

Temática : Modelación molecular y simulación

## **Modelación del sitio activo de enzimas convertidoras de angiotensina de diferentes especies usando descriptores híbridos**

### ***Modeling the active site of angiotensin converting enzymes from different species using hybrid descriptors***

**Eldis Javier Cortés Rodríguez <sup>1\*</sup>, Ramón Carrasco Velar <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Afiliación institucional completa. Dirección postal. Correo electrónico

<sup>2</sup> Centro de Entornos Interactivos 3D, VERTEX. Dirección postal. [rcarrasco@uci.cu](mailto:rcarrasco@uci.cu)

\* Autor para correspondencia: [carrascovelarr@gmail.com](mailto:carrascovelarr@gmail.com); [rcarrasco@uci.cu](mailto:rcarrasco@uci.cu)

---

#### **Resumen**

En este trabajo se muestra un nuevo método de caracterización del sitio activo de las enzimas convertidoras de angiotensina en diferentes especies con el uso de los descriptores híbridos de aminoácidos (Eaa3D, Raa3D y Laa3D), para la detección de diferencias estructurales y de propiedad del sitio activo de la enzima convertidora de angiotensina en diferentes especies, que tienen en cuenta determinadas propiedades químico físicas de cada aminoácido y el efecto de los restantes del entorno sobre él. Para la modelación realizada a los sitios activos se calcularon los valores de los descriptores para aminoácidos utilizando la plataforma GraMin. Se identificaron los aminoácidos cercanos al sitio activo de las proteínas del estudio, en esferas con radio desde 5Å hasta 12Å. Se detectaron diferencias en el comportamiento de las propiedades químico-físicas de los aminoácidos de los diferentes sitios activos de las diferentes especies, evidenciadas por los valores de los descriptores híbridos mencionados, lo cual establece una nueva forma de caracterizar estas proteasas. Con el método planteado se definieron 3 nuevos valores que se denominaron *presión electrostática*, *presión estérica* y *presión lipofílica* sobre el sitio activo.

**Palabras clave:** Enzima convertidora de angiotensina, descriptores híbridos para aminoácidos, similitud entre sitios activos, ECA de diferentes especies

### **Abstract**

*This work shows a new method for the characterization of the active site of angiotensin-converting enzymes in different species with the use of hybrid amino acid descriptors (Eaa3D, Raa3D and Laa3D), for the detection of structural and property differences of the site. activity of the angiotensin-converting enzyme in different species, which take into account certain chemical-physical properties of each amino acid and the effect of the rest of the environment on it. For the modeling carried out on the active sites, the values of the descriptors for amino acids were calculated using the GraMin platform. Amino acids close to the active site of the study proteins were identified, in spheres with a radius from 5Å to 12Å. Differences in the behavior of the chemical-physical properties of the amino acids of the different active sites of the different species were detected, evidenced by the values of the mentioned hybrid descriptors, which establishes a new way of characterizing these proteases. With the proposed method, 3 new values were defined, which were called electrostatic pressure, steric pressure and lipophilic pressure on the active site.*

**Keywords:** *Angiotensin-converting enzyme, hybrid descriptors for amino acids, similarity between active sites, RCTs from different species*

---

## **Introducción**

Descubierta a mediados de 1950, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una enzima cuya función consiste en la conversión del decapeptido angiotensina I en el octapeptido angiotensina II por eliminación de dos aminoácidos (AA) y la degradación de la bradikinina. La angiotensina I, que se origina en los riñones, carece de actividad biológica, pero la angiotensina II, es su forma activa. Esto lleva a que la función de esta enzima conlleve a la vasoconstricción o estrechamiento de los vasos sanguíneos afectados. Como resultado de este proceso de transformaciones surgen una serie de afecciones médicas, para las cuales se ha creado una determinada categoría de medicamentos. La ECA es una exo-peptidasa, que cataliza los extremos de los enlaces peptídicos o proteicos para liberar aminoácidos únicos, y se libera de las células que comprenden los pulmones y los riñones.

Además de la hipertensión, las acciones de la ECA contribuyen a otras patologías como la insuficiencia cardíaca y la diabetes. Existen medicamentos especializados llamados inhibidores de la ECA para inhibir la enzima al disminuir la formación de angiotensina II. Particular interés surgió hacia esta enzima al relacionársele con la acción del virus SARS COV-2, causante de la Covid-19 (Verma, 2020). La ECA se encuentra en diferentes especies de animales, no solo vertebrados y las semejanzas o diferencias entre ellas puede facilitar la búsqueda de nuevas fuentes de la proteasa con el interés de emplearla como diana en la búsqueda de nuevos inhibidores. Sin embargo, la mayor utilidad puede verse en la identificación y caracterización del sitio activo de la enzima.

