero B y no solo eso sino también se mantiene estable, coincidiendo con el radio de giro y el análisis de RMSD, indicando que es posible que haya una relación con la superioridad de las cargas negativas en esa región. Al revisar en la bibliografía no se han encontrado

reportes tan a fondo del comportamiento de los monómeros de la enzima empleando los tres análisis realizados en este trabajo de investigación, por lo cual se puede afirmar que la enzima tiene un comportamiento ordenado que puede corresponder al mecanismo propuesto en la parte introductoria de este trabajo.



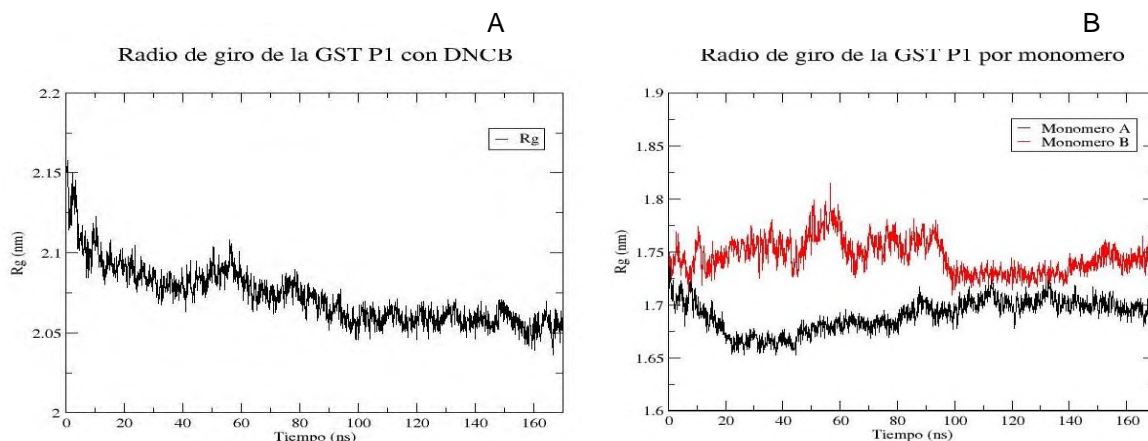
**Figura 27.** Área accesible al solvente de la GST P1 por monómero

## **ANÁLISIS DE LA GST P1 CON DNCB**

Se simuló la interacción el sustrato DNCB con la proteína GST P1 para observar el cambio conformacional que tiene la proteína con el sustrato, se calculó el radio de giro del dímero y también se calculó el radio de giro por monómero, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---



**Figura 28.** A) Radio de giro de la GST P1 con el sustrato DNCB; B) Radio de giro de la GST P1 por monómero con el sustrato DNCB.

En la figura 28 A) se observa el radio de giro del dímero y se observa que conforme pasa el tiempo de simulación el radio de giro va disminuyendo es decir que la proteína se está cerrando, posiblemente como consecuencia de la interacción con el sustrato DNCB; en la figura 28 B) se observa el radio de giro por monómero en el cual vemos que en el monómero A la flexibilidad es menor que en el monómero B y esto es debido a que el sustrato es hidrofóbico lo cual explica que en esa región el monómero A sea menos flexible que el monómero B.

Se calculó el RMSD por monómero de igual manera que en caso anterior y los resultados indican que para ambos monómeros el RMSD es relativamente igual para los dos monómeros (figura 29).

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

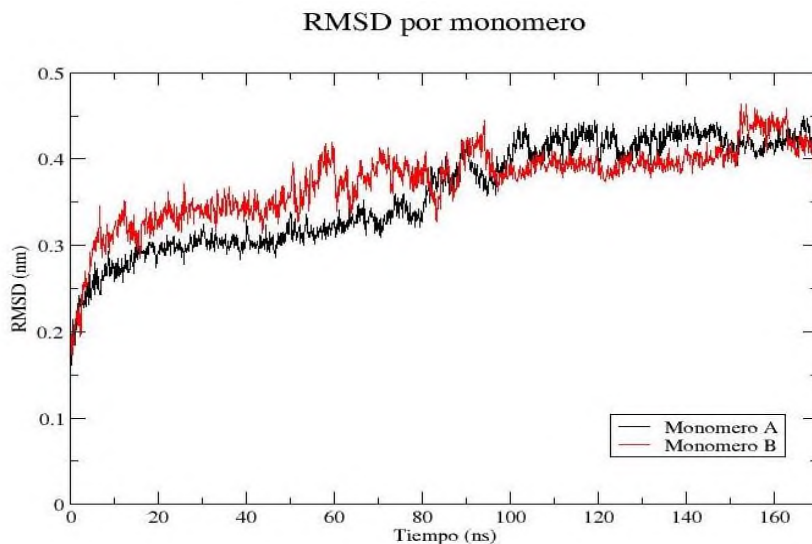


Figura 29. RMSD de la GST PI interaccionando con el DNCB por monómero.

De manera adicional se calculó el RMSD para los dos monómeros sin los loops y los carboxilos terminales para cada monómero.

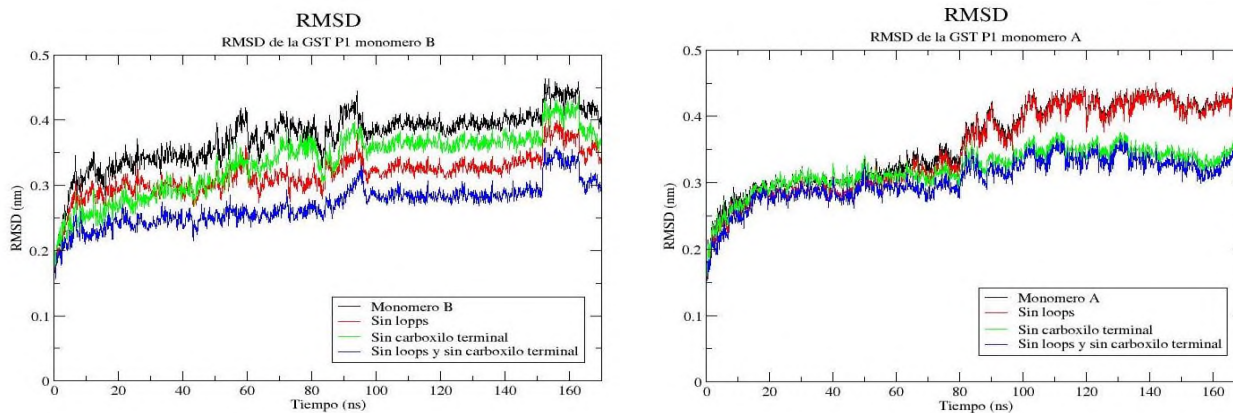


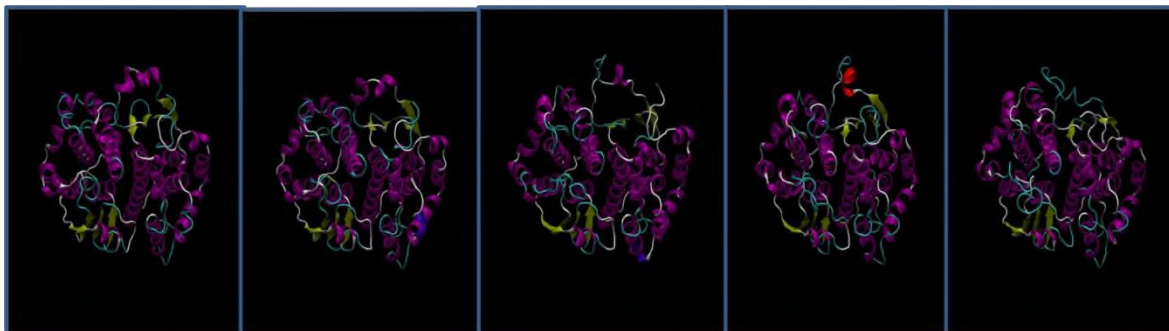
Figura 30. RMSD de la GST PI con el DNCB sin loops y sin carboxilos terminales por monómero

En la Figura 30 se muestran los RMSD sin los loops y los carboxilos terminales por monómero observándose que, en el monómero A, partir de los 80 ns, el RMSD es estable con lo que se comprueba que en realidad la proteína no se sale del centro de la caja si no que los loops y carboxilos terminales son los causantes de que el desplazamiento de la proteína este en los 0.4 nm. Para el monómero B se

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

observa que existe un mayor desplazamiento cuadrático medio debido, posiblemente, a que en esa región el monómero es más flexible con ese sustrato en comparación a la simulación de la GST PI con su ligante GSH reducido.



