

ESTUDIO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA GLUTATIÓN ZETA TRANSFERASA (GSTZ) Y ÁCIDOS α -HALOALCANOICOS

Por

Ricardo Vivas-Reyes*, Angélica Padilla*, Emiliano Martínez*

Resumen

Vivas-Reyes, R., A. Padilla & E. Martínez: Estudio teórico de la interacción entre la glutatión zeta transferasa (GSTZ) y ácidos α -haloalcanoicos. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **33**(127): 253-272, 2009. ISSN 0370-3908.

La estructura 3D de la glutatión Z-transferasa se obtuvo del Protein Data Bank bajo el código 1FW1; posee una secuencia de 208 residuos (5 al 212). El modelo obtenido consta de 208 aminoácidos, un ión sulfato, una molécula de glutatión, una molécula de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiobuano (DTT) y 109 moléculas de agua. Siendo el residuo Ser10 el responsable de la actividad catalítica.

A pesar de las diferencias numéricas en los valores de las funciones de evaluación y teniendo en cuenta el error asociado a la utilización de métodos derivados de la mecánica clásica los resultados del docking molecular fueron lo suficientemente adecuados para estimar la posible localización y conformación de los aductos formados entre glutatión y ácidos α -haloalcanoicos; estos resultados mostraron una apropiada complementariedad geométrica entre el sitio activo y los α -haloalcanoicos; no evidenciaron diferencias significativas con respecto a la estereo selectividad y estereo especificidad de la GSTZ hacia los ácidos α -haloalcanoicos. Adicionalmente los resultados sugieren que los ligandos estudiados tienen la suficiente movilidad dentro del sitio activo para generar poses con alta afinidad de unión pero con poca probabilidad de ocurrencia, lo cual puede deberse a la orientación que asumen algunos átomos de hidrógeno.

Palabras clave: xenobióticos, ácidos α -haloalcanoicos, enzimas glutatión transferasas (GSTs), glutatión S-transferasa de clase zeta (GSTZ), α -halo ácidos, DCA, MAAi.

Abstract

The 3D structure of the Z-glutathione transferase was obtained from the Protein Data Bank (PDF) under the code 1FW1, this protein has a sequence of 208 residue (5 to 212). The model

* Grupo de Química Cuántica y Teórica, Universidad de Cartagena. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Campus de Zaragocilla. Cartagena-Colombia.

obtained consists of 208 amino acids, 1 sulfate ion, a molecule of glutathione, a molecule of 2,3-dihydroxy-1, 4-ditiobuano (DTT) and 109 water molecules. Being the residue Ser10; responsible for the catalytic activity.

Despite some differences in numerical values of the functions of evaluation and taking into account the error associated with the use of methods derived from classical mechanics the results of molecular docking were quite adequate to estimate the possible location and conformation of adducts formed between glutathione and acid- α -Haloalkane, these results showed a good agreement between geometric found to α -Haloalkane and the active site, this compounds did not show significant differences regarding stereoselectivity and stereospecificity of GSTZ towards acids α -Haloalkane. Additionally, the results suggest that the ligands studied have enough mobility within the active site to generate poses with high affinity binding but with little probability of occurrence, which may be due to the orientation they assume some hydrogen atoms.

Key words: xenobiotics, α -Haloalkane acids, enzymes glutathione transferases (GSTs), glutathione S-transferase class zeta (GSTZ), α -halo acids, DCA, Maai.

Introducción

Los organismos vivos se exponen continuamente a un gran número de especies químicas externas no-alimenticias. Estos agentes xenobióticos pueden deteriorar el funcionamiento del organismo causando efectos tóxicos y a veces carcinógenos. La amenaza por tales compuestos ha aumentado sustancialmente durante los dos últimos siglos debido a la gama de nuevos productos químicos artificiales introducidos en el ambiente, tales como los ácidos α -haloalcanoicos; sin embargo, en la naturaleza se encuentran compuestos químicos tóxicos provenientes de plantas y hongos como los fenoles, aflatoxinas y especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. La capacidad de sobrevivir a la amenaza presentada por compuestos endógenos y/o compuestos xenobióticos representa probablemente una adaptación biológica fundamental para la supervivencia¹. Dentro de la amplia gama de compuestos que los organismos vivos emplean para degradar compuestos dañinos se encuentran las enzimas glutatión transferasas (GSTs). Estas son encontradas ubicuamente en organismos aeróbicos y catalizan la conjugación de glutatión a una amplia variedad de sustratos electrofílicos². Los miembros de la super familia GST también presentan actividad glutatión peroxidasa y contribuyen al metabolismo de hidroperóxidos orgánicos generados en las células^{3,4}. Las GSTs son conocidas por metabolizar un gran número de derivados carcinógenos medioambientales y una deficiencia inherente de esta ha sido asociada con un incremento de los riesgos de padecer cáncer⁵. En contraste, la sobre expresión de GSTs en células tumorales puede contribuir con la resistencia a drogas².

La glutatión S-transferasa de clase zeta (GSTZ) es una clase de GST recientemente descubierta y ha demostrado

ser de mucho interés debido a su contribución al catabolismo de fenilalanina y tiroxina y su papel en el metabolismo de α -halo ácidos. La GSTZ fue descubierta originalmente como resultado de un acercamiento de la bioinformática y la genómica, a mediados de 1990⁶. Esta y otras aproximaciones también han llevado al descubrimiento de varias formas polimórficas de GSTZ. La GSTZ es una enzima involucrada en la detoxificación de compuestos tales como dicloroacetato (DCA), que es de gran interés toxicológico y de salud pública. El DCA es un tóxico de multisitios y carcinógeno que aparece como un subproducto de la desinfección con cloro de agua y del contaminante medioambiental tricloroetileno. La GSTZ conocida también conocida como maleilacetoacetato isomerasa (MAAi) es una proteína citoplasmática de 29kD, la cual puede isomerizar maleiace-toacetato a fumarilacetoacetato⁶.

En el presente trabajo se realizó un estudio teórico con la idea de encontrar los posibles mecanismos de interacción de la GSTZ con varios α -haloácidos, de los cuales algunos presentan actividad tóxica y otros no; el estudio es implementado en medio vacío y solvatado para cuantificar la influencia del ambiente químico y los ligandos en sus configuraciones R y S para establecer la estéreo especificidad y estéreo selectividad del sitio de unión de la GSTZ hacia ellos.

También se realizó un esquema de reacción con el método semiempírico SAM⁷ entre los α -haloácidos y la GSTZ, con el fin de obtener información sobre las propiedades electrónicas de las moléculas.

Métodos computacionales

La estructura tridimensional de la glutatión z transferasa fue tomada del Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb), bajo

el código 1FW1⁸. A esta se le realizó un análisis de la estructura secundaria a partir de su estructura 3D con Promotif⁹, se implementó también un estudio energético que incluyó minimización energética en vacío y en medio acuoso explícito empleando el campo de fuerzas Tripos¹⁰, se calcularon los parámetros de accesibilidad superficial al solvente con WhatIf (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>), perfil lipofílico con el módulo Molcad, potencial electrostático molecular con APBS¹¹ y cavidades con potencial para alojar los ligandos α -haloalcanoicos con Pocket Finder¹². El sitio de unión de los ligandos a la proteína se preparó teniendo en cuenta las cavidades encontradas con Pocket Finder. El sitio activo se construyó seleccionando los aminoácidos que se encontraban a 6.5 Å alrededor de la molécula de glutatión en la estructura cristalina, optimizada en el vacío y en medio acuoso. Posterior a la caracterización del sitio activo se realizó un análisis conformacional con el módulo FlexX^{13,14}, cada ligando fue situado en 100 conformaciones diferentes dentro del sitio de unión de la proteína, y cada posición fue evaluada con cinco funciones: Total score del módulo FlexX; Chemscore¹⁵, D-score¹⁶, PMF-score^{17,18} y Gscore¹⁹ del módulo CScore²⁰. La valoración de cada ligando se implementó con la función de consenso Cscore, la cual asigna valores entre 0 y 5 para cada conformación del ligando en la cavidad, siendo un valor de 0 para una mala interacción del ligando y de 5 para una buena. El valor de aceptación para este estudio estuvo entre 5 y 4 para conformaciones diferentes con la misma valoración se empleó Chemscore como función discriminante.

Además se realizó un esquema de reacción con el método semiempírico SAM1⁷ entre los α -haloácidos y la GSTZ, con el fin de obtener información sobre las propiedades electrónicas de las moléculas. Los α -haloácidos estudiados fueron: ácido dibromoacético, ácido dicloroacético, ácido difluoroacético, ácido bromocloroacético, ácido bromofluoroacético, ácido dicloropropanoico y ácido cloropropanoico. Las reacciones se muestran en las Figuras 1 y 2; cuando los sustituyentes X e Y son halógenos iguales la molécula es un ácido α -dihalogenado diastereoisómero y cuando son diferentes se generan los enantiómeros R y S del ácido α -dihalogenado. Sin embargo en la reacción con glutatión, el átomo de carbono al cual se une el átomo de azufre es un centro quiral, por lo tanto se producirán dos enantiómeros como resultado de la unión al ácido α -dihalogenado de sustituyentes iguales y cuatro enantiómeros de sustituyentes diferentes.

Análisis y discusión de resultados

Análisis estructural

En la Tabla 1 se muestra la secuencia de la proteína IFW1, en ella se resalta el residuo Ser10, el cual es considerado como el responsable de la actividad catalítica. El modelo obtenido consta de 208 aminoácidos, un ión sulfato, una molécula de glutatión, una molécula de 2,3-dihidroxi-1,4-ditiobuano (DTT) y 109 moléculas de agua.