Se conoce que la presencia de determinados aminoácidos en el sitio activo de una enzima son los responsables de las actividades específicas, pero, ¿qué hace que por lo general existan diferencias (a veces leves) en los comportamientos de dichos sitios activos? Se acepta generalmente que esos cambios ocurren por razones estructurales. Sin embargo, ¿se puede afirmar categóricamente lo mismo si la composición aminoacídica del sitio muestra diferencias? En ese caso cabe suponer que el diferente comportamiento se debe a las propiedades químico-físicas resultado de la estructura de los AA del sitio activo, en conjunción con el resto de los AA que integran el sitio. En este caso, y empleando los descriptores híbridos para aminoácidos definidos recientemente por uno de los autores (Verma, 2020), se acometió el estudio de un pequeño grupo de ECA que se encuentran en diferentes especies animales.

## Metodología computacional

### Enzimas seleccionadas

Se seleccionaron cinco enzimas convertidoras de angiotensina desde la base de datos UniProt (UniProt, 2022) la cual contiene estructuras en tercera dimensión de proteínas, obtenidas por cristalografía de rayos X, disponibles para dominio público, con los códigos siguientes: 1uze-*Homo sapiens*, 7wsk-*Paguma larvata* (civeta de las palmeras enmascarada), 4ca7-*Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), 7c8d-*Felis silvestris catus* (gato), 7fdk-*Mus musculus* (Ratón).

Los descriptores híbridos que se utilizaron para la representación molecular fueron los índices de estado Electrotopográfico (*Eaa3D*), Refractotopográfico (*Raa3D*) y Lipotopográfico (*Laa3D*) para aminoácidos desarrollados por Carrasco y cols, implementados en el software GraMin (Ramon Carrasco Velar, 2020). Se emplea para esto la ec. 1.

$$AA_{i3D} = AAP_{i3D} + AAP_{i,j3D} \quad \text{Ecuación 1}$$

en donde el valor de  $AA_{i3D}$  es el valor calculado del índice correspondiente para el aminoácido  $i$ ,  $AAP_{i3D}$  es el valor intrínseco del aminoácido calculado según los puntos 1, 2 y 3; mientras que el término  $AAP_{i,j3D}$  es la perturbación que ejercen los aminoácidos de la proteína sobre el  $i$ ésimo aminoácido. Este término se calcula como se muestra en la ecuación 2:

$$\Delta AAP_{i,j3D} = \sum (AAP_{i3D} - AAP_{j3D}) / (r_{ij})^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

en la que  $\Delta AAP_{i,j,3D}$  es el valor total de la perturbación;  $AAP_{i,3D}$  y  $AAP_{j,3D}$  son los valores intrínsecos del par de aminoácidos (i, j) y  $(r_{i,j})^2$  es la distancia euclidiana entre ese par.

### **La plataforma Graph Mining (GraMin)**

Es una herramienta versión portable para el uso en diseño de fármacos, basada en la descripción grafo-teórica de la estructura química que se desarrolla en la Universidad de Ciencias Informáticas. Esta herramienta permite realizar cálculo de descriptores de moléculas pequeñas y proteínas. También se puede emplear para estudios de similitud molecular entre las estructuras de moléculas orgánicas pequeñas, y entre pares de proteínas para encontrar el grado en la que se parecen entre sí o referente a una proteína. Permite saber además, en qué región de la secuencia se encuentra el mayor parecido en el par.

### **Cálculo de los descriptores híbridos con la plataforma GraMin**

Una vez cargada en el software la proteína de interés, se abre la pestaña *Calculation*, se presiona el botón *Topographical*, se copian los valores que aparecen en la ventana de resultados *Topographic descriptors*, se salva en fichero texto y se reserva para su posterior macheo con el fichero de los resultados de la selección de los AA de cada sitio activo a diferentes radios con el *PyMol*.

### **RMSE como método para estimar similitud entre proteínas**

Para estimar la similitud entre proteínas existen una gran variedad de métodos. Estos pueden basarse, tanto en el análisis de la topología de los grafos de las proteínas como en su estructura 3D.