**Figura 31.** Monitoreo de la GST PI en función del tiempo de exposición.

En la Figura 31 se observa como la proteína no cambia mucho respecto a la original, pero hay un cambio conformacional en la región del monómero A, es posible que el sitio activo de la proteína se esté cerrando debido a la interacción que tiene el DNCB con la proteína, cabe señalar que este sustrato es hidrofóbico y es por tal motivo que se esté cerrando el sitio activo.

## **Cálculo del potencial electrostático de la GST P1 con el DNCB.**

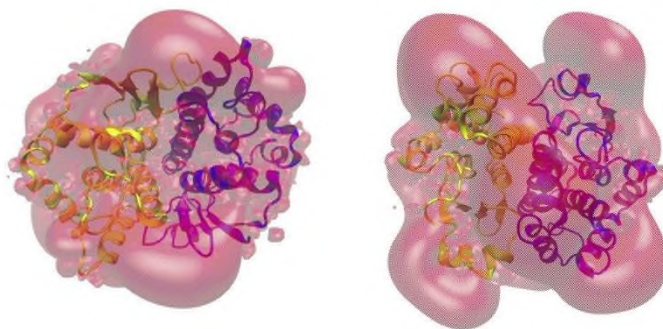
En la Figura 32 se observan los modelos obtenidos mediante el cálculo del potencial electrostático de la enzima GST P1, cada modelo está compuesto por dos monómeros de los cuales la parte que representa al monómero A esta de color morado y la que representa al monómero B esta de color amarillo, las cargas negativas están representadas con un color rosa transparente.

Al calcular el potencial electrostático de la enzima con el sustrato DNCB, se observó que las cargas negativas a los 20 ns son uniformes (figura 32 A) pero en la Figura 32 B las cargas se distribuyen mayormente en la región del monómero B, y es probable que las cargas negativas se distribuyan así, ya que en la región del sitio más probable de interacción se encuentra el sustrato DNCB. Este sustrato es hidrófobo y lo que está haciendo es que en la región del monómero A se esté

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

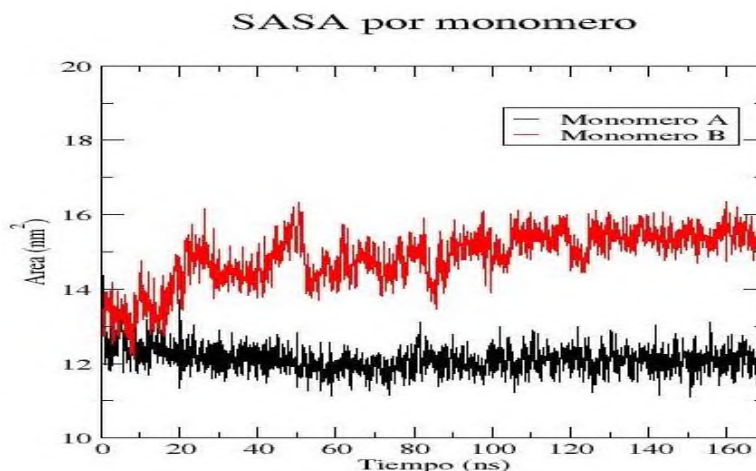
---

cerrando el sitio activo y exista más actividad en la región del monómero B lo cual indica el aumento en las cargas negativas.



**Figura 32.** A) Cálculo de potencial electrostático de la GST PI a 20 ns. B) Cálculo de potencial electrostático de la GST PI a 100 ns.

La entrada de las moléculas de agua a los sitios de cada monómero se puede explicar calculando el área accesible al solvente por monómero. El resultado de este cálculo se muestra en la figura 33.



**Figura 33.** Área accesible al solvente por monómero

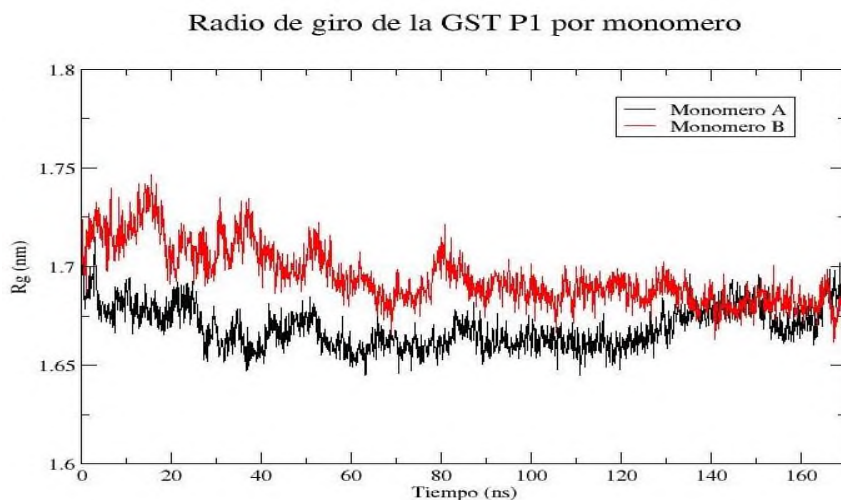
Para la región del monómero A se observa que el SASA del sitio activo se mantienen prácticamente estable oscilando en los 12 nm<sup>2</sup>, mientras que para el monómero B el SASA va aumentando oscilando entre los 14 y los 16 nm<sup>2</sup> Lo

anterior explica por qué hay mayor carga negativa en el monómero B.

## ANÁLISIS DE LA GST P1 CON GDN

En la tercera simulación con la enzima GST P1 con el complejo de formación glutatióndinitrobenceno, se calculó el radio de giro de la GST P1.

En la Figura 34 se observa que el radio de giro por monómero de la GST P1 posee mayor flexibilidad en el monómero B, al principio, que en el monómero A. A partir de los 140 ns se ve que el radio de giro de los dos monómeros es similar; estos monómeros tienen un radio de giro similar hasta los 170 ns, lo cual indica que la proteína podría estar llegando a su estabilidad. El cálculo de radio de giro de la GST P1 con el GDN es similar al radio de giro de la GST P1 con DNCB, y su comportamiento no es similar al cálculo de radio de giro con el GSH reducido.

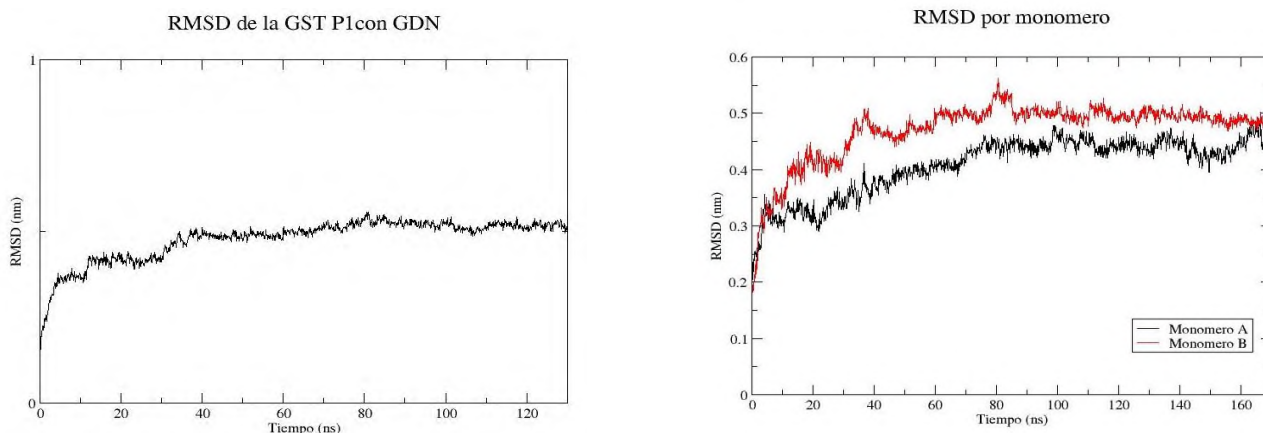


**Figura 34.** Radio de giro de la GST P1 por monómero.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

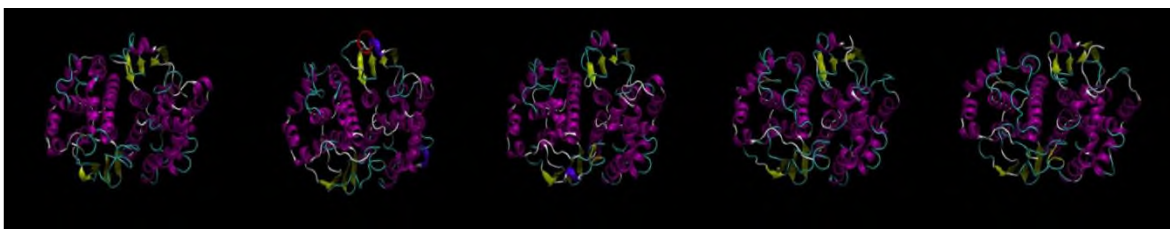
---

Se calculó también el RMSD de la proteína con GDN y los resultados se muestran en la figura 35.