La proteína muestra que esta adopta el plegamiento canónico de las glutatión transferasas (Figura 3), el cual

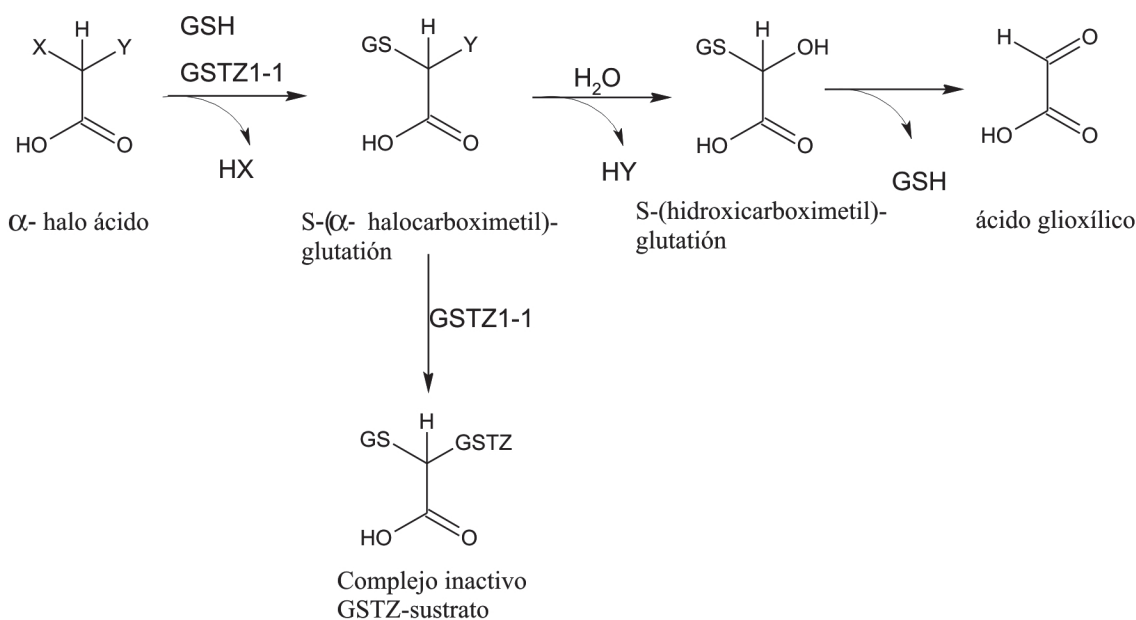


Figura 1. Reacción estudiada para los ácidos acéticos α -dihalogenados.

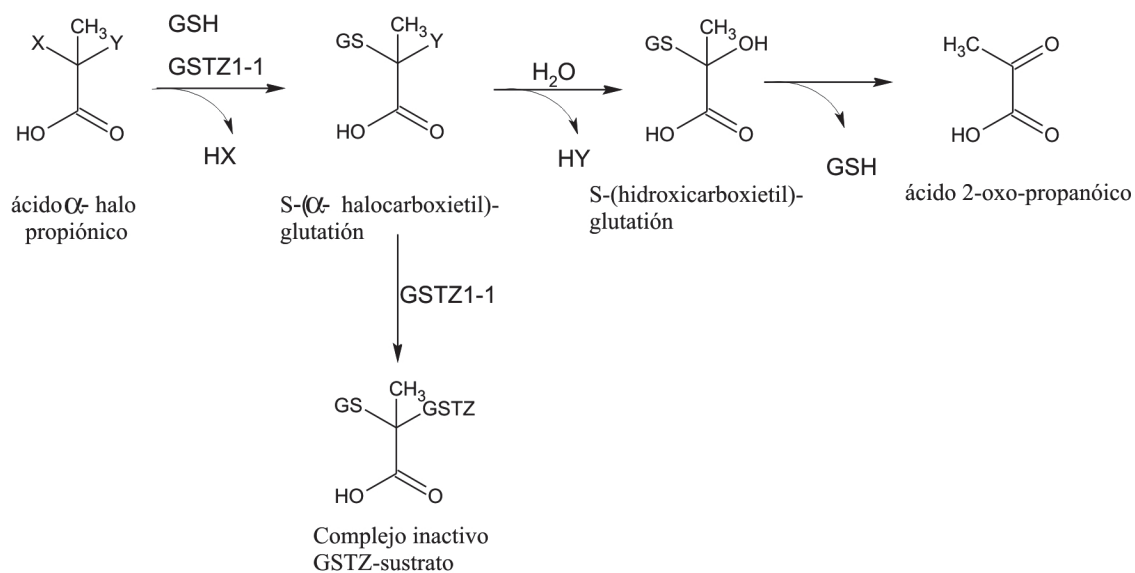


Figura 2. Reacción estudiada para el ácido propanoico mono y diclorado en posición α .

Tabla 1. Secuencia amonoacídica de la glutatión Z-transferasa, en código de una letra.

Estructura	Secuencia
1FW1	KPILYSYFRSSCSWRVRIALALKGIDYKTVPINLIKDGGQQFSKDFQALNPMKQVPTLKID GITHQSLAIIIEYLEETRPTRLLPQDPKKRASVRMISDLIAGGIQPLQNLVSKQVGEEMQL TWAQNAITCGFNALEQILQSTAGIYCVGDEVMTADLCLVPQVANAERFKVDLTPYPTISSI NKRLLVLEAFQVSHPCRQPDPT

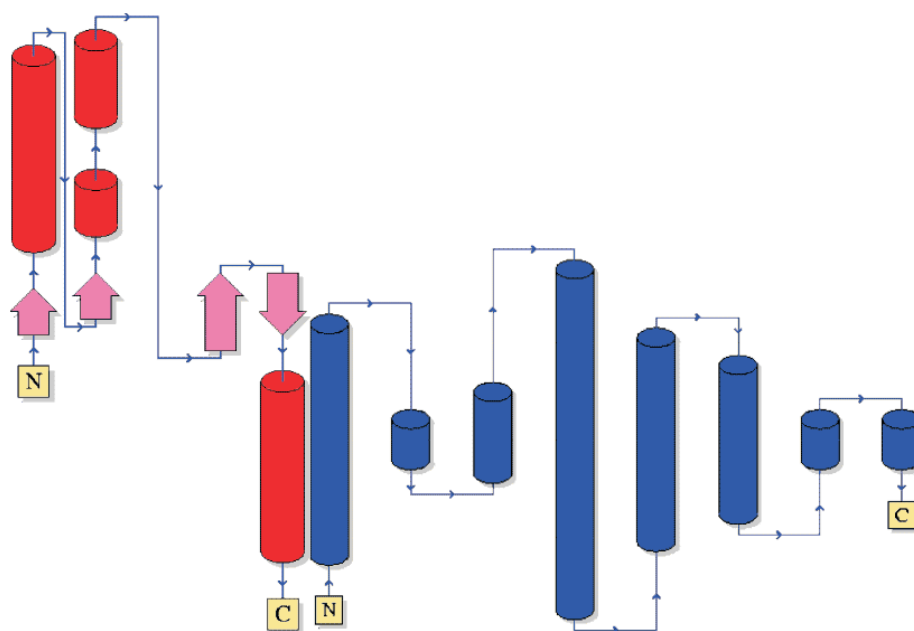


Figura 3. Plegamiento de la glutatión Z-transferasa. El dominio N-terminal (rojo) incluye las 4 hojas β y el dominio C-terminal (azul) consta de hélices α y 3-10

consta de dos dominios: uno N-terminal de tipo tioredoxina y otro C-terminal compuesto por hélices y loops. Los dominios están conectados por una región de 7 residuos (85 a 91)⁸.

Un análisis detallado de la estructura secundaria, a partir de la estructura 3D, obtenido con Promotif 3.01⁹, en general, indica que la proteína consta de 16 residuos en hojas- β , 105 en α -hélices, 13 en hélices 3-10 y los 74 restantes en zonas de loops.

Optimización de la estructura cristalina

Luego de obtener la estructura 3D de la proteína, se le adicionaron átomos de hidrogeno empleando el módulo Biopolymer de SYBYL 7.0 (www.tripos.com), el cual agrega los átomos de hidrógeno y pares solitarios definidos para cada residuo en el diccionario del módulo, la orientación de los átomos de hidrógeno se establece de forma que sea igual que en la definición del diccionario de residuos. El siguiente paso consistió en la eliminación del ión sulfato, la molécula de DTT y las moléculas de agua. Debido a la adición de hidrógeno y remoción de moléculas en la estructura cristalina fue necesario optimizar la estructura. Las condiciones del proceso de optimización se encuentran en la Tabla 2.

Para evaluar el efecto de la presencia de moléculas de agua en la proteína, esta se solvató con una capa de 902 moléculas alrededor de la estructura, para lo cual se empleó el módulo SOLVATE de SYBYL; posteriormente se optimizó empleando las condiciones de la estructura no solvatada.

El análisis de la proteína obtenido con Rampage²⁴ antes y después de las optimizaciones (Tabla 3) muestra algunos cambios ocurridos en la estructura. En general el proceso de optimización en vacío desplazó residuos de la

zona favorecida a las zonas permitida y prohibida diferentes a los del proceso de optimización en medio acuoso; solo fueron desplazados 9 residuos en común, de los cuales cabe destacar la glutamina 71 ya que siempre queda en la región prohibida, los 8 restantes caen dentro de las zonas permitidas.

Si bien el desorden estructural aumenta, la energía total de la estructura disminuye con el proceso de optimización (Tabla 4). Los parámetros que mayor influencia ejercieron en el cambio de energía de la estructura proteínica fueron la energía debida a las interacciones de van der Waals en átomos no enlazados y la energía por interacciones electrostáticas, siendo esta última menor en la estructura solvatada por el fuerte aporte que ejercen las moléculas de agua.

Accesibilidad superficial al solvente

Adicional a la información obtenida con Rampage, se estimó con WHATIF (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>) el área superficial accesible al solvente (agua) o accesibilidad (en Å^2) por residuo de las estructuras sin optimizar y optimizadas. En las Figuras 4 y 5 se muestra el cambio acontecido debido al proceso de optimización, el cual fue evaluado de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta a = a_{opt} - a_{cristal}$$

Donde a_{opt} representa la accesibilidad por residuo en la estructura optimizada y $a_{cristal}$ la accesibilidad por residuo de la estructura cristalina original sin ningún tipo de ligando ni moléculas de agua. La accesibilidad presenta menor variación en medio acuoso que en medio vacío, lo cual sugiere que las moléculas de agua le confieren estabilidad a la proteína, lo cual es acorde al hecho de que es una proteína citosólica.

