

MODELAMIENTO ESTRUCTURAL Y ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA POLIFENOL OXIDASA DEL LULO (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla

STRUCTURAL MODELING AND MOLECULAR DOCKING OF THE POLYPHENOL OXIDASE PROTEIN OF THE LULO (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla

Cristian C. Rocha^{1*}, Diego A. Molina², Clara M. Mejía³

Universidad del Quindío, (1) Programa de Química, (2) Centro de Investigación Biomédicas, Grupo de Parasitología Molecular (GEPAMOL), (3) Grupo de investigación Agroindustria de Frutas Tropicales (AFT), Cra. 15 #12N, Armenia - Colombia

*autor de correspondencia (e-mail: cristianr420@hotmail.com)

Recibido: 07/06/2017 - Evaluado: 03/08/2017 - Aceptado: 01/09/2017

RESUMEN

Se describió la posible estructura 3D y algunas características importantes para la actividad oxidorreductasa de la proteína polifenol oxidasa del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla (*sqPFO*) por medio de herramientas bioinformáticas; a partir de esta estructura se realizó estudios de acoplamiento molecular para el sitio activo de la *sqPFO* evaluando varios ligandos reportados como inhibidores de Polifenol oxidasas (PFO), se usó el ácido kójico como control. Los ligandos usados como posibles inhibidores del sitio activo de la *sqPFO* presentaron energías bajas con relación a la presentada por el ácido kójico, además de interacciones con residuos importantes del sitio activo de las PFO; el ligando Naftilchalcona hidroxilado presentó la energía de afinidad de enlace más baja y además no presentó características tóxicas. Éste es el inicio para el estudio del mecanismo de inhibición y toxicidad de posibles inhibidores para el sitio activo de la *sqPFO*.

ABSTRACT

The possible 3D structure and some important characteristics for the oxidoreductase activity of the polyphenol oxidase protein of the lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla (*sqPFO*) was described by means of bioinformatic tools; from this structure, molecular docking studies for the active site of the *sqPFO* were performed by evaluating several ligands reported as inhibitors of polyphenol oxidases (PFO), and the kojic acid was used as a control. Ligands used as potential inhibitors of the active site of *sqPFO* had low energies relative to that presented by kojic acid, in addition to interactions with important residues of the active site of PFOs; the hydroxylated naftilchalcone ligand had the lowest binding affinity energy and also showed no toxic characteristics. This is the beginning for the study of the mechanism of inhibition and toxicity of possible inhibitors for the active site of the *sqPFO*.

Palabras clave: modelamiento por homología, tirosinasa, pardeamiento enzimático
Keywords: homology modeling, tyrosinase, browning enzymatic

INTRODUCCIÓN

El pardeamiento enzimático es el principal causante del deterioro de las propiedades organolépticas y nutricionales de frutas y verduras (Gil *et al.*, 2012) y está principalmente relacionado con la actividad de un grupo de enzimas llamadas Polifenol oxidasas (PFOs), las cuales catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a sus respectivos compuestos *o*-quinonas. En plantas, estas proteínas transforman los compuestos *o*-quinonas en pigmentos oscuros que son indeseables en el momento de emplear frutas y verduras en el campo industrial (Suárez *et al.*, 2009). En el hombre se ha demostrado la estrecha relación de estas proteínas con el desarrollo de enfermedades como el Parkinson, ocurrida por una sobre producción de compuestos *o*-quinonas (Asanuma *et al.*, 2003). Por otro lado, las PFOs son sintetizadas en el citoplasma y entran en contacto con compuestos fenólicos presentes en las vacuolas sólo después de que ha ocurrido algún daño en el fruto como consecuencia de algún impacto mecánico ocasionado durante la recolección de la cosecha o su manipulación en la etapa de postcosecha (Vela, 2014). En la industria alimentaria suele controlarse los efectos del pardeamiento enzimático durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos por medio de metodologías, como tratamientos térmicos y atmósferas modificadas, pero éstas metodologías en muchos casos causan la pérdida de características propias del fruto como aroma, color, textura, nutrientes y demás; una metodología alterna es el uso de agentes químicos que se basa en evitar el contacto del sustrato con el sitio catalítico de la proteína, siendo usados generalmente como aditivos alimenticios (Ioannou & Ghoul, 2013). Por otro lado, hasta el momento se ha caracterizado la cinética de la enzima Polifenol oxidasa en diferentes estadios de maduración en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla (Mejía-Doria *et al.*, 2014) y se ha hecho la descripción molecular de este gen (Mejía-Doria *et al.*, 2012), pero no hay información estructural para la proteína *sqPFO*, por lo tanto en este estudio se describe el modelo 3D de la proteína Polifenol oxidasa mediante herramientas computacionales. Además, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con el fin de obtener una perspectiva del mecanismo de inhibición de la *sqPFO*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína *sqPFO*

La secuencia de aminoácidos de la proteína *sqPFO* se obtuvo de Mejía-Doria *et al.*, (2012), a continuación se realizó una búsqueda de posibles similitudes y homologías con proteínas reportadas experimentalmente usando la herramienta de alineamientos BLAST (Altschul *et al.*, 1990) y MUSCLE (Edgar, 2004). La búsqueda de dominios y motivos conservados se realizó usando las herramientas Conserved Domains (Marchler-Bauer *et al.*, 2011), SMART (Schultz *et al.*, 1998) y Motif Search (Bucher *et al.*, 1996). Seguido a esto, se predijeron algunas características fisicoquímicas para la secuencia de aminoácidos de la *sqPFO* usando la herramienta ProtParam, (Garg *et al.*, 2016). La topología de la estructura secundaria de la *sqPFO* se predijo usando la herramienta PDBsum (Laskowski *et al.*, 1997).