**Figura 35.** A) RMSD de la GST PI con GDN; B) RMSD de la GST PI por monómero.

En la primera gráfica se muestra un RMSD de la GST PI en el cual se observa que la proteína se mueve un poco con respecto a la original pero no es un RMSD alto como los demás cálculos, y esto se podría deber a que el glutatión dinitrobenceno no está muy cercano a la enzima ya que es el producto resultante entre el GSH reducido y el DNCB que es el sustrato, por el cual el GDN es muy grande para estar tan dentro del sitio más probable de interacción, y es por ello que el RMSD de la proteína es estable, el RMSD para la proteína en general es de 0.5 nm. La segunda gráfica muestra los resultados del cálculo del desplazamiento cuadrático medio por monómero para ver que monómero estaba moviéndose más con respecto a la original, y se observó que en el monómero B se movió ligeramente más que el monómero A. Este cambio se observó a los 5 ns, posteriormente a partir de los 160 ns se observó que el RMSD de los monómeros volvieron a coincidir.



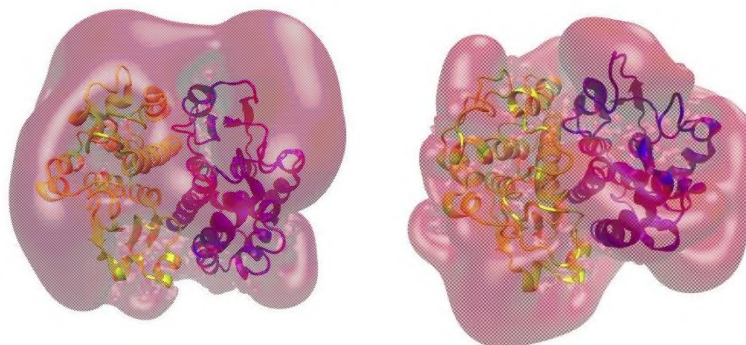
**Figura 36.** Monitoreo de la GST PI en función del tiempo de exposición

En la Figura 36 se observa que no hay mucha diferencia en el cambio conformacional de la GST PI con respecto a la original, solo se aprecia que hay un ligero cambio en la región del monómero A en el sitio más probable de interacción, en el cual se observa que en la cavidad del sitio activo se está abriendo conforme pasa el tiempo de simulación.

### **Calculo del potencial electrostático de la GST P1 con el GDN.**

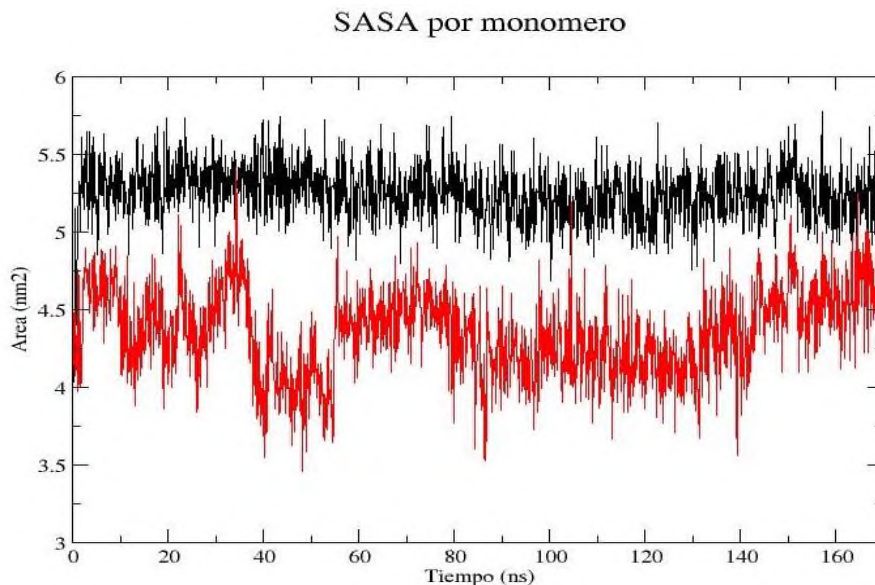
Se calculó de igual manera el potencial electrostático de la proteína, para saber en qué región del dímero había más carga negativa y los resultados obtenidos se muestran en la figura 37.

En la Figura se observan las cargas negativas que se encuentran en el monómero B en mayor proporción que en el monómero A; en la región del sitio activo hay menor carga negativa; en la figura se observa que las cargas negativas se sitúan en la parte inferior del dímero en proporciones iguales.



**Figura 37.** A) Calculo de potencial electrostático de la GST PI a 20 ns. B) Cálculo de potencial electrostático de la GST PI a 100 ns.

Se calculó el área accesible al solvente por monómero para los sitios más probables de interacción y los resultados se muestran en la figura 38.



**Figura 38.** Área accesible al solvente de la GST PI por monómero.

En la Figura 38 se puede distinguir una mayor cantidad de solvente en el monómero A que en el monómero B y de hecho la cantidad de solvente resulta estable a comparación con el monómero B, el SASA para el monómero A oscila entre los 5 y 5.5 nm<sup>2</sup> y para el monómero B entre los 4 y 4.5 nm<sup>2</sup>. Lo anterior resulta normal ya que en la región del sitio activo está el complejo de formación GDN. Por lo tanto, el sitio activo se encuentra más abierto que en la región del monómero B.

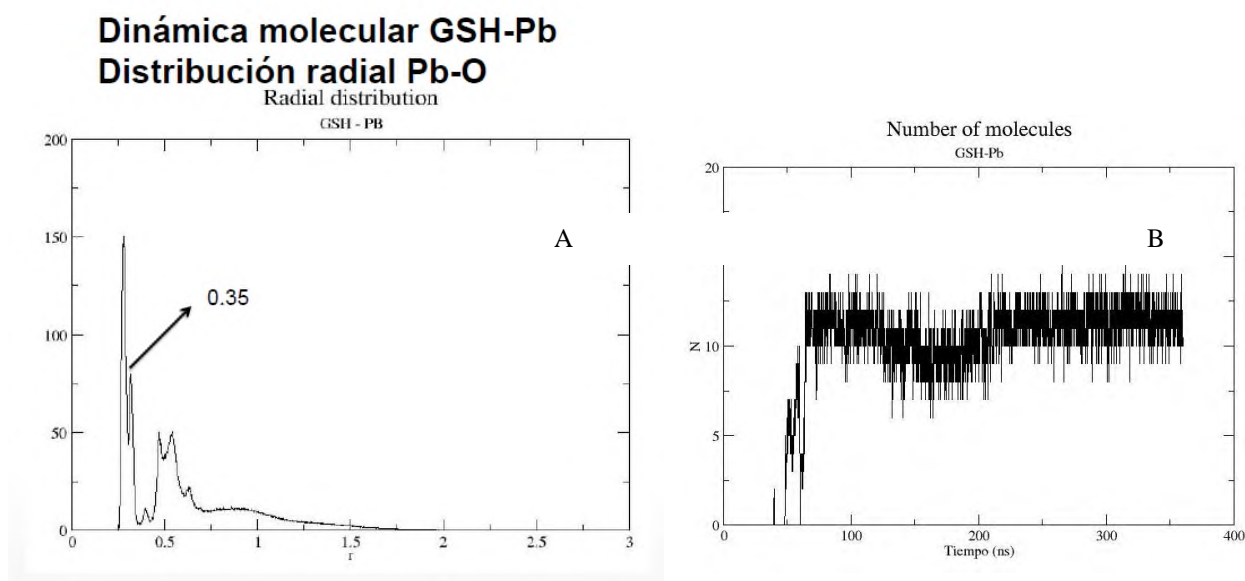
Los resultados de los análisis anteriores indican que es probable que el plomo interactúe con la enzima en el sitio activo, ya que es ahí donde se concentra la mayor carga negativa para las tres simulaciones, por lo cual se optó por realizar la cuarta dinámica molecular de la GST PI con el ion plomo.