Tabla 2. Condiciones generales de la optimización de 1FW1.

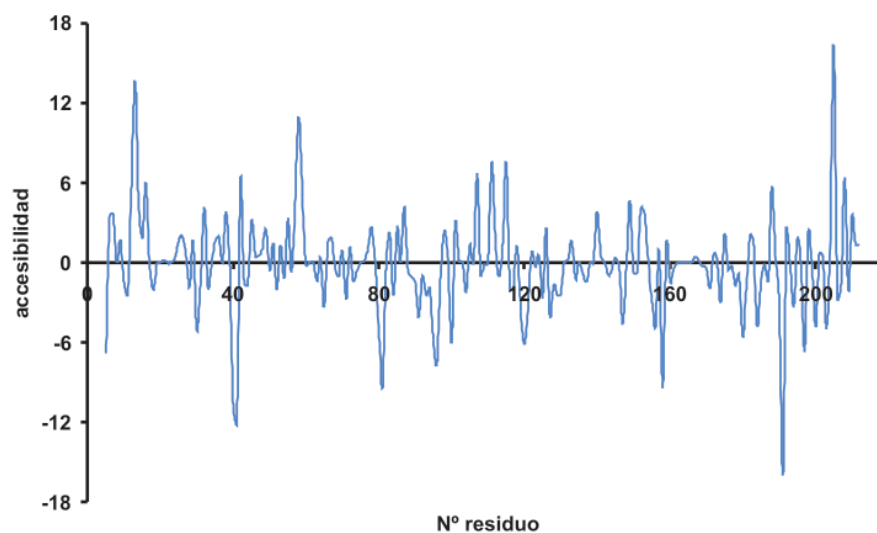
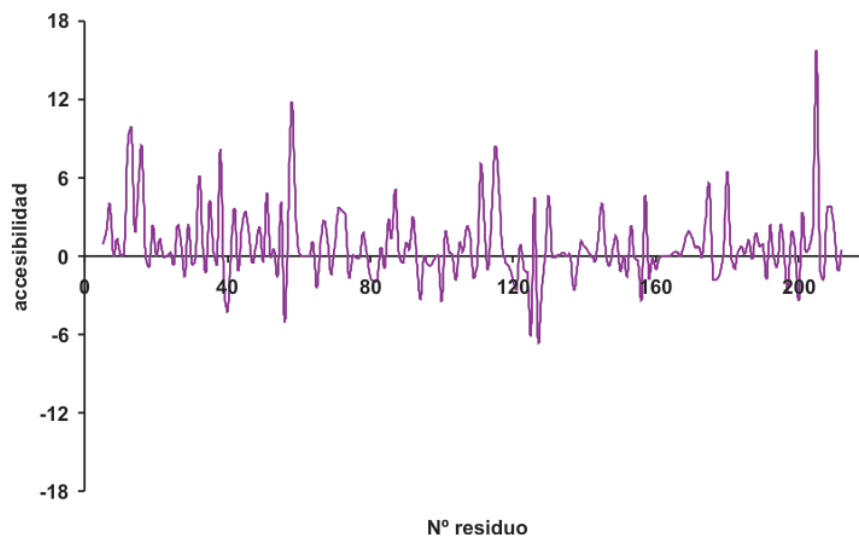
Campo de fuerza	Tripes ¹⁰
Cargas	Gasteiger-Marsilli ²¹
Método	Gradiente conjugado ^{22,23}
Optimización inicial	Simplex, 20 iteraciones ²³
Gradiente	0.05 (kcal/(Å)(mol)
Máximo desplazamiento	0.01 Å

Tabla 3. Resumen del diagrama de Ramachandran obtenido con Rampage.

Región	1FW1 no optimizada	1FW1 optimizada	1FW1 optimizada en agua
Favorecida	203 (98.5%)	184 (89.3%)	189 (91.7%)
Permitida	2 (1.0%)	20 (9.7%)	16 (7.8%)
Prohibida	1 (0.5%)	2 (1.0%)	1 (0.5%)

Tabla 4. Aspectos energéticos evaluados durante el proceso de optimización molecular de GSTZ (1FW1).

Energía del parámetro (Kcal/mol)	No optimizada	Optimizada en vacío	Optimizada en agua
Estiramiento de enlaces	380.372	80.492	87.468
Flexión angular	419.010	406.387	453.189
Torsional	535.889	469.031	477.724
Flexión fuera del plano	13.193	9.489	8.122
1-4 van der Waals	479.672	251.286	258.753
van der Waals	65820.965	-1569.864	-2950.343
1-4 Electrostática	1278.368	1253.370	1252.997
Electrostática	-1478.536	-1890.809	-5398.132
Total Energy	67448.935	-990.618	-5810.221

**Figura 4.** Cambio en la accesibilidad entre la proteína optimizada al vacío y sin optimizar.**Figura 5.** Cambio en la accesibilidad entre la proteína optimizada en medio acuoso y sin optimizar.

Un perfil lipofílico/hidrofílico asociado a la accesibilidad (ver Figura 6) señala el comportamiento superficial de la proteína en sus formas cristalina y optimizada, en concordancia con los resultados anteriores las estructuras que presentan mayor similitud son la proteína cristalina y la optimizada en medio acuoso.

La función de una proteína es definida por las interacciones que esta forme con otras proteínas y ligandos, por lo cual identificar la localización de los sitios de interacción con el ligando es fundamental²⁵. Parte del trabajo de caracterización de la glutatión γ transferasa consistió en la detección de cavidades o *pockets* que puedan

albergar los ligandos en estudio, para determinar estas cavidades se empleó el servidor en línea Pocket-Finder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/pocketfinder/>).

Cavidades

Como resultado del proceso de búsqueda de cavidades que permitiesen alojar los ácidos α -haloalcanoicos, se determinaron varios tamaños para estas. Pocket-Finder determinó 10 cavidades por estructura pero solo se tomó una ya que las demás no presentaban el volumen adecuado. Los resultados de esta búsqueda se muestran en la Tabla 5 y la Figura 7.

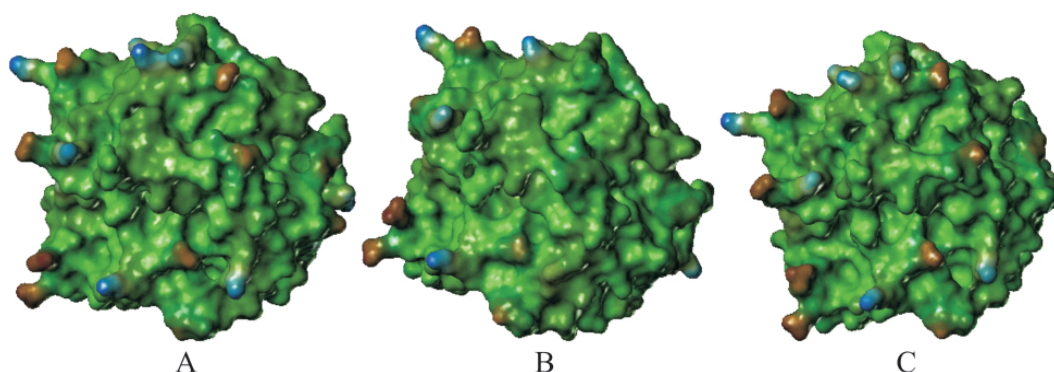


Figura 6. Diagramas de lipofilidad para la glutatión γ transferasa cristalina (A), optimizada en vacío (B) y optimizada en medio acuoso (C); el rango de colores va desde azul (hidrofílico) hasta café (lipofílico).

Tabla 5. Volumen predicho por Pocket-Finder para la proteína en sus formas cristalina y optimizada, y volumen de la cavidad seleccionada para alojar los ácidos α -haloalcanoicos.

Estructura	Volumen de la proteína (\AA^3)	Volumen cavidad (\AA^3)
Cristalina	20335	591
Optimizada en vacío	21452	393
Optimizada en medio acuoso	21352	706

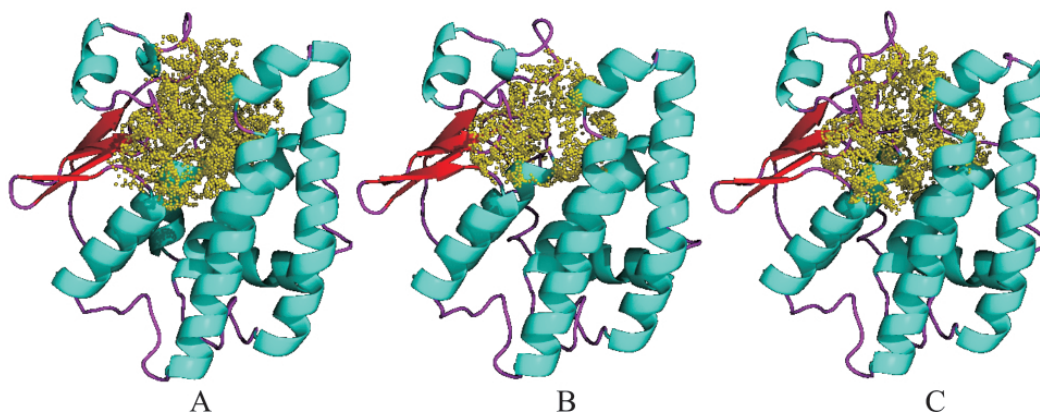


Figura 7. Cavidad elegida para implementar el docking molecular con los ácidos α -haloalcanoicos. Las Figuras A, B y C muestran la cavidad en la proteína cristalina, optimizada al vacío y optimizada en agua respectivamente. Las hélices se denotan en azul celeste, las hojas beta en rojo, los loops en magenta y la cavidad como puntos amarillos. La elección de la cavidad mostró ser la adecuada cuando se comparó con la estructura cristalina presentando el ligando (glutatión), como se aprecia en la Figura 8.