Construcción, descripción y evaluación del modelo 3D de la proteína *sqPFO*

Se usó el servidor I-TASSER (Zhang, 2008) como herramienta para construir un modelo 3D de la *sqPFO* basado en un Modelamiento por homología. Posteriormente, se evaluó la calidad de dicho modelo usando el gráfico de Ramachandran suministrado por la herramienta PDBsum (Laskowski *et al.*, 1997) y la herramienta de alineamiento estructural FATCAT (Ye & Godzik, 2004).

Estudio de Acoplamiento molecular

Para iniciar el estudio de acoplamiento molecular se seleccionó de la literatura un pequeño grupo de ligandos que han sido reportados como inhibidores de proteínas PFO, estos ligandos presentan similitud estructural con algunos sustratos naturales de proteínas PFO como catecol, tirosina y L-DOPA. Se evaluaron las energías de afinidad de enlace obtenidas y las interacciones presentes con los aminoácidos de la entrada del sitio activo de

la proteína *sqPFO*; los ligandos a evaluar fueron: Naftilchalcona hidroxilada (NCH) (Radhakrishnan *et al.*, 2015), Rutina (RUT) (Si *et al.*, 2012), Neorauflavane (NRF) (Tan *et al.*, 2016), Tricin (TRI) (Mu *et al.*, 2013), Arbutina (ARB) (Kang *et al.*, 2012) y el ácido kójico (AK), el cual fue usado como control dado a su amplia presencia en productos cosméticos despigmentadores o blanqueadores de la piel además de ser usado como aditivo alimenticio. Se ha reportado que el ácido kójico presenta características toxicológicas como tumorigénico y mutagénico, por esto, se predijo las características toxicológicas de los ligandos anteriormente mencionados usando el software DataWarrior (Sander *et al.*, 2015). Los ligandos se dibujaron y optimizaron usando el software GAUSSIAN (Frisch *et al.*, 2007), la conversión de los formatos de los archivos se realizó usando Open Babel GUI (O'Boyle *et al.*, 2011). Los acoplamientos se llevaron a cabo usando Autodock Vina (Trott & Olson, 2010), configurando una caja de dimensiones x: 23, y: 23, z: 23; coordenadas x: 73.196, y: 66.729, z: 69.641 y una exhaustividad de 15. La visualización de los resultados se realizó mediante Chimera 1.11.2 (Pettersen *et al.*, 2004) y Discovery Studio BIOVIA (BIOVIA, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína *sqPFO*

El análisis de la secuencia de la *sqPFO* de 641 aminoácidos hecho con la herramienta BLAST indicó que la proteína PFO de la berenjena (*Solanum melongena*), *smPFO*, accesión AFJ79642.1, presentó un porcentaje de identidad de 58% y una cobertura de 99%, siendo estos los mayores valores obtenidos tras los alineamientos hechos por BLAST, además se encontró que al menos las primeras 15 secuencias proteicas con los mayores porcentajes de similaridad y cobertura pertenecían al género *Solanum* y que a su vez no presentan estructura 3D reportada en el PDB, evidenciando el poco avance en la descripción estructural de la proteína PFO en el género *Solanum* (Altschul *et al.*, 1990).

Los resultados entregados por las herramientas usadas en la identificación de regiones funcionales coinciden con la presencia de 3 dominios altamente conservados, Tirosinasa, PPO1_DWL y PPO1_KFDV; El dominio Tirosinasa es catalogado como el dominio central de las proteínas PFO (plantas, animal, bacterias y fungí) conteniendo en su estructura al sitio activo de la proteína (Mayer, 2006); su nombre se debe al hecho de usar la Tirosina como sustrato para producir melanina y otros compuestos polifenólicos (Melanogénesis) (Lerch, 1995). El dominio PPO1_DWL es catalogado como el dominio de la mitad de la proteína y contiene un motivo altamente conservado, Ácido aspártico (Asp431), Triptófano (Trp432) y Leucina (Leu433), al cual se debe su nombre; el dominio PPO1_KFDV, es el último dominio presente en la *sqPFO*, ubicado en el extremo final de la región C-terminal de la proteína. Estos dominios encontrados son característicos para las proteínas PFO (Marchler-Bauer *et al.*, 2011; Schultz, *et al.*, 1998; Bucher *et al.*, 1996).

Tabla 1: Resultados tras la predicción de algunas características fisicoquímicas para la secuencia de aminoácidos de la proteína *sqPFO*.

Característica	Resultado de la predicción
Número de aminoácidos	641
Peso molecular	71.15767 kDa
Punto isoeléctrico	8.63
Índice alifático	75.79 (Termoestable)
Promedio general de hidropatía	-0.415 (Hidrofílica)
Hélices transmembranales	No

El servidor ProtParam arrojó una serie de resultados para algunas características fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos de la *sqPFO* (Tabla 1), entre ellos el punto isoeléctrico de 8.63; este punto refleja un posible pH de la proteína, en el cual las cargas positivas y negativas presentes en la estructura se contrarrestan, anulando

el movimiento de la proteína en un campo eléctrico (Díaz *et al.*, 2012). El índice alifático tuvo un valor de 75.79 y está relacionado con el volumen que ocupan las cadenas laterales alifáticas de los aminoácidos en la proteína; para valores mayores a 70 se cataloga la proteína como termoresistente, por lo tanto la *sqPFO* sería de carácter Termoestable (Garg *et al.*, 2016). El promedio general de hidropática, indica la capacidad que posee una proteína para establecer interacciones con medios acuosos, catalogándola como hidrofóbica si posee valores positivos e hidrofílica con valores negativos; Se obtuvo un valor de -0.415 , sugiriendo un carácter hidrofílico para la *sqPFO* (Garg *et al.*, 2016). Para proteínas con posible carácter hidrofílico se espera no encontrar en su estructura hélices transmembranales; para corroborar esta hipótesis se envió la secuencia de aminoácidos al servidor TMMHMM, el cual arrojó una respuesta negativa a la presencia de hélices transmembranales en la proteína *sqPFO* (Sonnhammer *et al.*, 1998). Esta información es valiosa dado que permite mejorar el diseño de experimentos con el fin de minimizar los riesgos en futuras metodologías de aislamientos, purificación y cristalización de la proteína (Barreto *et al.*, 2012).