## Dinámica molecular de plomo con glutatión reducido (GSH).

Como primer paso se realizó un estudio de dinámica molecular de la interacción entre el plomo y el glutatión reducido debido a que el metal puede unirse también con el GSH al formar enlaces con el grupo sulfhidrilo.

Los campos de fuerza utilizados para el plomo fueron tomados del artículo de Johnson (2006). Y fueron adaptados para ser usados en GROMACS

En la Figura 39 se muestra el cálculo de la distribución radial entre la molécula de GSH y el plomo siendo el valor encontrado de 0.35 Å lo cual indica que el plomo está muy cercano y que si podría llegar a interaccionar con el GSH. De manera se realizó un cálculo de número de moléculas el cual nos arroja que 10 moléculas de GSH están interaccionando con el plomo.

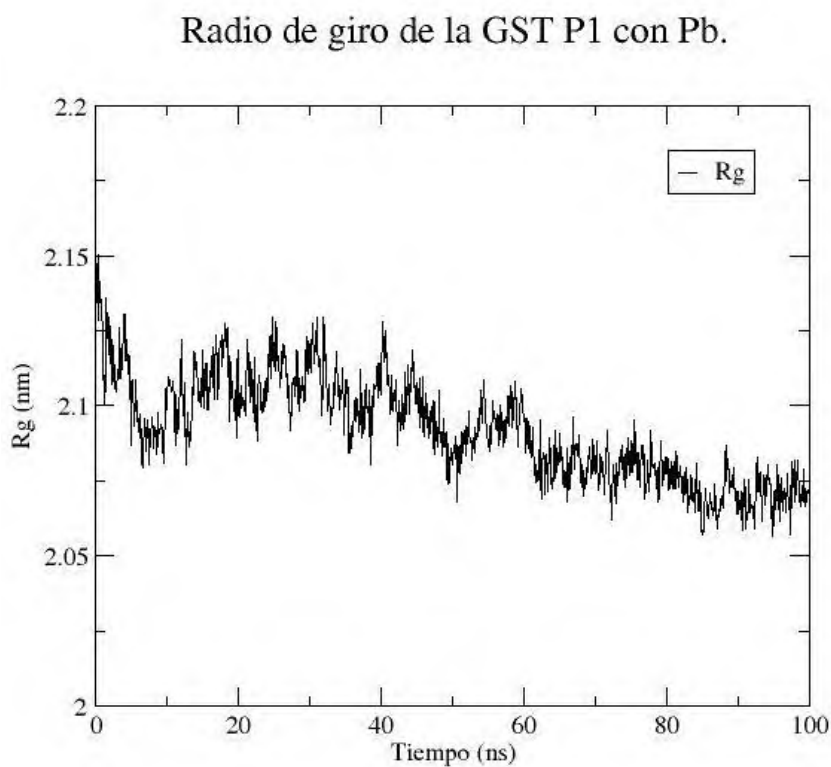


**Figura 39.** Dinámica molecular de plomo y glutatión (A) y número de moléculas de glutatión unidas a plomo (B).

Posteriormente se realizó una dinámica molecular del plomo con la enzima GST P1 a 100 ns ubicando al plomo cerca del sitio activo para observar el comportamiento del plomo con respecto a la enzima y los resultados fueron los siguientes.

## Radio de giro de la GST P1 con el Pb.

La Figura 40 muestra el radio de giro de la proteína con respecto al plomo indicando que la proteína al inicio comienza con un radio de giro de 2.15 y que, al avanzar los ns, la proteína va cerrando su sitio activo y al cabo de 100 ns se aprecia que la proteína sigue cerrando su sitio activo debido a que la proteína interacciona con la carga negativa del plomo. Es necesario decir que el plomo fue simulado muy cerca al centro activo para optimizar el tiempo de simulación.



**Figura 40.** Radio de giro de la enzima Glutación S-transferasa con plomo.

Posteriormente se realizó el mismo análisis para cada monómero, recordando que la enzima es una proteína dimérica. Esta figura pone de manifiesto que el monómero A comienza a tener un cambio estructural que se manifiesta como una abertura del sitio activo frente al plomo, y que a partir de los 60 ns esta apertura se cierra, posiblemente al llegar a un punto en el que la proteína aumenta su afinidad con el metal y es por ello esta cierra de su radio de giro. El monómero B se

mantiene ligeramente constante durante todo el proceso que ocurre en el monómero A. Esta unión del plomo en el sitio activo puede deberse a que en el sitio activo se encuentran cargas negativas procedentes de aminoácidos capaces de unir al metal. La Figura 40 muestra estos resultados.

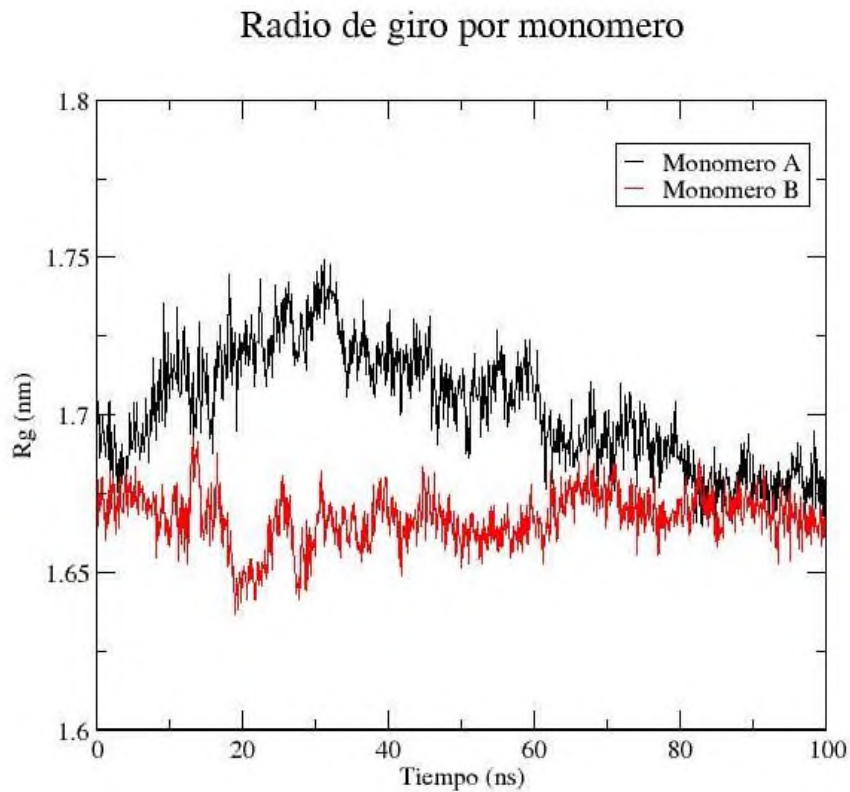
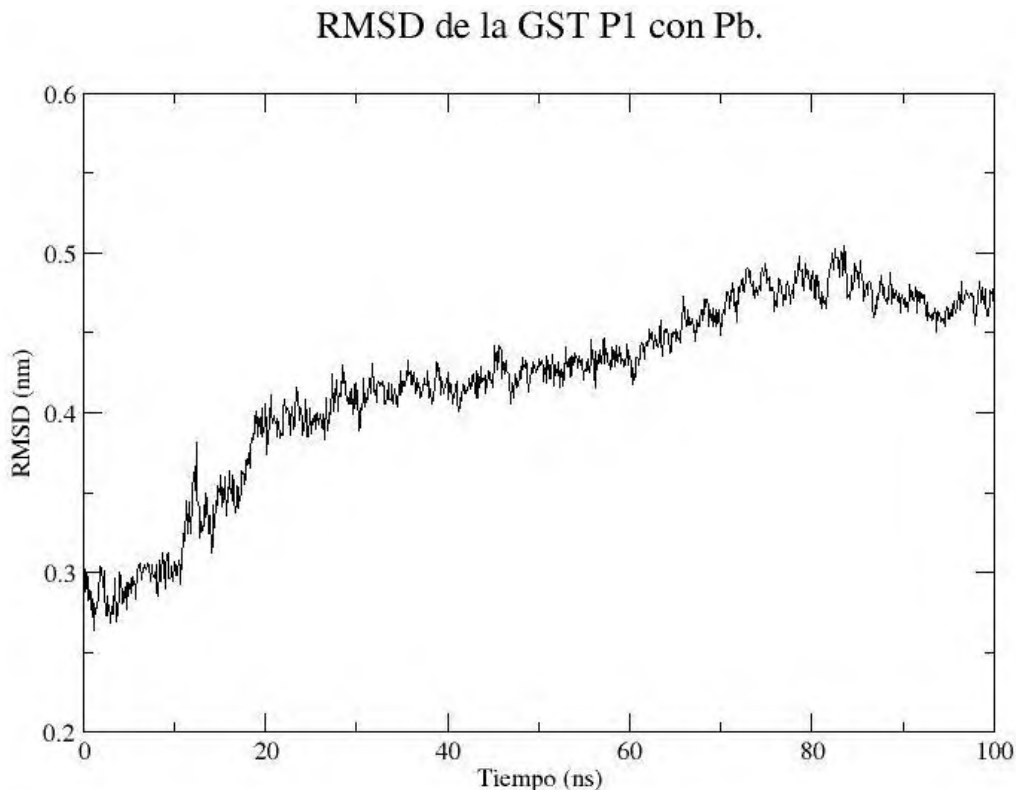