Sobre cada aminoácido en una proteína existe el efecto de los restantes de su entorno geométrico. Esto provoca que, en dependencia de su ubicación pueden sufrir la modificación de determinadas propiedades. Los descriptores híbridos de aminoácidos poseen la cualidad de evidenciar el efecto de las interacciones en las propiedades que ellos describen. Esto está dado por el efecto de la distancia entre vértices del grafo de la proteína y la posición relativa de cada aminoácido en la misma, según se desprende de las ecuaciones 1 y 2. (Help Center, 2023)

### **PyMOL para el mapeo del sitio activo**

PyMOL<sup>1</sup> es un visor molecular de código abierto auspiciado por usuarios, creado por Warren Lyford Delano y comercializado por Delano Scientific LLC, una compañía dedicada a la creación de herramientas accesibles universalmente para las comunidades científicas y educacionales. PyMOL es apropiado para producir imágenes 3D de

alta calidad de moléculas pequeñas y de macromoléculas biológicas, como las proteínas. Se emplearon los ficheros de proteínas que incluían el inhibidor. (Schrödinger, 2023)

El procedimiento que se sigue para el mapeo del sitio activo consiste en la eliminación de las moléculas de agua y posterior detección del inhibidor con el módulo *Display*. Con el comando *show sticks, byres all within 5* se muestran los aminoácidos que interactúan a esa distancia y con el comando *select byres all within 5* se seleccionan todos los aminoácidos del entorno del inhibidor y se salva el resultado del hallazgo. Esta selección de descriptores no posee aún la colección de valores de los descriptores. Se utilizó un script llamado *i3erZerK* para *machear* el fichero con los aminoácidos seleccionados y el resultado de los cálculos del paso anterior.

## Resultados y discusión

### Caracterización de los descriptores híbridos de aminoácidos de la muestra.

Los resultados de los cálculos de los descriptores híbridos para aminoácidos realizados y su posterior caracterización se muestran en la tabla 1:

<i>Homo sapiens</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Prom</i>	<i>Desviación</i>
Eaa3D	52,63	-4,95	24,77	11,63
Raa3D	98,07	-12,47	31,35	20,96
Laa3D	3,78	-4,38	-1,15	1,65
<i>Felis silvestris catus</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Prom.</i>	<i>Desviación</i>
Eaa3D	52,69	-6,13	24,06	12,01
Raa3D	98,11	-13,8	31,19	21,55
Laa3D	3,76	-4,44	-1,14	1,7
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Prom</i>	<i>Desviación</i>
Eaa3D	52,43	-5,07	24,78	11,36
Raa3D	97,62	-12,43	31,36	20,74
Laa3D	3,78	-4,41	-1,14	1,63
<i>Paguma larvata</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Prom</i>	<i>Desviación</i>
Eaa3D	53,04	-6,52	24,65	12,26
Raa3D	99,11	-14,23	31,2	21,94
Laa3D	3,91	-4,5	-1,14	1,74
<i>Mus musculus</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>Prom</i>	<i>Desviación</i>
Eaa3D	52,45	-5,44	24,55	11,92