Los resultados para los posibles plegamientos de la estructura secundaria para la *sqPFO* (Figura 1) indican la presencia en mayor proporción de estructuras en forma de *loops*, 14 posibles hélices alfa, representando el 20% de la proteína, contenidas en su mayoría en la región N-terminal y por último en menor proporción 11 láminas beta aproximadamente 19% contenidas en su mayoría en la región C-terminal (Laskowski *et al.*, 1997).

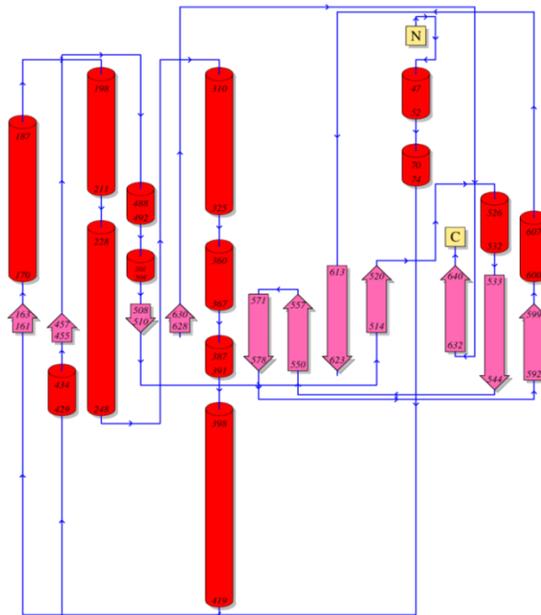


Fig. 1: Topología de la posible estructura secundaria de la proteína *sqPFO* obtenido por la herramienta PDBsum.

Construcción, descripción y evaluación del modelo 3D de la proteína *sqPFO*

La construcción del modelo (Figura 2) se realizó usando el servidor I-TASSER basándose en un modelamiento por homología (Yang & Zhang, 2015), el cual usó como plantilla la proteína cristalizada indexada en *Protein Data Bank* con código PDB: 4Z11 perteneciente a la PFO de *Coreopsis grandiflora*, presentando un porcentaje de identidad de 30% y una cobertura de 78%. El modelo presentó una puntuación C-score de -1.21 ; El C-score es una puntuación de confianza para estimar la calidad del modelo, dicha puntuación oscila entre -5 y 2 , un valor de C-score alto está relacionado con una mayor confianza de la predicción del modelo (Yang *et al.*, 2015). Dentro del sitio activo se encuentran los residuos de Histidina que coordinan los dos átomos de cobre His206, His223, His233 para el CuA y His362, His366 y His406 para el CuB, además de la presencia de un residuo

altamente conservado de Cisteína (Cys210) el cual mediante un enlace covalente tipo tioéter entre su átomo de azufre y el carbono C ϵ de la segunda Histidina del CuA (His223), estaría contribuyendo al correcto transporte de electrones entre los átomos de cobre y el sustrato, proporcionando rigidez al sitio activo. El sitio activo de la *sqPFO* está rodeado de 4 hélices alfa, α 4, α 5, α 7 y α 9 (se muestran en naranja en la Figura 2A), el cual se asemeja a una esfera hidrofóbica que protege al sitio activo (García-Borrón & Solano, 2002; Mejía-Doria *et al.*, 2012). El sitio activo de la *sqPFO* se encuentra protegido por dos residuos conservados, Phe392, el cual cumple el papel de residuo "Puerta" y el residuo Leu579 que sirve como "Tapón" del sitio activo, siendo el responsable de la latencia del zimógeno; Leu579 se encuentra por encima de Phe392 y además es estabilizado por interacciones hidrofóbicas entre los residuos Phe392, His362 y Thr363. Ambos residuos Phe392 y Leu579 se encuentran fuera del sitio activo (dichos residuos protectores se muestran en color rojo en la Figura 2A). El dominio PPO1_DWL presenta una conformación de *loops* y posiblemente cumpliría la función de enlace entre la región N-terminal y el dominio PPO1_KFDV. El dominio PPO1_KFDV está formado por 7 láminas beta antiparalelas, presentando una conformación *Beta-sándwich* o *Beta-barril*; está situado fuera del sitio activo (el dominio protector se muestra en azul en la Figura 2A), impidiendo el paso del sustrato, cumpliendo la función de dominio protector del sitio activo, estando presente sólo en el estado inactivo (zimógeno) de la *sqPFO*, planteamiento que se puede soportar en hechos experimentales en donde tras ocurrir proteólisis en la región C-terminal en PFO, se pierde un segmento peptídico que contiene al dominio PPO1_KFDV (Tran, 2010; Marusek *et al.*, 2006), dejando descubierto el sitio activo y provocando la activación de la proteína (Robinson & Dry, 1992).