Figura 41. Radio de giro de entre la enzima Glutación S-transferasa y el plomo en los monómeros A y B

### **Desplazamiento cuadrático medio (RMSD) de la proteína con plomo.**

El RMSD es un procedimiento en el que se calcula cuanto se mueve la proteína con respecto a su centro. Este cálculo se muestra en la Figura 41 y en ella se puede ver que la proteína originalmente se encuentra a 0.28 nm al inicio de la simulación y que, al paso del tiempo, se aprecia que la proteína va desplazándose hasta llegar a los 0.45 nm. Lo anterior indica que la proteína se ve afectada por su cercanía al plomo, quien induce un cambio en su radio conformacional y origina

que la proteína se mueva de forma vibracional hasta que se mueve de su eje. La figura 42 muestra el RMSD relacionando los nm y el tiempo en ns.



**Figura 42.** Desplazamiento cuadrático medio de la Glutación S-transferasa en presencia de plomo.

Para continuar con el estudio de este fenómeno, se realizó la medición por monómero. La figura 31 muestra que el monómero B presenta un desplazamiento mayor al del monómero A, lo que puede deberse a que el plomo posee mayor interacción en la cisteína del monómero B.

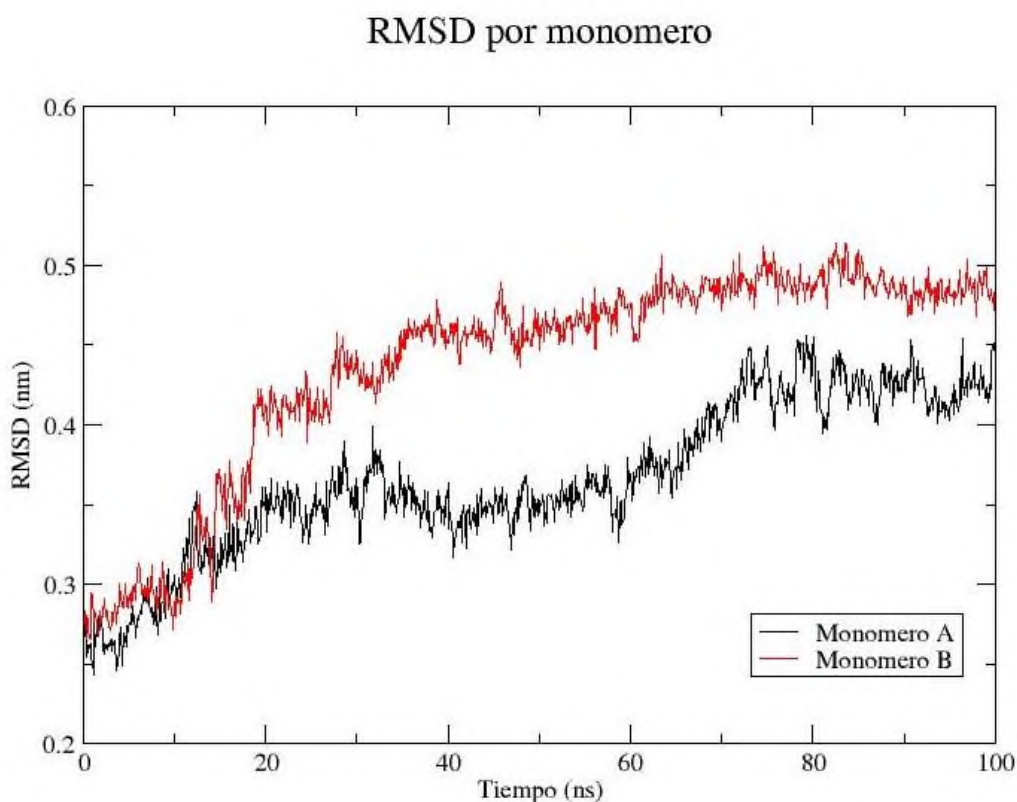
El plomo es un metal pesado que interacciona con las cargas negativas de las proteínas formando enlaces covalentes, por lo cual las actividades pueden disminuir o, en algunos casos, ser inhibidas, como muchas en las que ha sido demostrado que este metal ejerce ese efecto.

El hecho de que el plomo se una a cada uno de los monómeros en sitios en los cuales existen grupos cargados negativamente indica, muy probablemente, que la

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

actividad de la enzima disminuya. Cuando se realizaron las mediciones de actividad en presencia del metal se observ6 que, efectivamente, al incubar las muestras de enzima con plomo, la actividad disminuy6 en funci6n de la concentraci6n y el tiempo de exposici6n a plomo. La GST es una enzima dim6rica posiblemente cooperativa en donde, el plomo origina una inestabilidad que se puede explicar por su uni6n a ella cambiando su radio de giro e induciendo la uni6n del metal a la macrom6lcula. Es importante saber que el hecho es que el plomo se une a un sitio importante que causa la disminuci6n de la prote6na debido a que esta uni6n es secuencial. La Figura 43 muestra los resultados del RMSD por mon6mero.



**Figura 43.** Desplazamiento cuadrático medio del plomo con cada mon6mero de la prote6na.

## Calculo de potencial electrostático.

Se calculó el potencial electrostático de la proteína con la finalidad de analizar las cargas negativas de la GST y, con ello, confirmar la carga negativa neta en el sitio activo. La Figura 44 demuestra que en la proteína existen muchas más cargas negativas (color rojo) que positivas (color azul) en el sitio activo. Estas cargas pueden corresponder a grupos sulfidrilo de las cisteínas y a los grupos carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico que a pH fisiológico se encuentran ionizados. Estos resultados indican que si se bloquean estos sitios es muy probable que la actividad sea inhibida o se disminuya su actividad considerablemente.