Raa3D	97,28	-12,91	31,08	21,36
Laa3D	3,75	-4,41	-1,14	1,68

Tabla 1. Caracterización de las proteasas de la muestra de ECA's utilizadas

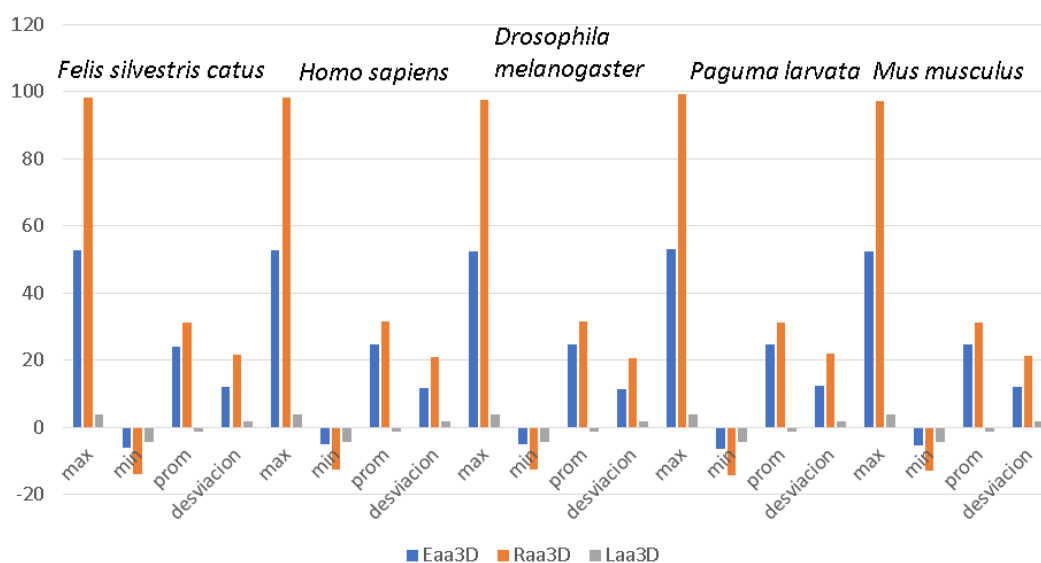


Figura 1. Representación gráfica del comportamiento de los diferentes estadígrafos.

Se observa que hay una cierta semejanza entre los valores de los descriptores. Esto se debe en parte a la naturaleza de su origen, pues todos se derivan de la matriz de conectividad del grafo químico y al hecho de ser las proteasas pertenecientes a la misma familia, aunque de diferentes especies.

Con relación a los descriptores estos, no obstante, evidencian diferentes características o propiedades en dependencia de la ponderación realizada a dicha matriz. El *Eaa3D* se encuentra estrechamente relacionado con la polaridad y el *Raa3D* con la polarizabilidad y el volumen de las proteínas, mientras que el *Laa3D* está estrechamente relacionado con la lipofilia y es el que muestra generalmente los valores más pequeños y en la mayoría de los casos tienen valores negativos para los que poseen mayor carácter hidrofílico.

Un resultado esperado fue que los valores máximos de los índices al aminoácido triptófano dado su elevado peso molecular. Pero en los valores mínimos, el comportamiento varía entre los aminoácidos glicina y arginina. Normalmente, los valores mínimos corresponden a los aminoácidos de menor tamaño y lo opuesto para los valores máximos.

## Análisis de los valores de los descriptores en el entorno del sitio activo

Los sitios activos de las ECA's de las diferentes especies estudiadas muestran diferentes valores de los descriptores empleados, pese a la similitud entre los sitios. Aunque se espera que esto sea así, nuestro objetivo es poder evidenciar esas diferencias, en términos de las propiedades químico-físicas que están contenidas en los descriptores híbridos de aminoácidos. En la Tabla 2 se muestra, a modo de ejemplo, el comportamiento del índice *Raa3D* en las ECA's de *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*. Para una mejor visualización en la gráfica del comportamiento de los índices, los valores del promedio y del máximo se multiplicaron por 10 y el del mínimo por 100 (Fig. 2).

De dicha tabla puede apreciarse que el valor de la Suma tiene un proceso incremental lógico en la medida en que aumenta el radio del arco de la esfera de interacción. El valor promedio se ve afectado por la naturaleza del entorno, no así el valor máximo que se asocia a los aminoácidos de mayor tamaño que muestran baja sensibilidad al efecto de los alrededores.

<b>Índice del Estado <i>Raa3D</i> de Aminoácidos en el sitio activo de la ECA de <i>Homo sapiens</i></b>				
<i>Distancia</i>	<i>Suma Raa3D</i>	<i>Promedio Raa3D</i>	<i>Máximo Raa3D</i>	<i>Mínimo Raa3D</i>
5Å	718.81	39.93	72.20	1.32
6Å	950.27	41.32	94.00	1.32
7Å	1226.26	38.32	97.03	1.32
8Å	1608.59	34.23	97.03	1.32
9Å	1949.30	34.81	97.03	-12.11
10Å	2491.20	33.66	97.03	-12.47
11Å	3194.20	34.35	97.03	-12.47
12Å	4321.24	35.71	98.08	-12.47
<b>Índice del Estado <i>Raa3D</i> de Aminoácidos en el sitio activo de la ECA de <i>Drosophila melanogaster</i></b>				
<i>Distancia</i>	<i>Suma Raa3D</i>	<i>Promedio Raa3D</i>	<i>Máximo Raa3D</i>	<i>Mínimo Raa3D</i>
5Å	1154.89	39.82	72.60	1.76
6Å	1465.66	37.58	94.61	-9.13
7Å	1917.81	36.88	97.03	-12.03
8Å	2509.20	34.37	97.03	-12.44
9Å	2853.43	34.38	97.03	-12.44
10Å	3541.79	33.41	97.62	-12.44
11Å	4315.34	34.25	97.62	-12.44
12Å	5215.90	34.54	97.62	-12.44