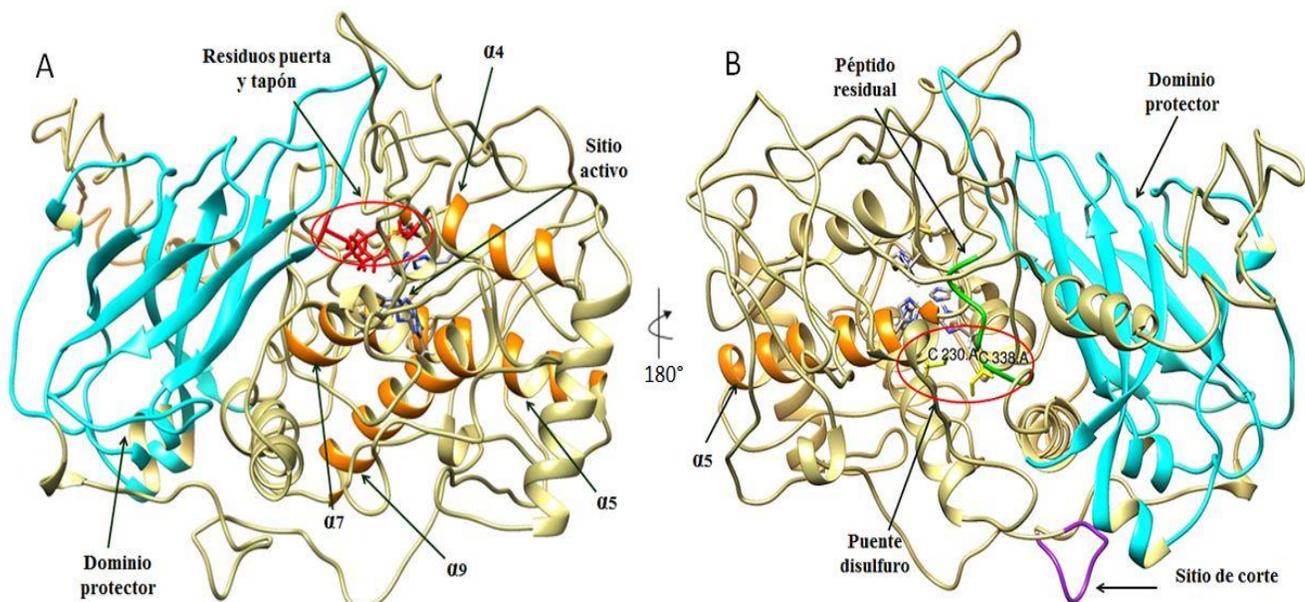


Fig. 2: A) Dominio y residuos encargados de la protección del sitio activo de la *sqPFO*; B) Características estructurales importantes para la posible formación de dímeros en *sqPFO*.

Proteínas como la PFO latente en solución se encuentran en forma monomérica y en estado activo en forma polimérica (Mauracher *et al.*, 2014); la formación de este polímero está asociado principalmente a interacciones hidrofóbicas entre los residuos de un fragmento residual del C-terminal luego de la proteólisis (Molitor *et al.*, 2016); este péptido residual se conserva en la estructura activa mediante un enlace disulfuro entre residuos cisteína (Cys230-Cys338) (dichas cisteínas se muestran en amarillo en la Figura 2B), presentes en dicho péptido residual y en una alfa hélice (α 5) que rodea al sitio activo; este péptido residual presenta la misma longitud de 10 aminoácidos al péptido presente en *AUS1*, plantilla (PDB: 4Z11). Se postulan a los residuos His334, Val335, Leu336, Gly337, Cys338, Leu338, Gln340, Val341, Ala342, Arg343 como posible péptido residual del C-terminal involucrado en la formación del dímero en la *sqPFO* (se muestra en verde en la Figura 2B); una cristalización de la proteína *sqPFO* en estado latente y en estado activo podría corroborar la presencia de éste péptido residual.

La proteína *sqPFO* latente se transforma en su forma activa mediante la eliminación del dominio C-terminal, para esto enzimas proteasas deben realizar una escisión en el sitio proteolítico de la estructura, el cual debe ser de fácil acceso para su corte; Mauracher *et al.* (2014), reportan que este sitio proteolítico se encuentra sobre un Loop con alta accesibilidad al solvente; tras el alineamiento secuencial con *abPPO4* (PDB: 4OUA) se postulan a los residuos Arg470, Gly471, Val472, Thr473, Ser474, Ser475, Gln476, Lys478 y Gln478 como el posible sitio proteolítico (se muestran en purpura en la Figura 2B) de la proteína *sqPFO*.

En la actualidad no existe una función específica de las proteínas PFO en plantas (Mayer, 2016; Mishra *et al.*, 2013), pero se le infieren funciones dentro de la planta en síntesis de melanina (melanogénesis) y otros compuestos polifenólicos (Lerch, 1995); en plantas como el Álamo se ha demostrado que la expresión de la PFO está modulada por la presencia de heridas en los tejidos de la planta, por lo tanto se podría postular un posible estado latente de la PFO en la planta en momentos de no estrés, a pesar de no conocer a ciencia cierta su mecanismo de activación (Marusek *et al.*, 2006; Mayer, 2006; Robinson & Dry, 1992), para que luego, en momentos de estrés, causado por alguna herida o daño en el tejido, la expresión de la proteína se lleve a cabo, generando la acción conocida de pardeamiento, como una respuesta de protección de la planta, provocando un tipo de sellado de la herida (Wang & Constabel, 2003). En plantas modificadas para sobre expresar la PFO se evidenció mayor resistencia a patógenos e insectos (Constabel *et al.*, 2000), lo cual se asocia a que luego de ser ingerido el material vegetal por los insectos, los pigmentos oscuros, producto de la PFO se descomponen nuevamente en el interior del insecto en forma de catecol, causando la muerte o eliminando el apetito del insecto, esto puede estar relacionado debido a que compuestos como los derivados *o*-quinonas son altamente reactivos y estos serían capaces de modificar covalentemente grupos amino y sulfhidrilo en proteínas dietéticas del insecto (Boss *et al.*, 1995; Constabel *et al.*, 2000). Según la clasificación de la Comisión Enzimática el modelo de la proteína *sqPFO* pertenece a las proteínas Oxido-Reductasa (EC. 1.10.3.1), la cual mediante reacciones de tipo redox hidroxila compuestos monofenólicos para obtener compuestos difenoles (actividad Cresolasa) y posteriormente oxida compuestos difenoles a los respectivos compuestos *o*-quinonas, culpables de los pigmentos oscuros en las plantas como el lulo (actividad catecolasa) (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015).