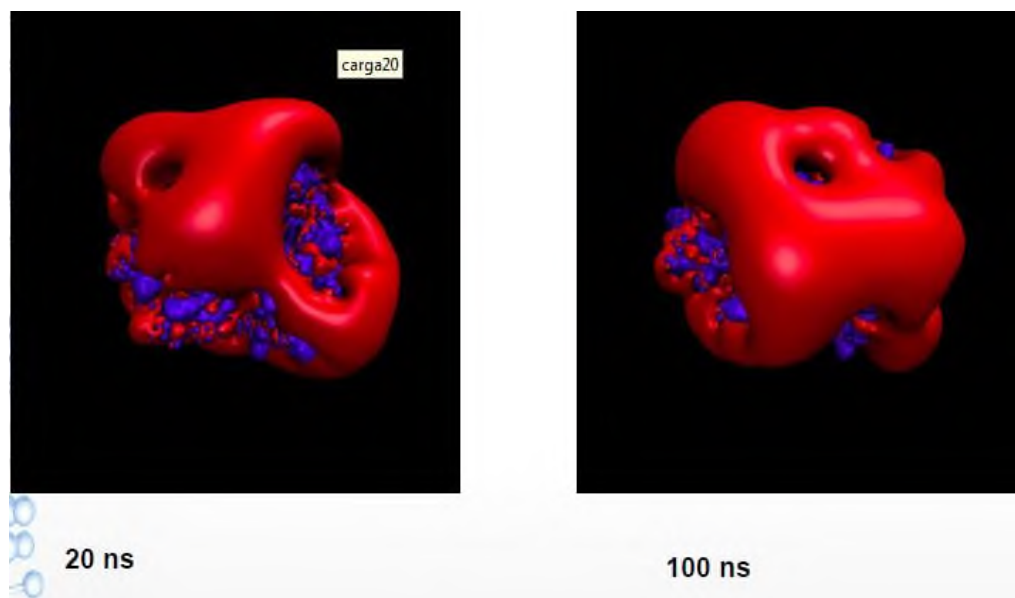


Figura 44. Potencial electrostático del sitio activos de la Glutación S-transferasa.

De manera adicional se analizó la accesibilidad al solvente de la proteína al ser simulada con plomo y se aprecia que hay gran cantidad de moléculas de agua dentro de ella hasta  $5 \text{ nm}^2$ . Este dato es importante debido que, en general, las reacciones químicas se llevan a cabo en ambientes acuosos dentro de las células y dependen, de la misma manera, de las condiciones de pH y temperatura. Los sustratos y los inhibidores entran en juego de manera solvatada y dentro del sitio activo se lleva a cabo la reacción desprendiendo las moléculas de solvente al

momento de la misma. El hecho de que la proteína se encuentre solvatada indica que la simulación es correcta y que los resultados encontrados anteriormente están reflejando de manera correcta las condiciones en las cuales la reacción se lleva a cabo de manera fisiológica dentro de la célula. La Figura 45 muestra las mediciones llevadas a cabo en ambos monómeros y compara el área y el tiempo en ns.

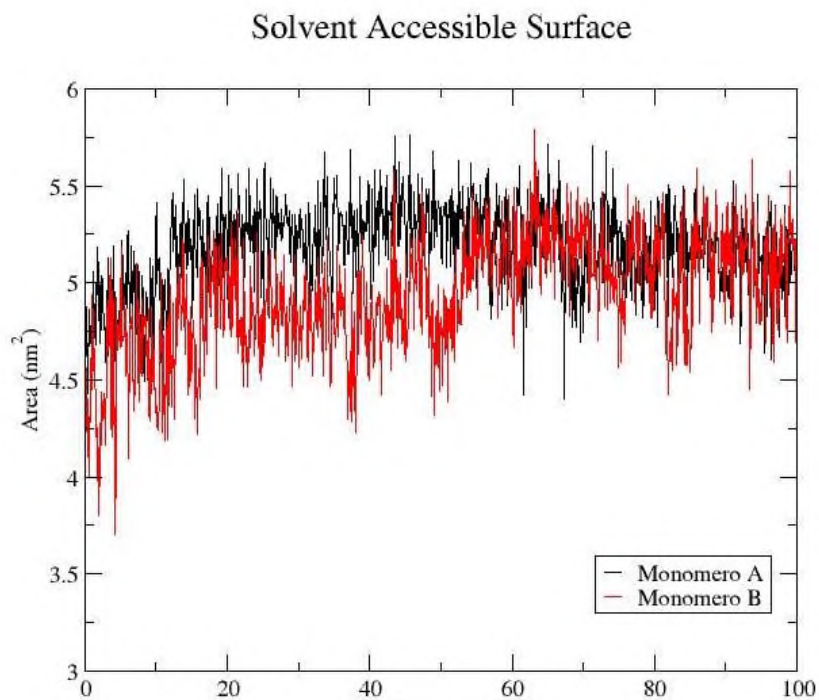
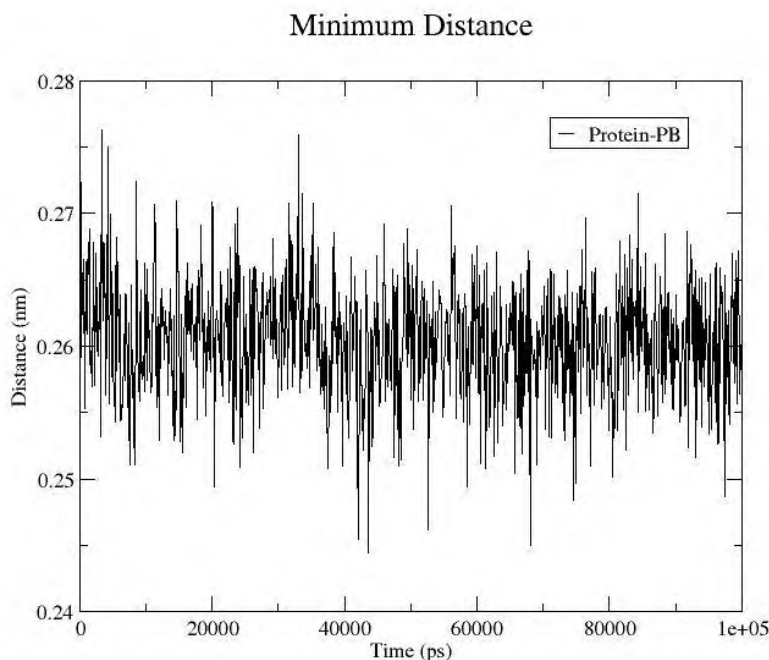


Figura 45. Solvatación de los monómeros A y B de la Glutación S-transferasa.

### **Distancia mínima entre el Pb y la proteína**

Se calculó la distancia mínima entre la proteína y el plomo con el objetivo de analizar la cercanía del plomo a la proteína y como resultado se encontró que el plomo presenta una distancia constante con de 0,26 nm con respecto a la enzima, por lo cual se deduce que el metal esta interaccionando con alguno de los aminoácidos en el sitio activo de la GST P de manera constante y sin separarse de ella. La Figura 46 muestra los resultados obtenidos.

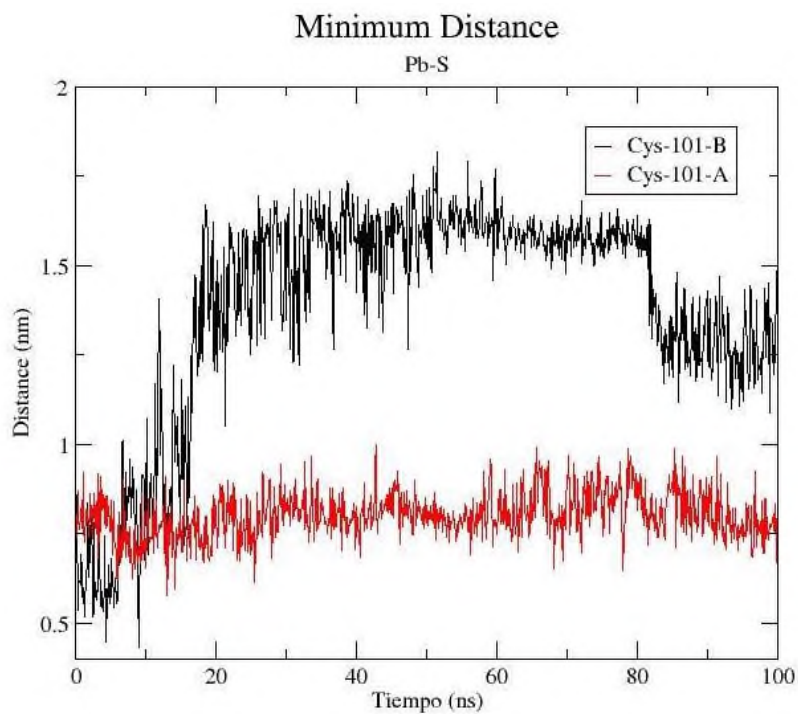


**Figura 46.** Distancia mínima de la enzima Glutación S-transferasa y el plomo.

Se sabe que las cisteínas tienen una gran afinidad con el metal. En base a ello se realizó un cálculo adicional para analizar la posible correlación entre las cisteínas del sitio activo y el plomo. El análisis indicó que el plomo se encuentra interaccionando como la cisteína 101 del monómero A y que dicha interacción se mantiene constante, lo cual se puede afirmar que el plomo, muy posiblemente, está ejerciendo una inhibición de tipo competitiva ya que al entrar al sitio activo podrá competir con el sustrato y por ello disminuir la actividad de las misma. La figura 36 muestra los análisis realizados. En ella se puede observar que en el monómero B la actividad es diferente, lo cual puede indicar que el plomo primero se une al monómero A y posteriormente al monómero B reflejando, muy posiblemente el modo de acción que este elemento tóxico tiene en esta proteína.