Tabla 2. Comparación del índice *Raa3D* entre *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster*

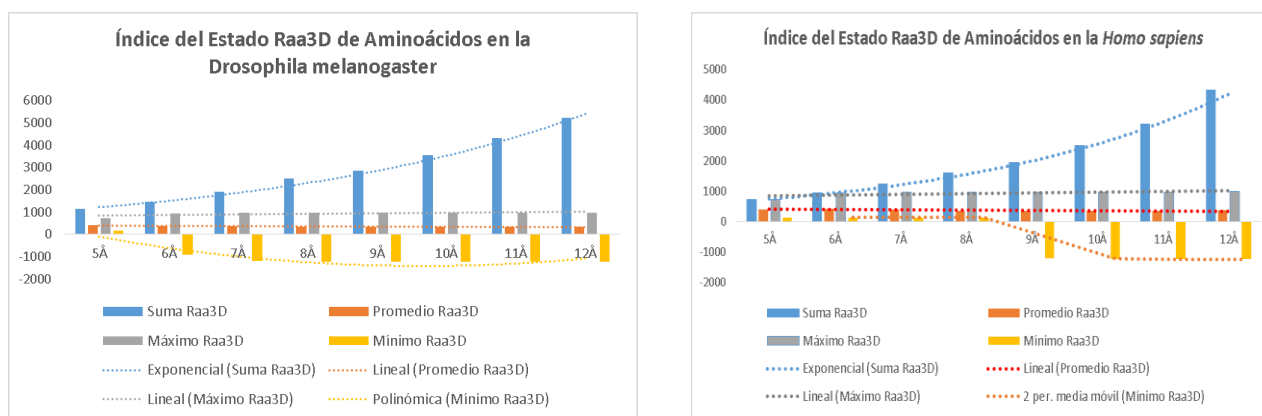


Figura 2. Ejemplo del comportamiento del índice Raa3D en la *Drosophila melanogaster* y en *Homo sapiens*.

En la representación gráfica de los datos mostrados en la Tabla 2, es posible distinguir que la línea de tendencia de comportamiento de la suma del valor del índice, en este caso *Raa3D*, es en forma de una exponencial, aunque los rangos de valores que alcanzan son claramente diferentes a medida que el radio de medición crece. Con respecto al mínimo, el factor de 100 revela comportamiento distinto en ambas especies, debido principalmente a la composición aminoacídica del sitio activo, característica esta que es única en la ECA del *Homo sapiens*.

Este resultado condujo a seleccionar, para el análisis del comportamiento de los índices híbridos en el sitio activo, al término *Suma*. En la Fig. 3 se muestra en gráficos de barras, el comportamiento de los índices en la zona analizada del sitio activo. En todos los casos se observa un comportamiento exponencial similar en las ECA's de las cuatro especies.

Sin embargo, aunque el comportamiento en general es el mismo, es fácilmente distinguible la diferencia básica entre las ECA's de la *Drosophila melanogaster* y la de *Homo sapiens* con respecto a *Felis silvestris catus* y *Paguma larvata*. Este resultado sugiere que el empleo de estos descriptores puede resultar de utilidad a los efectos de una caracterización adicional de los sitios activos de las proteínas. También con ellos pudiera adelantarse una explicación estructural y fenomenológica de las causas de dichas similitudes y diferencias.

La identificación de los aminoácidos del sitio activo se hizo eliminando el inhibidor del correspondiente fichero *pdb* de la enzima. Con esto se asegura la ubicación de los aminoácidos que interactúan con el receptor con un criterio de cercanía, y se realizó la localización de los que se hallaban a las distancias prefijadas de los primeros. Eso, pese a no partir del mismo número de aminoácidos interactuantes con el inhibidor si facilita la creación del conjunto de AA que



presentan mayor proximidad con el mismo, entonces, surge la interrogante acerca de cómo denominar este fenómeno que se ha identificado con tres descriptores topográficos híbridos definidos específicamente para aminoácidos.