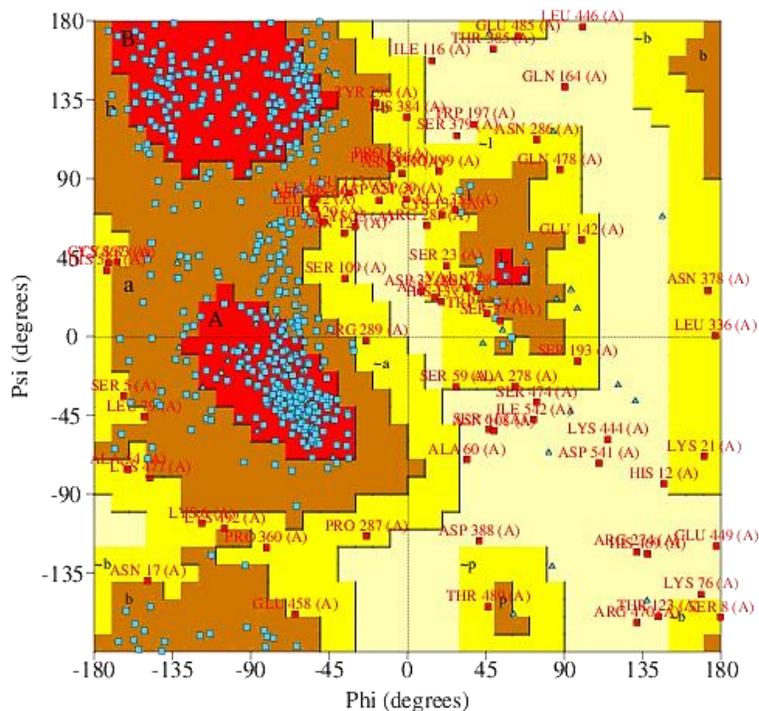


Fig. 3: Gráfico de Ramachandran para el modelo de la proteína *sqPFO*.

El alineamiento estructural con la proteína plantilla (PDB: 4Z11) arrojó un valor RMSD de 1.43 Å; el RMSD es la desviación cuadrática media de las distancia entre cada par de átomo de las dos estructuras alineadas, siendo este un indicativo de la similaridad entre las dos estructuras alineadas; el servidor indicó que tras el alineamiento, las estructuras alineadas eran *Significativamente Similares*, calificativo que es otorgado cuando las proteínas alineadas presentan plegamientos estructurales similares (Ye & Godzik, 2004). Se usó la gráfica de Ramachandran para evaluar la calidad estereoquímica del modelo predicho (Vivas-Reyes *et al.*, 2010); en la Figura 3 se evidencia que el 87.6% de los residuos están ubicados en las regiones favorables y regiones permitidas (Laskowski *et al.*, 1997).

Estudio de Acoplamiento molecular

Para simular el estado activo de la *sqPFO* se modificó la estructura obtenida inicialmente eliminado su dominio protector. A partir de éste se realizó ensayos de acoplamiento molecular con un grupo pequeño de ligandos reportados como inhibidores de PFO. Se usó el ácido kójico como control, dado que presenta un alto poder para inhibir la acción de la PFO (Cabanés *et al.*, 1994), además suele ser usado como aditivo alimenticio para prevenir el pardeamiento enzimático (Sendovski *et al.*, 2011). En la actualidad sólo existen 2 cristalizaciones en el *Protein Bank Data* en las cuales presenten al ácido kójico como inhibidor en proteínas PFO. *Deri et al.* (2016), reportan una energía de afinidad de enlace del ácido kójico de -5.5kcal/mol en la entrada del sitio activo de la proteína *bmTYR* (PDB: 5I38), presentando un mecanismo de inhibición de tipo mixto, además aclaran que inhibidores como el ácido kójico no presentan efecto de quelación sobre los átomos de cobre, sugiriendo que otros inhibidores con interacciones similares tampoco presentarían este tipo de unión.

Tabla 2: Ensayos de acoplamiento molecular y toxicidad de los ligandos evaluados como posibles inhibidores para el sitio activo de la *sqPFO*

Nombre	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Perfil de Toxicidad
Naftilchalcona hidroxilada (NCH)	-7.0	Sin toxicidad
Rutina (RUT)	-6.7	Sin toxicidad
Neorauflavane (NRF)	-6.5	Efecto reproductivo Alto
Tricin (TRI)	-6.2	Sin toxicidad
Arbutina (ARB)	-5.6	Efecto reproductivo Bajo
Ácido kójico (AK)	-4.6	Mutagénico Alta Tumorigénico Alta

Como se observa en la Tabla 2, el ligando ácido kójico presentó una energía de afinidad de enlace con residuos de la entrada del sitio activo de la *sqPFO* de -4.6kcal/mol, éste fue tomado como punto de control para los siguientes análisis de acoplamiento molecular. Por otro lado, el software DataWarrior compara las estructuras de los compuestos de consulta y compuestos presentes en la base de datos RTECS (Registro de efectos tóxicos de sustancias químicas) a los cuales se les conoce su perfil de toxicidad, y a partir de patrones estructurales similares arroja una predicción (estos perfiles de toxicidad predichos requieren de ensayos experimentales para ser corroborados) del posible perfil de toxicidad (von Korff & Sander, 2006), como se observa para los ligandos evaluados (Tabla 2) se encontró que el ligando AK presenta motivos estructurales que lo catalogan como tumorigénico y mutagénico, lo cual se pudo corroborar con lo reportado por Sánchez (2000), quien indica que

la ingesta de AK puede provocar daños como hepatotoxicidad, teratogenicidad, inmunotoxicidad e incluso la muerte, además se ha demostrado que AK provocó cambios mutagénicos, alterando las cromáticas de células de ovario en hámster chinos (Wei *et al.*, 1991), sin embargo cabe mencionar que la toxicidad de AK se manifiesta cuando se alcanza un exceso de este compuesto en el organismo y que además en los productos comerciales actuales las cantidades usadas de AK no presentan ningún riesgo contra la salud humana (Nohynek *et al.*, 2004).