Los resultados obtenidos tanto en la parte experimental como en la teórica indican que el plomo es un metal que en condiciones in vitro puede disminuir la actividad de la enzima GST al unirse preferentemente a uno de los monómeros de manera inicial y posteriormente al siguiente. Estos resultados han unido la parte experimental con la parte teórica para tratar de entender mejor el mecanismo por

el cual el plomo interacciona con la enzima GST P1 que es una de las isoenzimas más importantes del riñón.



**Figura 47.** Distancia mínima entre el plomo y los monómeros A y B de la enzima Glutación S-transferasa.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se realizaron experimentos *in vitro* determinando la actividad enzimática de la enzima Glutación S-transferasa (GST) en condiciones normales y variando la temperatura, el pH y la concentración de iones en ausencia y en presencia de plomo. A partir de ellos se encontró que la enzima podría ser una proteína termoestable presentando una mayor actividad enzimática a una temperatura de 80°C. De la misma manera se observó que al medir la actividad a valores de pH básicos ésta es favorecida y que a valores ácidos disminuye, lo cual puede estar indicando que los protones podrían estar saturando los sitios de reacción y por ello disminuir la actividad al bloquearlos. Cuando se varió la concentración de sales la actividad disminuyó a valores bajos y altos de las mismas.

Cuando la enzima se incubó con plomo se observó una disminución en la actividad en función de la concentración de metal y el tiempo de incubación. Sin embargo, esta disminución nunca alcanzó el 100%. Cuando se incubó la enzima en condiciones de pH ácido y plomo se constató que la actividad disminuyó drásticamente. Estos resultados ayudaron a entender que la enzima es estable a temperatura ambiente y a elevadas temperaturas; depende de la concentración de protones para llevar a cabo su actividad y que al cambiar la concentración de sales se altera su acción.

Por lo anterior se propuso que la enzima, por las características mostradas en los experimentos se comporta, posiblemente, como una proteína cooperativa que es inhibida de forma, posiblemente, no competitiva por el plomo.

Tomando en cuenta estos resultados se procedió a realizar los estudios de simulación molecular del comportamiento normal de la enzima con su sustrato y su ligante y, posteriormente, la acción que el plomo ejerce sobre ella.

Los resultados de la dinámica molecular demostraron que la presencia del glutatión reducido (GSH) tiene gran influencia en el comportamiento de la GST PI dado que al ser un ligante hidrofílico favorece la abertura del sitio catalítico de la enzima y con un sustrato hidrofóbico como lo es el DNCB cierra el sitio activo.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

Adem6s, a partir de los resultados te6ricos y experimentales se puede concluir que lo que favorece la reacci6n de acoplamiento entre el ligante y sustrato es el GSH reducido, en otras palabras, se puede afirmar que el GSH activa la cat6lisis de la enzima favoreciendo la reacci6n de formaci6n ligando-sustrato.

Los estudios *in silico* han ayudado a entender el comportamiento que tienen el ligando (GSH) y el sustrato (DN CB) con la enzima. Los amino6cidos implicados en la cat6lisis de uni6n son para GSH Trp 38, Lys 44, Leu 52, Ser 65, para DN CB Trp 38, Lys 44, Gln 51 y para el complejo GDN Tir 7, Trp 38, Lys 44, Gln 51.

El estudio de Din6mica molecular del plomo con la enzima GST-PI demostr6 que el plomo atrae fuertemente a las ciste6nas internas, de tal manera que no se pueden separar y por consecuente su sitio activo se va cerrando disminuyendo la actividad de la enzima.

Adicionalmente, estos estudios de simulaci6n ayudaron a corroborar que la enzima es cooperativa ya que el mon6mero A reacciona primero que el mon6mero B aunque los dos llevan a cabo la reacci6n. Las mediciones indicaron que la reacci6n que ocurre en el mon6mero A induce la reacci6n en el B.

De la misma manera se determin6 que cuando el plomo se aproxima a la ciste6na 101 localizada en el sitio activo, y al transcurrir el tiempo de simulaci6n el metal comienza a ser atra6do por la ciste6na del sitio activo del mon6mero B. Este fen6meno podr6a explicar la inhibici6n de la actividad que muestra la enzima al estar en presencia del plomo en los experimentos *in vitro*.

Se requieren estudios adicionales para terminar de entender el mecanismo exacto de uni6n del plomo a la prote6na lo que ocasiona la disminuci6n de su actividad, sin embargo, el presente trabajo ayud6 a demostrar que el plomo tiene la capacidad de unirse de forma i6nica a los restos de ciste6na de la enzima GST P1. Estos conocimientos son de importancia debido a que la familia de las GST se encuentra implicada en fen6menos cl6nicos importantes entre ellos algunos relacionados con alteraciones metab6licas en diversos 6rganos de los humanos. Por ejemplo, en casos de c6ncer la enzima GST P1 se utiliza como biomarcador de da6o en pacientes cl6nicos.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

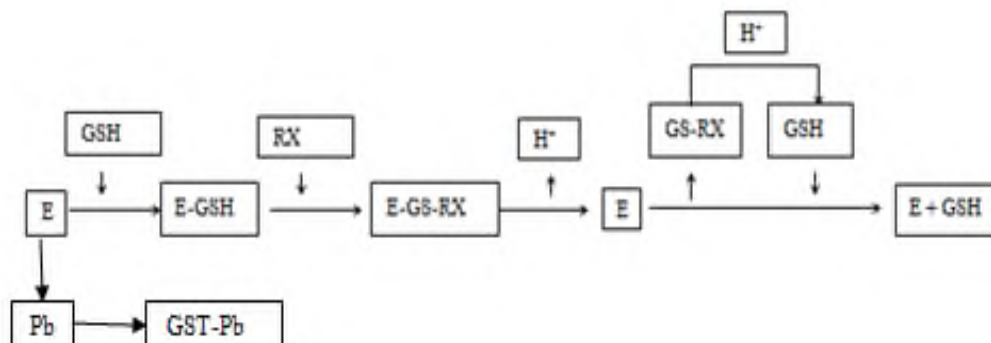
---

La GST está implicada en los fenómenos de estrés oxidativo, mismos que se encuentran relacionados con la inflamación y posteriormente con los procesos degenerativos de órganos como cerebro, hígado y riñón, por lo cual se ha comenzado a utilizar como un biomarcador de daño por aumento de las especies reactivas de oxígeno.

Lo anterior justifica la importancia del estudio de la enzima en presencia de plomo ya que este elemento constituye un xenobiótico ambiental que ocasiona una serie de eventos que inician con el aumento del nivel de especies reactivas de oxígeno, las cuales inducen el fenómeno de estrés oxidativo. Este induce el proceso inflamatorio el cual, finalmente, es el responsable de las alteraciones metabólicas implicadas en los procesos de degeneración de muchos de los órganos vitales.

Un dato relevante es el hecho de que si se sabe que el plomo es un metal que puede inhibir la actividad de la Glutación S-transferasa entonces su posible uso como indicador de procesos de degeneración biológica podría estar siendo antagonizada por el metal.

A partir de los resultados experimentales y teóricos de la dinámica molecular entre la interacción del plomo con la enzima y su ligando y sustrato, se propuso el siguiente mecanismo de reacción de la GST P1 con el conjugado y el sustrato y el plomo.



# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

Donde:

E representa a la enzima GST P1

GSH representa al glutati3n reducido.

E-GSH representa al complejo enzima-glutati3n

RX representa un compuesto electrofílico (metabolito o xenobi3tico).

E-GS-RX representa el complejo ternario enzima-glutati3n-xenobi3tico.