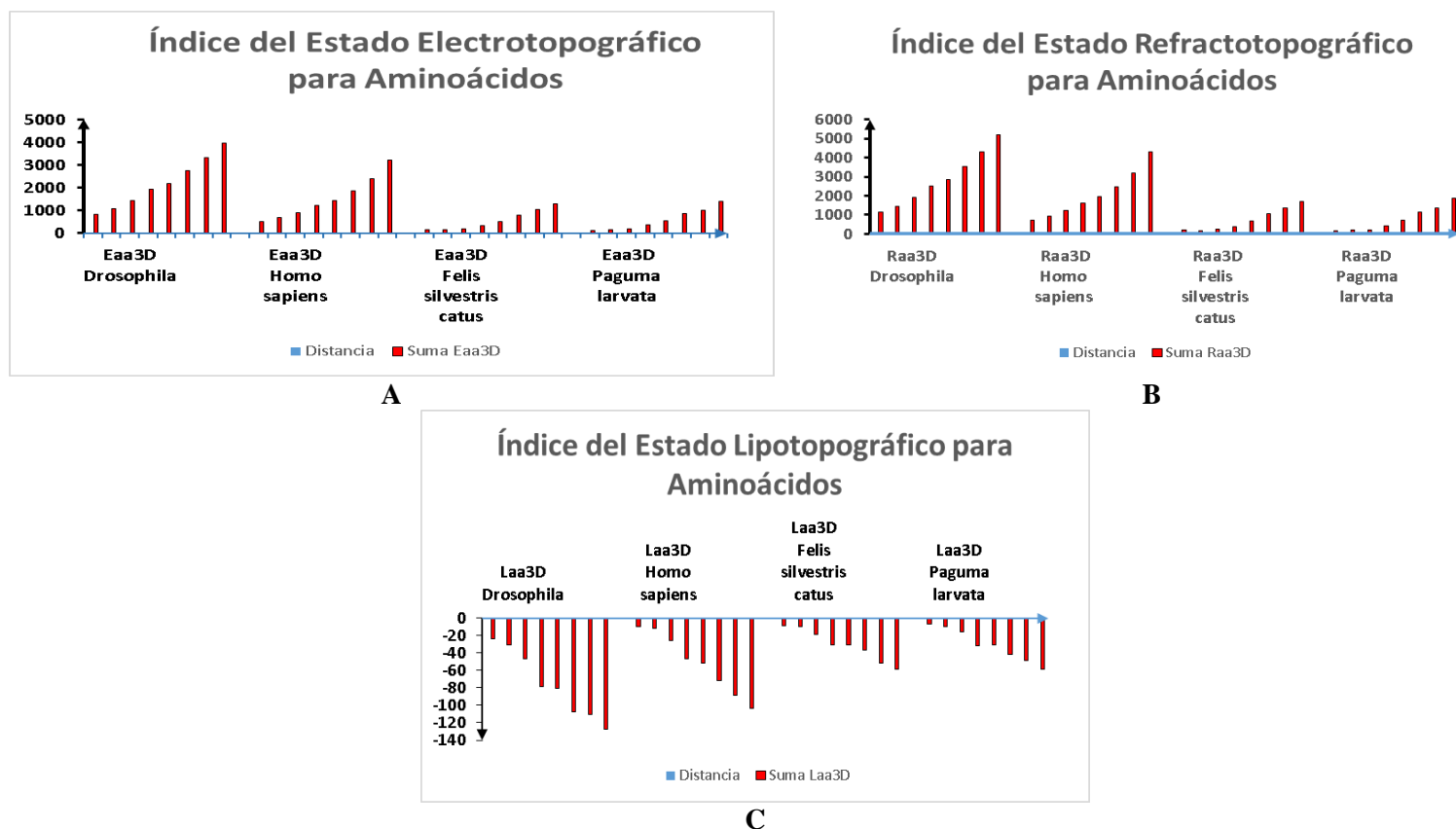


Figura 3. Comportamiento de los descriptores híbridos en el sitio activo de las cuatro ECA's estudiadas

Según Randić, los descriptores moleculares nuevos necesitaban ser más simples, dar luz sobre un problema, o resolver alguno que no haya sido resuelto anteriormente por esquemas alternativos (Randic, 1988). También planteó, por otra parte, que hay propiedades deseables para los índices *topológicos* (Randic, 1996) entre las cuales se encuentra que no deben incluir propiedades químico-físicas en su definición por un problema de redundancia de información, sin embargo, los descriptores híbridos han demostrado su utilidad en estudios de relación estructura actividad (Ramon Carrasco Velar J. P., 2013) y similitud molecular (Aurelio Antelo Collado, 2016) (Aurelio Antelo Collado R. C., 2020). Por lo tanto, podemos afirmar que, *con estos descriptores*, esa condición no se cumple.