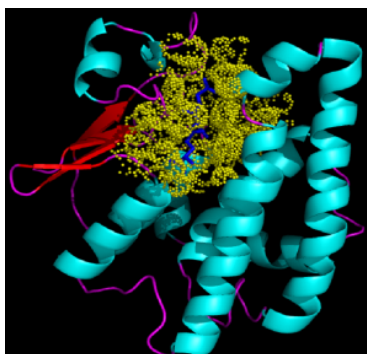
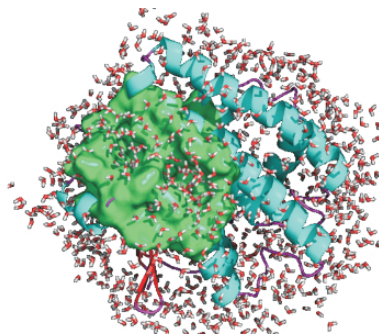
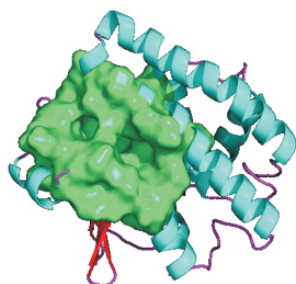


Figura 8. Representación de la estructura cristalina de la glutatión z transferasa con la cavidad (amarillo) y la molécula de glutatión (azul).

En la Tabla 6 se muestra la composición aminoacídica de la cavidad tomada como sitio activo hacia los ligandos α -haloalcanoicos. En ella se resaltan los residuos ILE 106 y GLN 114 en la estructura optimizada en vacío y GLY 42 en la optimizada en agua; estos residuos no son comunes en ambas estructuras; asimismo la estructura optimizada en vacío presenta un número mayor de aminoácidos (40) que la optimizada en agua (39). No obstante esta diferencia, el volumen del sitio activo en la estructura optimizada en agua fue mayor.

Tabla 6. Lista de residuos que conforman el sitio de unión entre la glutatión z transferasa y los ácidos α -haloalcanoicos.

1fw1 optimizada en vacío				1fw1 optimizada en agua			
#	Residuo	#	Residuo	#	Residuo	#	Residuo
11	TYR	60	PRO	11	TYR	59	VAL
13	ARG	70	HIS	13	ARG	60	PRO
14	SER	71	GLN	14	SER	70	HIS
15	SER	72	SER	15	SER	71	GLN
16	CYS	73	LEU	16	CYS	72	SER
17	SER	74	ALA	17	SER	73	LEU
18	TRP	75	ILE	18	TRP	74	ALA
19	ARG	106	ILE	19	ARG	75	ILE
20	VAL	107	ALA	20	VAL	107	ALA
36	ILE	108	GLY	36	ILE	108	GLY
38	LEU	111	GLN	38	LEU	111	GLN
43	GLY	112	PRO	42	GLY	112	PRO
45	GLN	114	GLN	43	GLY	115	ASN
46	PHE	115	ASN	45	GLN	116	LEU
50	PHE	116	LEU	46	PHE	117	SER
54	ASN	117	SER	50	PHE	118	VAL
56	MET	118	VAL	54	ASN	120	LYS
57	LYS	120	LYS	56	MET	172	ASN
58	GLN	172	ASN	57	LYS	175	ARG
59	VAL	175	ARG	58	GLN		



Potencial electrostático molecular (MEP)

La complementariedad entre proteína y ligando forman la base de la especificidad biológica. Las fuerzas fundamentales que determinan la especificidad por un ligando cargado son las interacciones electrostáticas, las cuales constituyen una fuerza impulsora fundamental subyacente en muchos procesos biológicos en escala molecular y desempeñan un papel importante en procesos de reconocimiento molecular, asociación intermolecular y propiedades moleculares^{26,27}. El potencial electrostático molecular es una poderosa herramienta que permite un acercamiento a fenómenos tales como procesos enzimáticos, interacciones proteína-proteína e interacciones ligando-proteína²⁸. Para elucidar el MEP de la glutatión *z* transferasa se empleo APBS¹¹ el cual resuelve numéricamente la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann. En la Figura 9 se muestran los mapas de MEP para la glutatión *z* transferasa no optimizada (sin ligandos), optimizada en vacío y en medio acuoso.

Debido a la alta constante dieléctrica del agua, se hace más evidente la separación de cargas en el MEP de la GSTZ obtenido en medio acuoso, lo cual facilita el ataque de electrófilos a las zonas con carga negativa y nucleófilos a

las zonas positivas; sin embargo este favorecimiento es disminuido por la presencia de moléculas de agua dentro del sitio activo, las cuales, a pesar de su movilidad pueden afectar la interacción del receptor con los ligandos.

Docking molecular

Para el cálculo del docking molecular se generaron 100 conformaciones para cada ligando dentro del sitio activo, el cual fue definido como todos aquellos residuos hallados a 6.5 Å alrededor de la molécula de glutatión en la respectiva estructura optimizada. Todos los enlaces simples del ligando se consideraron móviles. El algoritmo para el docking con FlexX hace que este coloque de forma automática los ligandos dentro del sitio activo predefinido, tomando en cuenta consideraciones geométricas y electrónicas, adicional a lo anterior la función consenso, Cscore, permite una evaluación más robusta y precisa de las mejores conformaciones del ligando y de las interacciones ligando- receptor²⁹.

En general, las funciones de evaluación son mejores para los ácidos α -halo alcanóicos que para glutatión lo que permite prever una mayor afinidad de unión; no obstante al comparar los resultados para la GSTZ optimizada

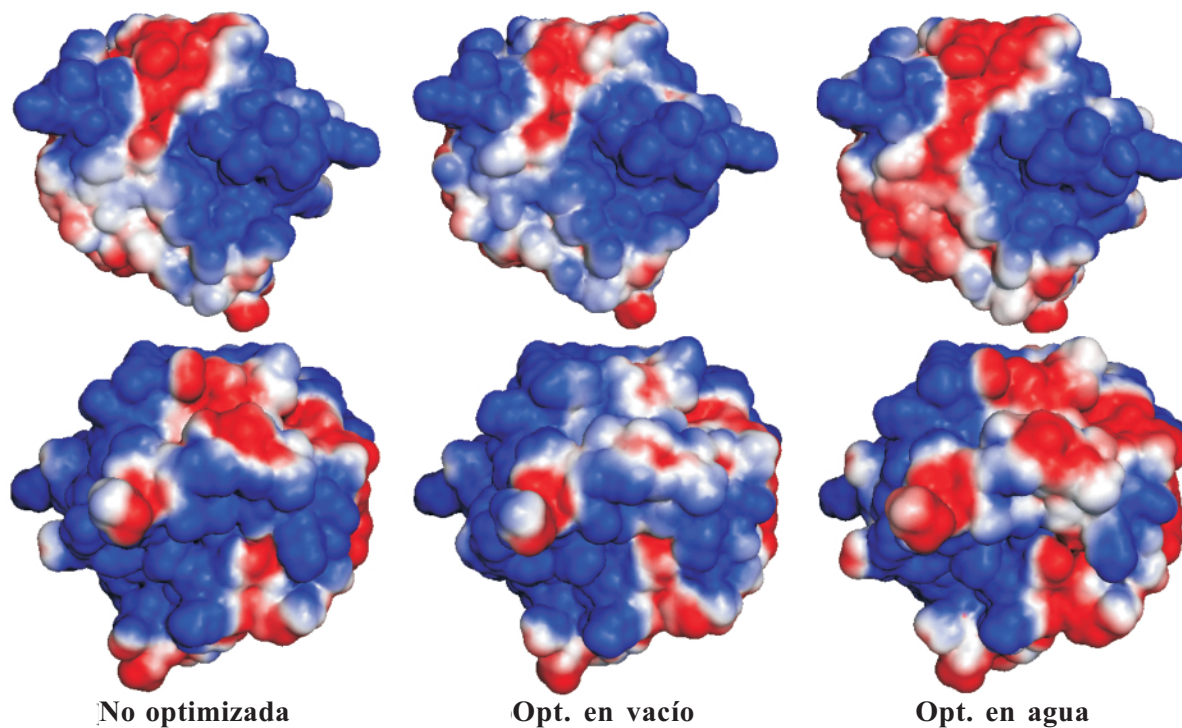


Figura 9. Vista *frontal* (arriba) y *posterior* (abajo) del mapa del MEP superpuesto a la superficie accesible al solvente de la glutatión *z* transferasa. El rango de valores del MEP abarca desde -1 (rojo) hasta +1 (azul), el blanco representa un valor de 0.

en vacío con la optimizada en agua algunos parámetros varían de manera apreciable (Totalscore y PMFscore), lo cual se debe a la presencia de moléculas de agua en el sitio activo, las cuales disminuyen el volumen disponible para generar las poses de cada ligando a la vez que generan interacciones polares con estos, sin embargo los resultados del docking se mantienen similares, lo cual se debe en parte a que FlexX no toma en cuenta las moléculas de agua presentes en el sitio activo para su evaluación.

Los resultados del docking, en ambiente vacío y solvatado, no revelaron estereoespecificidad ni estereoselectividad de la GSTZ hacia las mejores poses de los ligandos enantiómeros.

Glutión

El análisis de las poses que adopta la molécula de glutión dentro del sitio activo de la GSTZ optimizada en vacío muestra solo dos conformaciones y para la optimizada en agua muestra cuatro conformaciones, de las 100 obtenidas, que alcanzan el Cscore de 5. Comparando las funciones de evaluación para las poses en vacío (2 y 4) se observa que la pose 2 tiene un parámetro (Total score) mejor eva-

luado mientras que la pose 4 es mejor en los cuatro restantes. La evaluación de las poses en medio acuoso señala para la pose 21 dos parámetros significativamente mejor evaluados (Gscore y PMFscore).