Estudios previos realizados por Radhakrishnan *et al.* (2015), en los cuales usan derivados de NHC como inhibidores de PFO por su estructura homologa con L-tirosina y L-DOPA (sustratos naturales de PFO) sugieren varios parámetros a considerar para la modificación de NCH con el fin de mejorar su actividad inhibidora; sugieren que la ubicación de grupos hidroxilos en los anillos aromáticos son determinantes para regular la actividad inhibidora, siendo más favorables para derivados con radicales hidroxilos en posiciones *para* que en posiciones *orto*, además sugieren que una reducción del radical carbonilo podría aumentar su potencial como inhibidor de PFO. NCH en la proteína *sqPFO* presenta 8 interacciones de Van der Waals con los residuos Thr363, Thr367, His366, Met389, His391, Leu224, Leu351 y Ser222; 4 interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe392, Gly390, Met225 y Leu80. Como se observa en la Figura 4, NCH se ubica en la entrada del sitio activo de la *sqPFO*, ubicación similar a la obtenida por AK (Figura 5), además dichas ubicaciones concuerdan con lo reportado por Deri *et al.* (2016) y Sendovski *et al.* (2011), quienes sugieren que los inhibidores de las PFO se ubicarían en la entrada del sitio activo, interaccionando con residuos de aminoácidos que rodean dicho sitio activo. Por lo anterior, NCH presentaría una posible inhibición de tipo competitivo, dado que por su estructura voluminosa ocupa parcialmente la entrada al sitio activo, impidiendo el paso del sustrato, dando como resultado una posible inhibición de la proteína *sqPFO*. Por lo tanto el ligando NCH se convierte en una clara alternativa como posible inhibidor para la *sqPFO*, dado que no presenta perfiles tóxicos (esta predicción debe ser corroborada con prácticas experimentales) y además presenta una energía de afinidad de enlace menor (-7.0 kcal/mol) a la obtenida tras el ensayo de acoplamiento molecular con AK (Tabla 2).

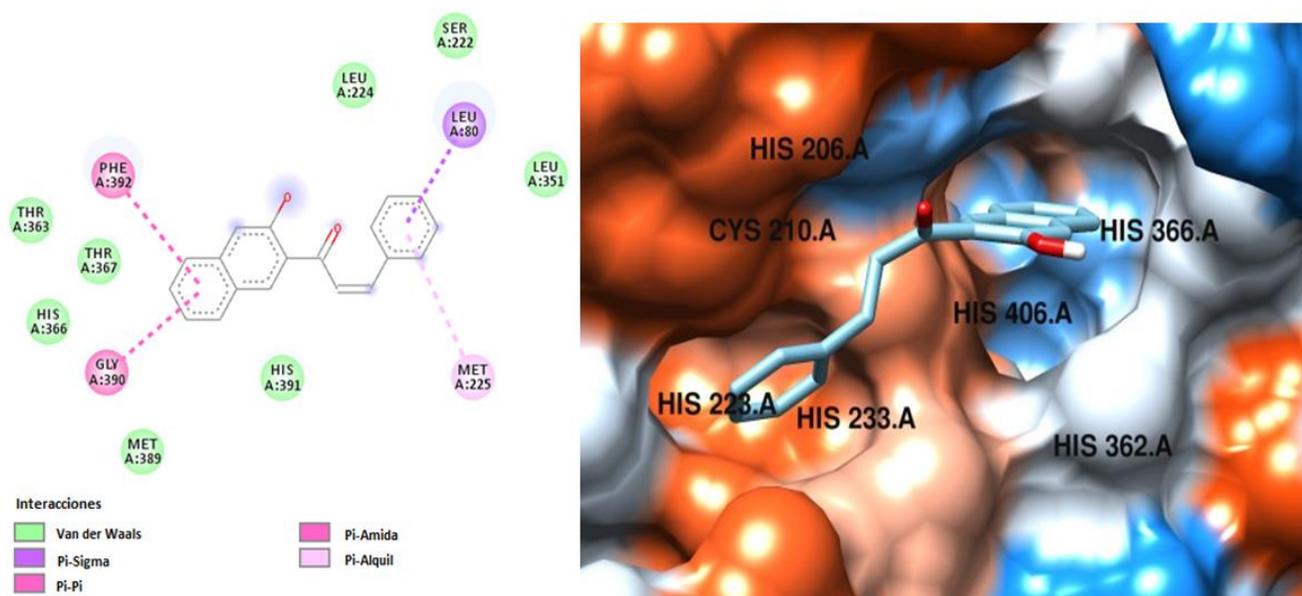


Fig. 4: Conformación e interacciones de NCH en la entrada del sitio activo de la proteína *sqPFO*. Visualizado con Discovery Studio BIOVIA y Chimera 1.11.2.