Pb representa al plomo

GST-Pb a interacci3n entre a enzima y el plomo

En este modelo se puede observar el comportamiento normal de la enzima con su sustrato y su ligante y a su vez la interacci3n de la GST P1 con el plomo formando un complejo enzima-plomo causando un cambio conformacional en ella y evitando que se lleve a cabo el mecanismo de detoxificaci3n de la misma.

En general se puede concluir que el plomo presenta una alta afinidad tanto con el glutati3n reducido como con las cisteínas de la enzima ocasionando un efecto negativo en la actividad de la misma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Alfonso**, A. Javier

<http://maxwell.ciencias.ubiobio.cl/~drisso/wiki/uploads/Main/DinamicaMolecular.pdf>

**Allen**, M.P. Tildesley, D.J. (1987).Computer Simulation of Liquids. Oxford University Press, New York.

**Arango S.** Sandra (2012) Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. Rev. Fac. Salud Pública, Vol. 30(1) pp. 75-82.

**Aguilar Flores Celia**, (2013), Efecto de cuatro metales pesados en bacterias aisladas de ambientes contaminados, Primera exposición de carteles científicos de verano de investigación, Universidad del Papaloapan.

**Barbará,V.**, Unda. J., Capuano. J. (1992).Intoxicación por plomo: Problema pediátrico actual. Ann.Med.Asoc.Med.Hosp. ABC. Vol.37: 66-69.

**Bellinger,D.** (1994).Low-level lead exposure and cognitive function in children. Pediatric Ann, Vol. 23: 600-605.

**Benin**, A. L., Sargent, J. D. Dalton, M. Roda. S.(1999). High Concentrations of Heavy Metals in Neighborhoods Near Ore Smelters in Northern Mexico.Environ. Health Persp. Vol.107.

**BisswangerHans**, Enzyme Kinetics Principles and Methods, Universität Tübingen, Germany, Leonie Bubenheim, Cap. 1, 2002

**Board**, P.G., Baker, R.T., Chelvanayagam, G., Jermin, L. S.,1997. Zetaa novel class of Glutathione S-transferases in arrange of species from plants to humans. Biochem.J. 328, 929–935.

**Brieger**, H.) 2005), Genetic basis of susceptibility and resistance to toxic Agends, J. Occup. Med, Vol 11, pp 511-515.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

**Caccuri**, A.M., Antonini, G., Board, P.G., Parker, M.W., Nicotra, M., Lo Bello, M., Federici, G. & Ricci, G (1999) Proton release on binding of glutathione to alpha, Mu and Delta clase glutathione transferases. *Biochem. J.* 344, 419- 425

**Cai** W, Li J, Yip S. Molecular Dynamics. In: *Comprehensive Nuclear Materials*, Volume 1. Konings RJM, editor. Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 249-265.

**Calderon** S. J. V. (1996), Susceptibilidad individual en el estudio de las enfermedades, *BioqMexico* Vol 15, pp 74-77.

**Canfield** et al. Intellectual Impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per Deciliter. *N Engl J Med* 2003; 348: 16.

**Centro** Panamericano de Ecología Humana y Salud. (1989) O.P.S. /O.M.S. Corey, G., Galvao, L. "Plomo". Serie Vigilancia 8. Metepec. México.

**Chang** W. Louis (1996), *Toxicology of metals*, 1° edición, CRC Press, pp 9.

**Ellemhorn** MJ. *Medical Toxicology*. 2Nd Ed. Baltimore: Williams Wilkins; 1996.

**Frenkel** D. Smit. B. *Understanding Molecular Simulations. From Algorithms to Applications*. Academic Press, San Diego, California, 1996.

**Ferreira** R. Estrés oxidativo y antioxidativo: de las ciencias básicas a la medicina aplicada. Buenos Aires: Hospital Militar Central; 1998.

**González-Andrade** Martin, Silva Manzano Daniel Adriano, "La estructura y la visualización molecular de proteínas, *Mensaje Bioquímico*, Vol XXIX, (2005), 188-137.

**González-Mangado** a N, Morera Prat bJ. Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Arch Bronconeumol* 2001; 37: 407–410.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

**Hayes**, J. D., & Pulford, D. J.(1995). The glutathione S-transferase super gene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 445-600(3).

**Herbert** L. Needlerman, Human Lead Exposure, CRC Press, Pittsburgh Pennsylvania, pp 170.

**Hoover**, W. G. Canonical dynamics-equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A*, 1985, 31, 1695.

**Inskip**, A., Elexperu-Camiruaga, J., Buxton, N., etal., 1995. Identification of polymorphisimat the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: Evidence forlin kage with *GSTM1* \*A. *Biochem.J.* 312,713–716.

**J. Johnson**, Randall Cygan; 2006 Molecular simulation of metal adsorption to bacterial surface.

**Jiménez** C, Ramírez I.Factores de exposición ambiental y concentraciones de plomo en sangre en niños de la ciudad de México. *Sal Pub Mex* 1993; 35: 6

**Kaul** B, Sandhu RS, Depratt C, Reyes F. Follow-up screening of lead poisoned children near an auto battery recycling plant, Haina, Dominican Republic. *Environ Health Perspect.* 1999; 107:917-20.

**Lee**, W.-H., Isaacs, W.B., Bova, S., Nelson, W.G., 1997.CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: A new prostate cancer biomarker. *CancerEpidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 443–450.

**Lengauer** T., Rarey M. (1996).Los métodos computacionales para el atraque biomolecular. *Curr. Opin. Estructura. Biol.* 6 :402-406.

**Lehninger**, A., NELSON, D., COX, M., Principios de Bioquímica, 4º Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 191-192.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutati6n S-Transferasa P1

---

**Li J.** Basic Molecular Dynamics. In: Handbook of Materials Modeling, Springer; 2005.p.565–588. 5. Karplus M, Mc Cammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. Nat Struct Biol. 2002; 9(9):646-652.

**Lo, H. W. Ali-Osman,F.,** 1997.Genomic cloning of h GSTP1\*C, an allelic human pi class glutathione S-transferase gen variant and functional characterization of its retinoic acid response elements. J. Biol. Chem. 272, 32743– 32749.

**Meller J.** Molecular Dynamics. Encyclopedia of life sciences, Nature Publishing Group; 2001,1-8.

**Meneses**Fernando, Gonzales Montserrat Lino (2003), Niveles de plomo en sangre y factores de exposici6n en ni1os del estado de Morelos, M6xico, Salud p6blica de M6xico, Vol45,suplemento 2.

**Mendoza** Pati1o Nicandro, (2006) Toxicos renales, Rev. De la facultad de medicina, Vol, 49 No1.

**Navarro,** Moreno, Leticia G., (2015), Enzyme responsive to heavy metal stress, Physical of proteins: Theory, experiment and simulation.

**Nervet**W. Neber (2004), Analysis of the glutathione S-Transferase gene family, Human Genomics, Vol. 1, pp 460-464.

**Oakley,** A. A., Lo Bello, M,Battistoni, A., Ricci,G.Ross john, J., Villar, H.O., & Parker, M.W. (1997). J.Mol. Biol. 274 84-100.

**Ohki,** S (1991), cell and model membrane interaction, Bussines Media, LLC, 1° edici6n , pp 290.

**Poma** Pedro A. (2008), Lead effects on humans , An. Fac. Med. 2008.

# Estudio dinámico y estructural de la interacción del plomo con la enzima Glutación S-Transferasa P1

---

**Pemble**, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B., 1996. Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* 319,749–754.

**Rapaport**. D.C. 1995. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

**Rinaldi** R. Eliasson (2002), Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases, *Drug metal, Dispos Vol 30*, pp 1053-1058

**Rosen** JF, Crocetti AF, Balbi K, Balbi J, Bailey C, Clemente et al. Bone lead content assessed by L-line x-ray fluorescence in lead-exposed and non-lead exposed suburban populations in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2789-2792

**Salud Pública**. (1995). Intoxicación por plomo: de la detección a la prevención primaria. *Salud publica México*, 37(3), 264-276.

**World Health Organization**. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles Environmental health criteria; N° 155I CPS 1993 [internet]. Geneva: who/ipcs; 1993 [acceso 15 de junio de 2010].

**Wang**, H.F., Lee, T.C., 1993. Glutathione S-transferase pi facilitates the excretion of arsenic from arsenic-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192,1093–1099.

**Xu**, S., Wang, Y., Roe, B., Pearson, W.R., 1998. Characterization of the human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J. Biol. Chem.* 273, 3517–3527.