La disposición espacial que toma la molécula de glutión en la estructura dilucidada por rayos X y como resultado del docking se muestra en la Figura 10, en ella se puede apreciar que como consecuencia del docking en vacío los residuo Gly y Cys del glutión se orientan en la misma dirección, en tanto que el residuo Glu se intercambia en ambas poses. El docking con la GSTZ solvatada arrojó como resultado 4 poses, tres de las cuales mantienen una orientación similar (13, 15 y 22) mientras que la restante (21) se orienta hacia otros residuos y en una conformación significativamente diferente. No obstante la disposición espacial de los átomos, las funciones de evaluación son ligeramente mejores en la estructura optimizada en vacío.

Cabe resaltar que las poses obtenidas con la GSTZ optimizada en vacío con una posición similar a glutión en la estructura obtenida por rayos X, la función de consenso arrojó valores poco fiables (≤ 3); estos resultados sugieren que la molécula de glutión puede tener una

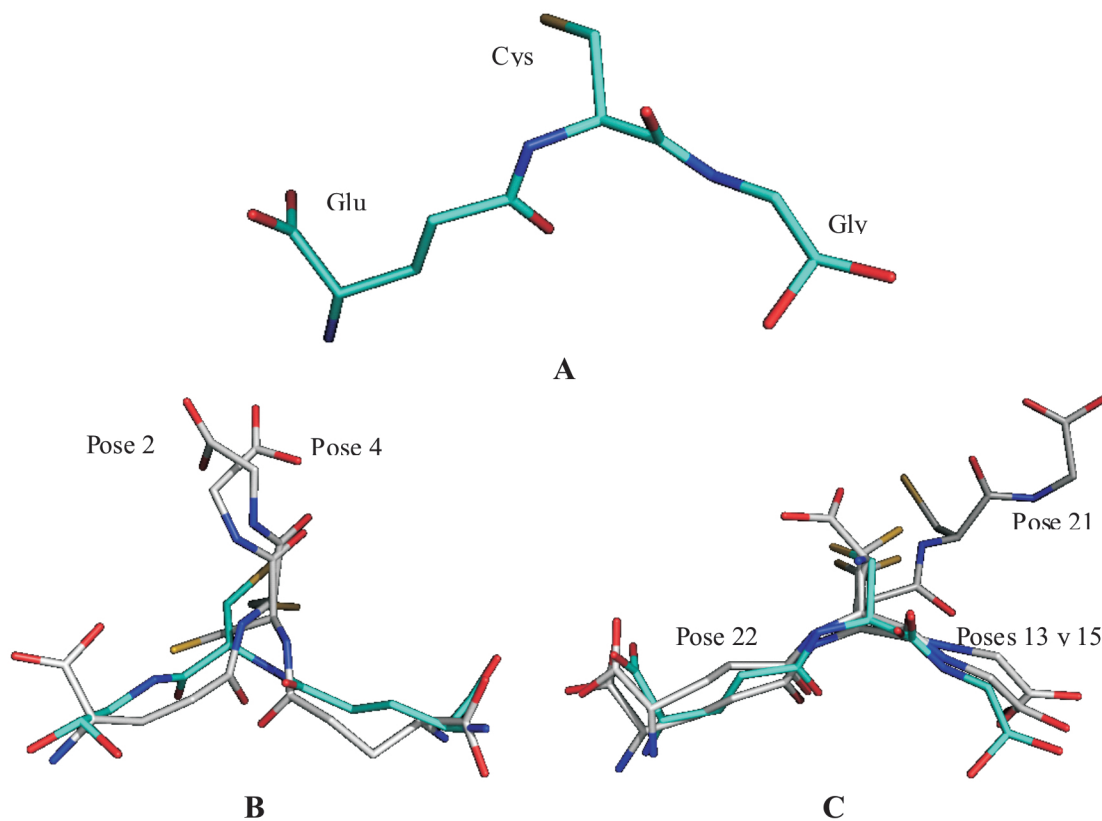


Figura 10. Residuos que componen la molécula de glutión (A) y poses que adopta en la estructura cristalina (azul), y como resultado del docking en medio vacío (B) y en medio acuoso (C).

movilidad dentro del sitio activo de modo que se generen poses con alta afinidad de unión pero con menor probabilidad de ocurrencia que otras poses con menor afinidad de unión. Puesto que las funciones de evaluación solo muestran el valor total de la función y no la contribución de cada parámetro interno de esta, no es posible discriminar que tipo de interacción ejerce mayor influencia en las poses obtenidas, por lo cual se hace necesario emplear otros recursos para determinar el número y la naturaleza de las interacciones entre los ligandos α -halo alcanólicos y los aminoácidos del sitio activo.

Las poses que adopta una molécula en un receptor son producto de las interacciones ligando-receptor, interacciones que dependen del par de átomos que entren en contacto. Para analizar los tipos y cantidad de contactos generados en las poses escogidas como resultado del docking molecular entre la GSTZ-glutación y la GSTZ-ácidos α -halogenados se empleó el servidor LPC/CSU (<http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpccsu/LpcCsu.cgi>), el cual evalúa los contactos interatómicos en biomoléculas y sus complejos de acuerdo con la siguiente clasificación atómica:

- Hidrofílicos (**I**). Nitrógenos y oxígenos que pueden donar y aceptar puentes de hidrógeno (ej. Oxígeno de grupos hidroxilo de residuos Ser o Thr).
- Aceptores (**II**). Nitrógenos u oxígenos que solo pueden aceptar un puente de hidrógeno.
- Donador (**III**). Nitrógenos que solo pueden donar un puente de hidrógeno.
- Hidrofóbicos (**IV**). Todos los átomos de carbono que no están presentes en anillos aromáticos ni están unidos covalentemente a nitrógeno u oxígeno y los halógenos cloro, bromo y yodo.
- Aromáticos (**V**). Átomos de carbono en anillos aromáticos, sin importar cualquier otro tipo de enlace del átomo.
- Neutros (**VI**). Átomos de carbono con enlace covalente a, al menos, un átomo hidrofílico o dos o más átomos aceptores; átomos metálicos; azufre, flúor y fósforo.
- Donadores neutros (**VII**). Átomos de carbono que poseen un enlace covalente con un solo átomo donador.
- Aceptores neutros (**VIII**). Átomos de carbono que poseen un enlace covalente con un solo átomo aceptor.

Así, los diferentes tipos de interacciones que se forman se clasifican en:

- contactos hidrofóbicos (Ph),
- puentes de hidrógeno (Hb),
- contactos aromático-aromático (Ar),
- contactos hidrofílico-hidrofóbico (HH),
- contactos aceptor-aceptor (AA),
- contactos donador-donador (DD),
- otros (-).

Los tipos de interacciones que se pueden generar al entrar en contacto los átomos del ligando con los del receptor se resumen en la Tabla 7.

De acuerdo con la clasificación anterior, el número y los tipos de interacciones de las mejores poses de la molécula de glutación y la GSTZ se resumen en la Tabla 8; también se muestran las interacciones con la GSTZ optimizada en medio vacío y optimizada en medio acuoso.

Las interacciones que contribuyen a estabilizar cada complejo son los puentes de hidrógeno (Hb), los contactos hidrofóbicos (Ph) y los contactos aromáticos; en tanto que los que lo desestabilizan son los contactos aceptor-aceptor

Tabla 7. Tipo de interacción generada para cada par atómico en contacto.

Clase atómica	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I	Hb	Hb	Hb	HH	-	-	-	-
II	Hb	AA	Hb	HH	-	-	-	-
III	Hb	Hb	DD	HH	-	-	-	-
IV	-	HH	HH	Ph	Ph	Ph	Ph	Ph
V	-	-	-	Ph	Ar	-	-	-
VI	-	-	-	Ph	-	-	-	-
VII	-	-	-	Ph	-	-	-	-
VIII	-	-	-	Ph	-	-	-	-

Tabla 8. Interacciones determinadas para los diferentes complejos entre glutatión y GSTZ en medios vacío y acuoso.

Complejo \ Tipo de contacto	Hb	Ph	HH	AA	Otros
Optimizado en vacío	22	24	21	2	44
Pose-02 en vacío	17	19	15	4	40
Pose-04 en vacío	26	19	16	4	44
Optimizado en agua	36	15	25	4	44
Pose-13 en agua	25	14	18	7	65
Pose-15 en agua	27	13	22	7	61
Pose-21 en agua	24	13	18	2	48
Pose-22 en agua	20	10	15	8	70

(AA), donador-donador (DD) y contactos hidrofílico-hidrofóbico; las interacciones restantes, dependiendo del par atómico en contacto, pueden estabilizar o no el complejo. Los residuos del receptor que mayor participación por área adquieren en la interacción con glutatión se muestran en la Tabla 9, y en Tabla 10 se muestran los átomos de glutatión que presentan mayor número de contactos.

El residuo que mayor número de interacciones genera en la GSTZ optimizada (en ambos medios) es Gln 58, lo

cual es corroborado con los resultados del docking de la estructura optimizada en agua ya que las tres poses con posición similar (13, 15 y 22) a la de glutatión también tienen ese mismo residuo. Las poses restantes (en vacío y en agua) generan interacciones con residuos diferentes debido a su posición.

Los residuos de glutamina (Gln) señalados en la Tabla 9 presentan interacciones por su cadena lateral primordialmente.

Tabla 9. Residuos del sitio activo que presentan el mayor número de interacciones calculadas para los diferentes complejos entre glutatión y GSTZ en medios vacío y acuoso.

Complejo	Número de contactos por residuo					
	Residuo	#	Residuo	#	Residuo	#
Optimizado en vacío	Gln 58	16	Asn 115	9	Gln 111	9
Pose-02 en vacío	Leu 116	12	Gln 58	9	Gln 45	7
Pose-04 en vacío	Gln 111	11	Gln 71	10	Cys 16	10
Optimizado en agua	Gln 58	13	Gln 71	11	Val 59	8
Pose-13 en agua	Gln 58	18	Gln 71	11	Asn 115	9
Pose-15 en agua	Gln 58	18	Gln 71	11	Cys 16	10
Pose-21 en agua	Arg 175	11	Val 59	8	Cys 16	7
Pose-22 en agua	Gln 58	16	Asn 115	12	Gln 71	9

Tabla 10. Átomos de la molécula de glutatión que presentan el mayor número de contactos con los residuos del sitio activo.