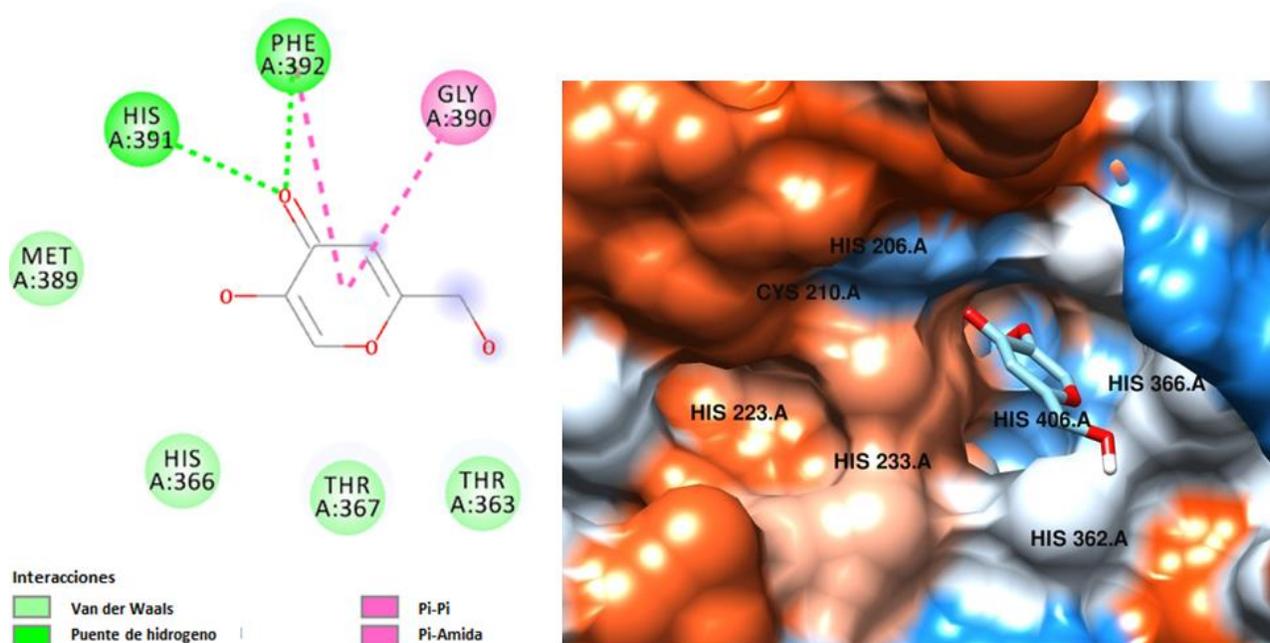


Fig. 5: Conformación e interacciones de AK en la entrada del sitio activo de la proteína *sqPFO*. Visualizado con Discovery Studio BIOVIA y Chimera 1.11.2.

CONCLUSIONES

Se obtuvo el primer modelo 3D para la proteína Polifenol oxidasa del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla, en el cual se describen características altamente conservadas del sitio activo para su actividad oxidorreductasa. Se realizó el primer estudio de acoplamiento molecular para la proteína *sqPFO* el cual reveló un posible mecanismo de inhibición competitiva por parte de los ligandos evaluados sobre el sitio activo de la *sqPFO*; dichos ligandos presentaron valores menores de energías de afinidad de enlace comparados con el valor de energía del control ácido kójico e interacciones con residuos presentes en la entrada del sitio activo de la *sqPFO*.

A pesar de la extensa lista de moléculas inhibitoras reportadas para PFOs, los objetivos de búsqueda se centra en encontrar nuevas moléculas inhibitoras de PFO que no presenten perfiles toxicológicos, es por esto que en el presente artículo se dejan planteados los parámetros para continuar con el estudio de posibles moléculas inhibitoras de la proteína *sqPFO* sin características toxicológicas como pueden ser los derivados Naftilchalconas hidroxiladas.

REFERENCIAS

1. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Bio.*, 215, 403-410.
2. Asanuma, M., Miyazaki, I. & Ogawa, N. (2003). Dopamine- or L-DOPA-Induced Neurotoxicity: The Role of Dopamine Quinone Formation and Tyrosinase in a Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity Research*, 5 (3), 165-176.

3. Barreto, L., Barreto, G., Morales, L., Acevedo, O. & Santos, J. (2012). Proteína LIC10494 de *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*: modelo estructural y regiones funcionales asociadas. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 16-27.
4. BIOVIA (2017). Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, Dassault Systèmes, San Diego, California, USA.
5. Boss, P., Gardner, R., Janssen, B. & Ross, G. (1995). An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Molecular Biology*, 27(2), 429-433.
6. Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N. & Hofmann, K. (1996). A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.*, 20(1), 3-23.
7. Cabanes, J., Chazarra, S. & García-Carmona, F. (1994). Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol*, 46(12), 982-985.
8. Constabel, C., Yip, L., Patton, J. & Christopher, M. (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiology*, 124(1), 285-295.
9. Deri, B., Kanteev, M., Goldfeder, M., Lecina, D., Guallar, V., Adir, N. *et al.* (2016). The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. *Scientific reports*, 6, 34993.
10. Díaz, A., Martínez, E., Vivas, R., Puerta, L., Méndez, D., Cabrales, R. *et al.* (2012). Modelación por homología de la proteína Lux *Porphyromonas gingivalis* cepa W83. *Rev. Clin. Periodoncia implantol. Rehabil. Oral Vol.*, 5(3), 105-113.
11. Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792-7.
12. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R. *et al.* (2007). Gaussian DV, *Revision F.02 ed.*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
13. García-Borrón, J. & Solano, F. (2002). Molecular anatomy of Tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment cell Res.* 15(3), 162-173.
14. Garg, V., Avashthi, H., Tiwari, A., Jain, P., Ramkete, P., Kayastha, A. *et al.* (2016). MPPI – Multi FASTA ProtParam Interface. *Bioinformation*, 12(2), 74-77.
15. Gil, M., Rojano, B. & Guerrero, C. (2012). *Inhibición de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavendish) por medio de algunos derivados del isoespintanol*. Editorial Corporación universitaria Lasallista, sede Medellín. 193-248. Colombia. ISBN: 978-958-8406-14-5. <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/148/1/11.%20193-248.pdf>
16. Ioannou, I. & Ghoul, M. (2013). Prevention of enzymatic browning in fruit and vegetables. *European Scientific Journal*, 30(9), 310-341.
17. Kang, S., Heo, S., Kim, K., Lee, S., Yang, H., Kim, A. *et al.* (2012). Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Ecklonia cava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(1), 311-316.