El efecto que ejerce cada aminoácido sobre los restantes de la región del sitio activo es en todas las direcciones, pero, al centrarnos en este trabajo en el efecto que ejercen sobre el área de contacto directo del inhibidor con la enzima, lo

definimos como una cierta *presión* que ejerce cada aminoácido con la propiedad que evidencian los descriptores híbridos para aminoácidos. En correspondencia, cada aminoácido ejercerá sobre el área de contacto del receptor con el inhibidor *presión electrostática*, *presión estérica* y *presión lipofílica*, dependiendo si representan al respectivo índice.

## **Conclusiones**

Se propone un nuevo enfoque teórico para la caracterización del sitio activo de enzimas convertidoras de angiotensina pertenecientes a diferentes especies. Se encontraron diferencias importantes entre los sitios activos de las enzimas, evidenciadas por cada descriptor. Se seleccionó como criterio diferenciante a la suma de los valores de cada índice híbrido para aminoácidos presentes a distancias de 5Å hasta 12Å del sitio de inhibición, y se definieron los términos *presión electrostática*, *presión estérica* y *presión lipofílica* al efecto que ejercen dichos aminoácidos, evidenciados por los valores que adquieren los correspondientes Índices del Estado Electro topográfico, Refracto topográfico y Lipotopográfico para Aminoácidos. La mayor semejanza en el comportamiento se detectó entre los pares *Homo sapiens/Drosophila melanogaster* y *Felis silvestris catus/Paguma larvata* respectivamente.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen a la Universidad de Ciencias Informáticas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

## Referencias

---

Marty K.S. Wong, Angiotensin Converting Enzymes, Subchapter 29D, Y. Takei, H. Ando, & K. Tsutsui (2016). Handbook of Hormones. Elsevier Inc. All rights reserved. 263-265 Supplemental Information. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00254-3>

Verma, A. B. (28 de 03 de 2020). *COVID-19 and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers What Is The Evidence*. Obtenido de <https://jamanetwork.com>

Ramon Carrasco Velar, E. H. (2020). *Definición y Caracterización de Descriptores Híbridos para Aminoácidos*. Univesidad de las Ciencias Informaticas, La Habana.

UniProt. (3 de 12 de 2022). Obtenido de <https://www.uniprot.org/>

R. Carrasco-Velar, A. Antelo-Collado, R. Ross-Aguirre y E. Hernández Anzardo (2018). *GraphMining*. Software para el cálculo de descriptores híbridos. Universidad de las Ciencias Informáticas, La Habana.

Help Center. (15 de 05 de 2023). *Oracle Fusion Cloud EPM Trabajo con Planning*. Obtenido de [https://docs.oracle.com/cloud/help/es/pbcs\\_common/PFUSU/insights\\_metrics\\_RMSE.htm#PFUSU-GUID-FD9381A1-81E1-4F6D-8EC4-82A6CE2A6E74](https://docs.oracle.com/cloud/help/es/pbcs_common/PFUSU/insights_metrics_RMSE.htm#PFUSU-GUID-FD9381A1-81E1-4F6D-8EC4-82A6CE2A6E74)

Schrödinger. (15 de 05 de 2023). *PyMOL by Schrödinger*. Obtenido de <https://pymol.org/2/>

Randic, M. H. (1988). Journal Chemistry Informatic Computational Sci.

Randic. (1996). Journal Chemistry Informatic Computational Sci. 209-214.

Ramon Carrasco Velar, J. P. (2013). Hybrid reduces graph for SAR studies SAR and QSAR in Enviromental Research. DOI:10.1080/1062936X.2013.764926

Aurelio Antelo Collado, J. L. (2016). Similitud molecular empleando Indices Híbridos. *Revista Cubana de Informática Médica*, 487-498.

Aurelio Antelo Collado, R. C. (2020). Maximum common property: a new approach for molecular similarity. *J. Cheminformatic*. DOI:10.1186/s13321-020-00462-3