Complejo	Número de contactos					
	Átomo	#	Átomo	#	Átomo	#
Optimizado en vacío	S 20	13	C 5	9	O 18	8
Pose-02 en vacío	O 14	9	S 20	8	O 18	7
Pose-04 en vacío	S 20	17	C 11	9	N 1	9
Optimizado en agua	N 1	14	O 18	11	S 20	10
Pose-13 en agua	O 15	14	S 20	12	O 19	9
Pose-15 en agua	O 15	14	C 13	12	O 19	9
Pose-21 en agua	C 6	13	C 13	9	C 11	9
Pose-22 en agua	O 15	11	S 20	11	C 12	10

Aductos s-(halocarboxialquil)-glutación

Las interacciones de las mejores poses de los ácidos α -halo alcanóicos (enlazados covalentemente a glutación) y la GSTZ optimizada en vacío se resumen en la Tabla 11, y en la Tabla 12 se hallan los resultados con la GSTZ optimizada en medio acuoso; el número y tipo de interacciones para cada ligando difiere en los dos medios debido a la posición que toman, la conformación que adoptan y la presencia de moléculas de agua en el sitio activo de la estructura solvatada.

La superposición de las mejores poses de los ácidos α -halo alcanóicos, mostrada en la Figura 11, señala que la mayor variación se produce en los residuos ácido glutámico (Glu) y cisteína modificada (Cys- α -halo ácido) de la molécula del ligando, mientras que el residuo glicina (Gly) permanece con poca variación. Sin embargo, la orientación de estos compuestos dentro del sitio activo contrasta en gran medida con la posición que adopta la molécula de glutación

en la estructura optimizada, ya que la posición de la cisteína y de la glicina se intercambia.

Las interacciones para los ligandos y la GSTZ optimizada en medio acuoso muestran una disminución en las interacciones hidrofóbicas y un aumento en la cantidad de puentes de hidrógeno y en las interacciones clasificadas como otras. Las moléculas de agua presentes en el sitio activo son responsables de este comportamiento, no obstante, debido a las poses que asumen los ligandos, las moléculas de agua que interactúan con estos son diferentes. Cabe destacar que a pesar de hallarse moléculas de agua dentro del sitio activo, los ligandos se pueden acomodar de manera tal que se favorece la afinidad de unión.

La orientación del residuo Gly de los ligandos se orienta principalmente hacia los residuos del receptor Asn 115, Leu 116, Ser 117, Asn 172 y Arg 175, y menos frecuente hacia los residuos Ser 15, Cys 16, Gln 45 y Phe 46.

Tabla 11. Tipos y cantidad de contactos generados por la interacción de la GSTZ optimizada en vacío y los ácidos α -halogenados.

Ligando	Hb	Ph	HH	AA	Otros
BrAc R-01	22	26	21	4	33
BrAc S-01	24	24	17	6	44
BrAc S-03	27	25	18	5	46
BrAc S-07	26	25	20	5	40
BrAc S-15	29	24	17	5	45
ClAc R-01	22	24	21	4	33
ClAc R-15	25	19	22	4	40
ClAc R-25	26	21	15	7	43
ClAc R-27	24	25	21	4	36
ClAc R-34	25	25	24	6	44
ClAc S-4	30	26	21	8	43
ClAc S-8	26	23	20	5	40
ClAc S-14	23	27	17	7	34
FAc R-07	27	18	19	5	44
FAc R-19	26	25	18	6	39
FAc S-01	22	22	19	4	37
FAc S-05	30	25	18	5	45
ClPr-R-07	28	29	29	3	46
ClPr-R-13	25	31	28	3	44
ClPr-R-16	25	35	26	3	42
ClPr-S-8	29	26	25	5	38
ClPr-S-13	26	23	16	7	39
ClPr-S-18	25	28	23	3	33
Pr-R-3	24	23	27	5	39
Pr-R-5	27	22	25	4	45
Pr-R-8	27	25	25	5	41
Pr-S-19	22	28	31	6	41

Tabla 12. Tipos y cantidad de contactos generados por la interacción de la GSTZ optimizada en agua y los ácidos α -halogenados.

Ligando / Tipo de contacto	Hb	Ph	HH	AA	Otros
BrAc R-12	25	14	26	9	65
BrAc R-16	36	13	22	5	67
BrAc S-01	25	16	26	8	69
BrAc S-02	30	17	25	10	60
BrAc S-04	24	18	20	11	59
BrAc S-06	25	16	22	10	61
BrAc S-14	34	15	23	6	64
ClAc R-10	28	14	31	6	69
ClAc R-13	36	13	23	5	67
ClAc S-02	30	18	23	10	60
ClAc S-03	24	18	19	11	59
ClAc S-04	25	15	27	9	66
ClAc S-08	29	15	20	11	72
ClAc S-16	36	16	23	5	67
ClAc S-18	30	16	24	6	72
ClAc S-19	37	17	23	6	74
FAc R-06	25	12	21	9	75
FAc R-08	27	13	15	10	83
FAc S-05	25	12	21	9	73
FAc S-09	36	10	16	5	77
FAc S-14	36	14	18	7	81
ClPr-R-02	33	27	40	6	45
ClPr-R-09	32	29	41	6	43
ClPr-R-10	37	25	35	6	42
ClPr-R-12	33	27	42	6	41
ClPr-R-14	30	23	33	5	40
ClPr-R-16	35	24	34	5	42
ClPr-R-26	36	25	34	5	42
ClPr-R-30	31	25	36	3	36
ClPr-R-33	31	24	40	2	44
ClPr-S-01	30	25	37	3	46
ClPr-S-02	26	27	46	3	45
Pr-R-13	32	29	39	2	38
Pr-S-19	38	24	34	6	43

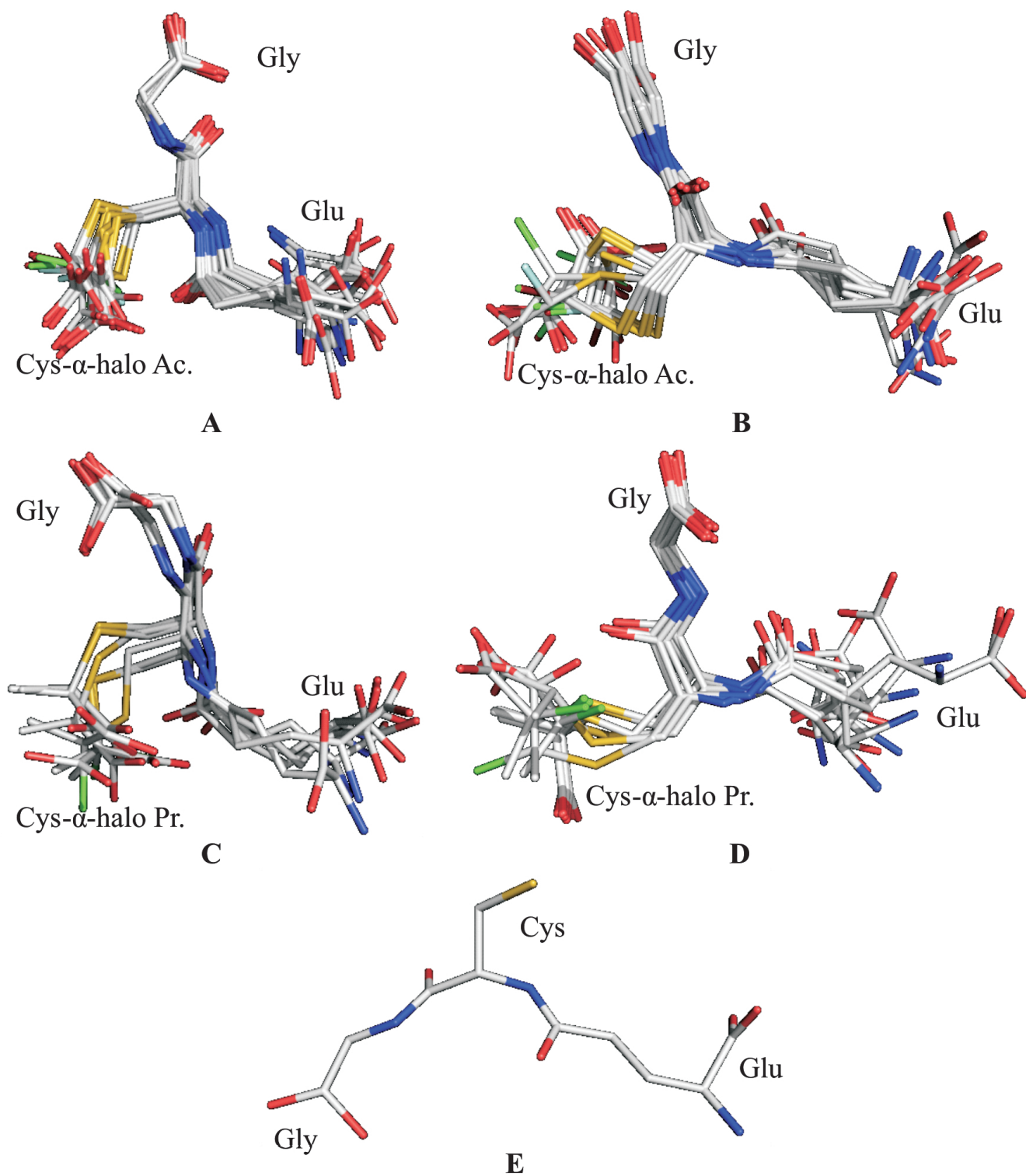


Figura 11. Superposición de las mejores poses de los ácidos α -halo acéticos obtenidos del docking en vacío (A) y en medio acuoso (B), y de los ácidos α -halo propanoicos en vacío (C) y en medio acuoso (D); pose que adopta la molécula de glutatión en la estructura elucidada por rayos X (E). Los átomos de carbono se muestran en color blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y azufre en amarillo; se omiten los átomos de hidrógeno para una visualización mejor.