18. Laskowski, R., Hutchinson, E., Michie, A., Wallace, A., Jones, M. & Thornton, J. (1997). PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends Biochem. Sci.*, 22 (12), 488-490.
19. Lerch, K. (1995). Tyrosinase: Molecular and active-site structure. *Enzymatic Browning and its prevention, Chapter 5*, 64-80. Switzerland.
20. Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M., DeWeese-Scott, C. *et al.* (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res. D225-9. Epub 2010 Nov 24.*
21. Marusek, C., Trobaugh, N., Flurkey, W. & Inlow, J. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (1), 108-123.
22. Mauracher, S., Molitor, C., Al-Oweini, R., Kortz, U. & Rompel, A. (2014). Latent and active *abPPO4* mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate (VI) in a single crystal. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 1 (70), 2301-2315.
23. Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places?, A review. *Phytochemistry* 67, 2318-2331.
24. Mejía-Doria, C., Gaviria-Arias, D., Ramos-Rengifo, L. & Morocho, H.C. (2012). Molecular characterization of the polyphenol oxidase gene in lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla. *Brazilian J. Plant Physiol.* 24 (4), 261-272.
25. Mejía-Doria, C., Gaviria-Arias, D., Bru-Martínez, B., Rengifo-Ramos, L., Alegría-Soto, A. & Aguilar-Fernández, E. (2014). Caracterización cinética de la enzima polifenol oxidasa en seis estadios de maduración en lulo (*Solanum quitoense* Lam.) var. Castilla. *Actualidades Biológicas*, 36 (101), 107-117
26. Mishra, B., Gautam, S. & Sharma, A. (2013). Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chemistry*, 15 (139), 105-114.
27. Molitor, C., Mauracher, S. & Rompel, A. (2016). *Aurone synthase* is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113 (13), 1806-1815.
28. Mu, Y., Li, L. & Hu, S. (2013). Molecular inhibitory mechanism of triclin on tyrosinase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107, 235-240.
29. Nohynek, G., Kirkland, D., Marzin, D., Toutain, H., Leclerc-Ribaud, C. & Jinnai, H. (2004). An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4Hpyran-4-one]. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 93-105
30. O'Boyle, N., Banck, M., James, C., Morley, C., Vandermeersch, T. & Hutchison, G. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 33 (3), 1-14.
31. Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch G., Greenblatt, D., Meng, E. *et al.* (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25 (13), 1605-1612.
32. Radhakrishnan, S., Shimmon, R., Conn, C. & Baker, A. (2015). Development of hydroxylated naphthylchalcones as polyphenol oxidase inhibitors: Synthesis, biochemistry and molecular docking studies. *Bioorganic chemistry*, 63, 116-122.

33. Robinson, S. & Dry, I. (1992). Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiology*, 99 (1), 317-323.
34. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5 (4), 725-738.
35. Sánchez, A. (2000). *Alteración del crecimiento, la esporulación y la producción de toxinas de Aspergillus flavus Link ex Fries y Aspergillus parasiticus Speare por extractos de plantas del genero Yucca y Larrea tridentata DC Cov.* Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México. <http://eprints.uanl.mx/830/1/1020145323.PDF>
36. Sander, T., Freyss, J., Korff, M. & Rufener, C. (2015). DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model.*, 55 (2), 460-473.
37. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95 (11), 5857-5864.
38. Sendovski, M., Kanteev, M., Shuster, V., Adir, N. & Fishman, A. (2011). First Structure of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. *J. of Molecular Biology*, 405 (1), 227-237.
39. Si, Y., Yin, S., Oh, S., Wang, Z., Ye, S., Yan, S. *et al.* (2012). An Integrated Study of Tyrosinase Inhibition By Rutin: Progress using a Computational Simulation. *Journal of Biomolecular structure & Dynamics*, 29 (5), 999-1012.
40. Sonnhammer, E., Von Heijne, G. & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, 6, 175-182.
41. Suárez, P., Andreu, A., Colman, S., Clausen, A. & Feingold, S. (2009). Enzymatic browning: phenotypic, biochemical and molecular characterization of native potatoes from Argentina. *Rev. Latinoam. la Papa* 15, 66-71.
42. Tan, X., Song, Y., Park, C., Lee, K., Kim, J., Kim, D. *et al.* (2016). Highly potent tyrosinase inhibitor, Neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24 (2), 153-159.
43. Tran, L. (2010). *Molecular and Comparative Phylogenetic Analysis of the Polyphenol Oxidase Gene Family in Poplar (Populus spp.)*. M.Sc. Thesis, Department of Biology. University of Victoria. United States.
44. Trott, O. & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31 (2), 455-461.
45. Vela, J.C. (2014). Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Implicación de polifenol oxidasa (PFO) y enzimas antioxidantes. Universidad de Alicante. *Rev. Tesis doctorales de la Universidad de Alicante*, 1-9. España.
46. Vivas-Reyes, R., Ahumado, M. & Cabezas, J. (2010). Homology modelling by three-dimensional structure of phospholipase A₂ cytosol-dependent pancreatic calcium in *Rattus norvegicus*. *Rev. Colomb. Quim.*, 39 (2), 181-197.

47. Von Korff, M & Sander, T. (2006). Toxicity-Indicating Structural Patterns. *Journal of chemical information and modeling*, 46 (2), 536-544.
48. Wang, J. & Constabel, C. (2003). Biochemical characterization of differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry*, 64 (1), 115-121.
49. Wei, A., Huang, T., Fernando, S. & Chung, K. (1991). Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicology Letters*, 59, 213-220.
50. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12 (1), 7-8.
51. Yang, J. & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43, 174-181.
52. Ye, Y. & Godzik, A. (2004). FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. *Nucleic Acids Res.* 32, 582–585.
53. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9 (40), 1-8.