Los métodos computacionales basados en la mecánica molecular, como el docking, no permiten tomar en cuenta factores electrónicos los cuales son de suma importancia en las reacciones químicas; por esta razón se implementó un cálculo mecánico cuántico que resolviera de manera aproximada la formación de los ligandos y los complejos GSTZ-ligando.

Perfil de Reacción

Los esquemas de reacción estudiados involucraron las siguientes etapas:

Formación de los aductos de glutatión con ácidos α -halo acéticos

En esta etapa se simuló la reacción entre los ácidos dihalo acéticos (*a*) con glutatión (*b*), para formar el respectivo derivado enantiomérico S-(α -halocarboximetil)-glutatión (*c*) y un hidrácido (*d*), como se esquematiza en la Figura 12. La estructura molecular del reactivo *b* provino del proceso de docking molecular, la energía tomada para tal estructura fue el promedio de energías de las poses.

Las energías obtenidas, en medios vacío y acuoso, para los reactivos (*a* y *b*) y los productos (*c* y *d*) se hallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Energías, en electronvoltios, obtenidas por medio del método semiempírico SAM1 para las moléculas involucradas en la reacción estudiada.

Compuesto	X ₁	X ₂	X ₃	Quiralidad	Vacío eV	Agua eV	ΔE eV
a	Br	Br	H	-	-1686.14	-1686.73	-0.59
a	Br	Cl	H	R	-1679,02	-1679,56	-0.54
a	Br	Cl	H	S	-1679,02	-1679,56	-0.54
a	Br	F	H	R	-1794,21	-1794,68	-0.46
a	Br	F	H	S	-1794,05	-1794,85	-0.80
a	Cl	Cl	H	-	-1671,88	-1672,37	-0.49
a	Cl	F	H	R	-1787,10	-1787,71	-0.61
a	Cl	F	H	S	-1786,97	-1787,58	-0.61
a	F	F	H	-	-1902,64	-1903,28	-0.64
a	Cl	Cl	CH ₃	-	-1853.73	-1854.20	-0.47
b	-	-	-	-	-4599,10	-4600,79	-1.69
c	-	Br	H	R	-5921,08	-5924,02	-2.95
c	-	Br	H	S	-5921,20	-5923,97	-2.77
c	-	Cl	H	R	-5913,85	-5916,74	-2.89
c	-	Cl	H	S	-5914,03	-5916,74	-2.71
c	-	F	H	R	-6028,81	-6031,78	-2.97
c	-	F	H	S	-6029,63	-6031,77	-2.14
c	-	Cl	CH ₃	R	-6096.49	-6098.51	-2.02
c	-	Cl	CH ₃	S	-6096.48	-6098.32	-1.85
c	-	Cl	H	R	-1529.12	-1529.69	-0.57
c	-	Cl	H	S	-1529.12	-1529.69	-0.57
c	-	H	CH ₃	R	-5771,83	-5773,88	-2,05
c	-	H	CH ₃	S	-5771,87	-5773,96	-2,09
d	Br	-	-	-	-363,78	-363,98	-0.20
d	Cl	-	-	-	-356,89	-357,08	-0.19
d	F	-	-	-	-472,51	-472,93	-0.42

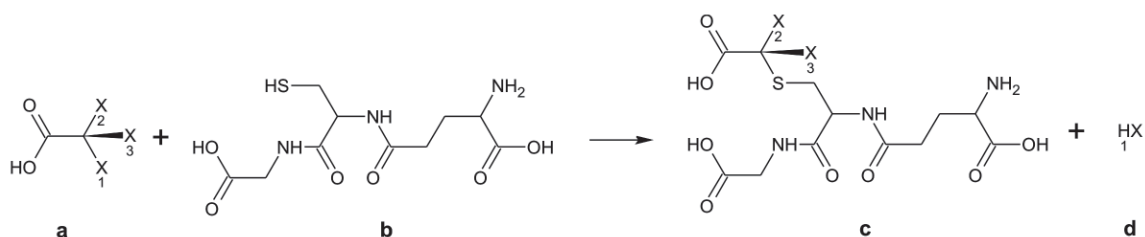


Figura 12. Reacción simulada para la formación de los ácidos α -halo alcanoicos. Si X_1 es Cl, Br o F, X_2 es Cl, Br o F y X_3 es H se forman aductos de ácidos α -halo acéticos unidos a glutatión; en tanto que si X_1 y X_2 son Cl o H y X_3 es CH_3 se producen aductos de ácidos α -cloro propanoicos enlazados a glutatión.

Cabe notar que el aducto **c**, puede ser generado de varias formas, así por ejemplo si X_2 es bromo (Br) en el aducto **c**, ese átomo de Br solo puede provenir de una molécula (**a**) que lo posea, las cuales son ácido dibromo acético, ácido bromocloro acético y ácido bromofluor acético. Si como producto de la reacción se produce cloruro o fluoruro de hidrógeno (**d**); entonces la quiralidad (R o S) proveniente de los ácidos bromocloro y bromofluor acéticos se mantiene en el aducto **c** (Figura 13), lo cual se debe a que el Br posee mayor número atómico que Cl y F.

Si contrario a la reacción anterior, el halógeno del hidrácido producido (**d**) es de mayor número atómico que el que hace parte del aducto **c**, entonces se invierte la quiralidad del centro (Figura 14).

El cambio de energía involucrado en la solvatación (ΔE en la Tabla 12) indica una mayor estabilidad de todas las moléculas cuando se encuentran inmersas en agua. Con base en las reacciones propuestas en la Figura 12, se determinó su energía de reacción en ambos medios, teniendo en cuenta los cambios mostrados en las Figuras 13 y 14, como un cambio de productos menos reactivos. Los resultados son mostrados en la Tabla 14.

$$\Delta E_{\text{reacción}} = E_{\text{productos}} - E_{\text{reactivos}}$$

Las energías de reacción positiva muestran una termodinámica inversa a la planteada, lo cual indica que la posibilidad de que la reacción proceda en la forma propuesta

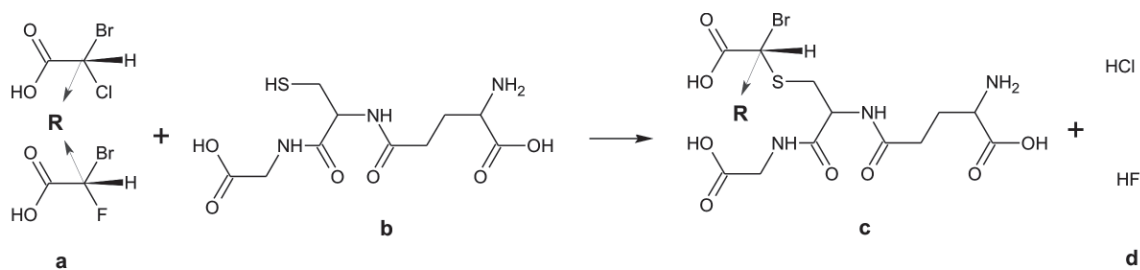


Figura 13. Conservación de la quiralidad proveniente del ácido acético hetero-dihalogenado en el aducto **c** (S-(halocarboximetil)-glutatión o S-(halocarboxietil)-glutatión).

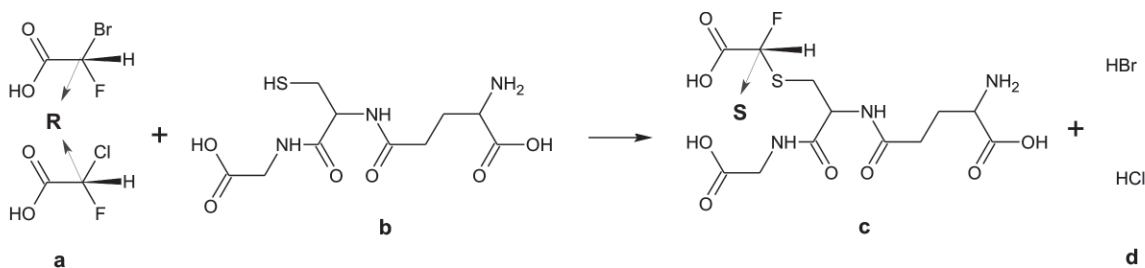


Figura 14. Cambio de la quiralidad proveniente del ácido acético hetero-dihalogenado en el aducto **c**.

Tabla 14. Energía de reacción para la formación de S-(halocarboximetil)-glutatin y S-(halocarboxietil)-glutatin.

Aducto	Quiralidad	Haloácido formado	Energía de reacción (eV)	
			en Vacío	en Agua
GS + BrAc	R	HBr	0,39	-0,48
		HCl	0,15	-0,75
		HF	-0,27	-1,48
	S	HBr	0,26	-0,43
		HCl	0,03	-0,70
		HF	-0,56	-1,26
GS + ClAc	R	HBr	0,49	-0,37
		HCl	0,23	-0,67
		HF	-0,16	-1,17
	S	HBr	0,31	-0,36
		HCl	0,06	-0,66
		HF	-0,47	-1,29
GS + FAc	R	HBr	0,56	-0,12
		HCl	0,37	-0,49
		HF	0,42	-0,64
	S	HBr	-0,10	-0,28
		HCl	-0,32	-0,35
		HF	-0,40	-0,62
GS + ClPr	R	HCl	-0,54	-0,60
	S	HCl	-0,54	-0,41
GS + Pr	R	HCl	0,35	0,58
	S	HCl	0,36	0,77

es poco probable, mas no así la reacción inversa. Los resultados muestran que la energía de reacción en vacío de S-(bromocarboximetil)-glutatin y S-(clorocarboximetil)-glutatin solo es favorable cuando el ácido acético α -halogenado reaccionante contiene flúor, para esto se necesita que se rompa un enlace C-F, el cual es muy energético. Cuando un producto de la reacción es S-(fluorocarboximetil)-glutatin, el cambio de energía, predice solo la formación del enantiómero S. Las reacciones antes mencionadas son todas favorables en medio acuoso.

La energía involucrada, en medios vacío y acuoso, en la formación de S-(clorocarboxietil)-glutatin es favorable cuando el reactivo de partida es ácido α -dicloropropanoico, y desfavorable cuando el reactivo es ácido α -cloropropanoico.

Transformación de los aductos s-(α -halocarboxialquil)-glutatin

La otra reacción estudiada en este trabajo comprendió la transformación de los S-(α -halocarboxialquil)-glutatin,

obtenidos en la reacción anterior, en S-(α -hidroxicarboxialquil)-glutatin como se muestra en la Figura 15.

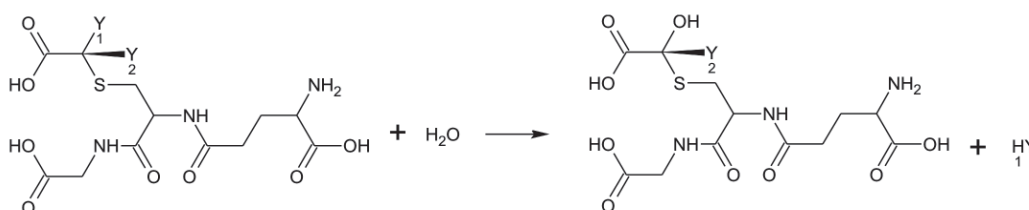
Los resultados obtenidos para la energía de reacción se hallan en la Tabla 15; en ellos se aprecia un favorecimiento general de la formación de S-(α -hidroxicarboxialquil)-glutatin en vacío, sin embargo en medio acuoso la reacción solo es posible cuando se emplea S-(α -fluorocarboximetil)-glutatin como reactivo. Este último hallazgo es acorde con los resultados experimentales, los cuales señalan que los ácidos α -fluor acéticos son metabolizados por la GSTZ.

Conclusiones

La optimización de la GSTZ y posterior comparación con la estructura de rayos X mostró variaciones en la distribución de estructuras secundarias, accesibilidad de los aminoácidos (incluso los del sitio activo), perfil lipofílico, potencial electrostático molecular; sin embargo, estos cambios son posibles ya que las moléculas son entes dinámicos que pueden presentar cambios a través del tiempo.

Tabla 15. Energía de reacción para la formación de S-(hidroxicarboximetil)-glutación y S-(hidroxicarboxietil)-glutación.

Compuesto	Quiralidad	Haloácido formado	Energía de reacción (eV)	
			en Vacío	en Agua
GS + OHAc	R	HBr	-0,66	0,41
		HCl	-0,99	0,03
		HF	-1,66	-0,78
	S	HBr	-0,55	0,28
		HCl	-0,84	0,05
		HF	-0,85	-0,87
GS + OHPPr	R	HCl	-0,16	0,89
	S	HCl	0,83	0,69

**Figura 15.** Reacción de transformación de los aductos S-(α -halocarboxialquil)-glutación en S-(α -hidroxicarboxialquil)-glutación; Y_1 puede ser Br, Cl o F y Y_2 es H o CH_3 .

A pesar de las diferencias numéricas en los valores de las funciones de evaluación y teniendo en cuenta el error asociado a la utilización de métodos derivados de la mecánica clásica los resultados de docking molecular fueron lo suficientemente adecuados para estimar la posible localización y conformación de los aductos formados entre glutación y ácidos α -haloalcanoicos; estos resultados mostraron una apropiada complementariedad geométrica entre el sitio activo y los α -haloalcanoicos, no evidenciaron diferencias significativas con respecto a estereoselectividad y estereoespecificidad de la GSTZ hacia los ácidos α -haloalcanoicos. Adicionalmente los resultados sugieren que los ligandos estudiados tienen la suficiente movilidad dentro del sitio activo para generar poses con alta afinidad de unión pero con poca probabilidad de ocurrencia, lo cual puede deberse a la orientación que asumen algunos átomos de hidrógeno.

El número y tipo de interacciones ligando-proteína varían ampliamente con la disposición espacial y conformación de los ligandos. No obstante, en general, la orientación del residuo Gly de los ligandos, el cual presenta menor variación, se orienta principalmente hacia los residuos del receptor Asn 115, Leu 116, Ser 117, Asn 172 y Arg 175, y menos frecuente hacia los residuos Ser 15, Cys 16, Gln 45 y Phe 46.

Los resultados obtenidos con el método semiempírico SAM1 no muestran la formación forzosa de un enlace covalente entre los aductos α -haloalcanoicos y la GSTZ para que se produzca inhibición. La primera reacción estudiada muestra que en medio vacío solo se formarían los aductos S-(bromocarboximetil)-glutación y S-(clorocarboximetil)-glutación por la ruptura de un enlace carbono-flúor de alta energía. En medio acuoso la energía de reacción favorece la formación de todos los aductos S-(halocarboxialquil)-glutación. La segunda reacción prevé la transformación de los aductos S-(halocarboxialquil)-glutación en S-(hidroxicarboxialquil)-glutación en medio vacío, sin embargo, la GSTZ es una proteína citosólica y por ende se halla embebida en un medio acuoso, para el cual la reacción muestra solo la posible ocurrencia de las reacciones que involucren S-(fluorocarboximetil)-glutación, lo cual es acorde a la evidencia experimental.

En general el efecto del agua como medio solvente favorece las reacciones de los α -haloácidos en la transformación de los aductos S-(α -halocarboxialquil)-glutación en S-(α -hidroxicarboxialquil)-glutación. Los cálculos hechos en medio acuoso ayudan a entender mejor algunos aspectos desde el punto de vista electrostático del sitio activo de la molécula.

Referencias

1. **Sheehan D, Meade G, Foley VM y Dowd CA.** 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360**, 1-16.
2. **Hayes J D y Pulford, D. J.** 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 445-600.
3. **Mannervik, B. y Danielson, H.** 1988. Glutathione transferases -structure and catalytic activity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **23**, 283-337.
4. **Board PG, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T y Webb G.** 1990. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: A complex of gene families *Pharmacology & Therapeutics*. **48**, 357-369.
5. **Shea TC, Clafin G, Comstock KE, Sanderson BJS, Burstein NA, Keenan EJ, Mannervik B y Henner WD.** 1990. Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers. *Cancer Research* **50**, 6848-6853.
6. **Board PG, Anders MW y Blackburn AC.** 2005. Catalytic Function and Expression of Glutathione Transferase Zeta en Drug Metabolism and Transport: *Molecular Methods and Mechanisms*, Edited by: L. Lash Humana Press Inc., Totowa, NJ 85-107.
7. **Stewart JJP.** 2002. MOPAC 2002 Manual. Fujitsu Limited.
8. **Polekhina G, Board PG, Blackburn AC and Parker MW.** 2001. Crystal Structure of Maleylacetoacetate Isomerase/ Glutathione Transferase Zeta Reveals the Molecular Basis for Its Remarkable Catalytic Promiscuity. *Biochemistry* **40**, 1567-1576.
9. **Hutchinson, EG y Thornton, JM.** 1996. PROMOTIF - A program to identify structural motifs in proteins. *Protein Science*. **5**, 212-220.
10. **Clark M, Cramer RD y Van Opdenbosch.** 1989. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*. **10** (8), 982 - 1012.
11. **Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA.** 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**, 10037-10041.
12. **Ruppert J, Welch W y Jain AN.** 1997. Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. *Protein Science* **6**(3), 524-533.
13. **Rarey M, Kramer B, Lengauer T and Klebe G.** 1996. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology* **261**, 470-489.
14. **Kramer B, Rarey M y Lengauer T.** 1999. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. **37**(2) 228-241.
15. **Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV y Mee RP.** 1997. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **11**, 425-445.
16. **Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R y Ferrin TE.** 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology* **161**, 269-288.
17. **Muegge I y Martin YC.** 1999. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 791-804.
18. **Muegge I.** 2006. PMF Scoring Revisited. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 5895-5902.
19. **Jones G, Willett P, Glen R, Leach AR y Taylor R.** 1997. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology* **267**(3), 727-748.
20. **Wang R., Lu Y y Wang S.** 2003. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**(12), 2287-2303.
21. **Gasteiger J, y Marsilli M.** 1980. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **36**, 3219-3288.
22. **Hestenes M y Stiefel E.** 1952. Methods of Conjugate Gradients for Solving Linear Systems. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **49**, 409-436.
23. **Press W, Flannery B, Teukolsky S y Vetterling W.** 1992. *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing*, 2da Edition. Cambridge University Press, CONJUGATE GRADIENTS (p. 420), SIMPLEX (p. 430)
24. **Lovell S, Davis I, Arendall W III, de Bakker P, Word J, Prisant M, Richardson J y Richardson D.** 2002. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. **50**(3), 437-450.
25. **Laurie A. y Jackson R.** 2005. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. *Bioinformatics* **21**(9):1908-1916.
26. **Ledvina PS, Yao N, Choudhary A. y Quioco FA.** 1996. Negative electrostatic surface potential of protein sites specific for anionic ligands. *Biochemistry*. **93**, 6786 -679.
27. **Hildebrandt A, Blossey R, Rjasanow S, Kohlbacher O. y Lenhof H.** 2006. Electrostatic potentials of proteins in water: a structured continuum approach. *Bioinformatics*. **23**, e99-e.
28. **Weiner PK, Langridge R, Blaney JM, Schaefer R y Kollman PA.** 1982. Electrostatic Potential Molecular Surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 3754-3758.
29. **Böhm HJ.** 1994. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **8**(3), 243-256.

Recibido: agosto 19 de 2008.

Aceptado para su publicación: mayo 11 de 2009.