



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: FOSFATO DE PIRIDOXAL,  
REACCIONES DE TRANSAMINACIÓN,  
DESCARBOXILACIÓN Y RACEMIZACIÓN.  
RELACIÓN CON LOS INHIBIDORES Y  
ENZIMAS.**

Autor: Simon Miranda, Daniel

Fecha: Septiembre 2020

Tutor: Fernández Fernández, María

**RESUMEN:**

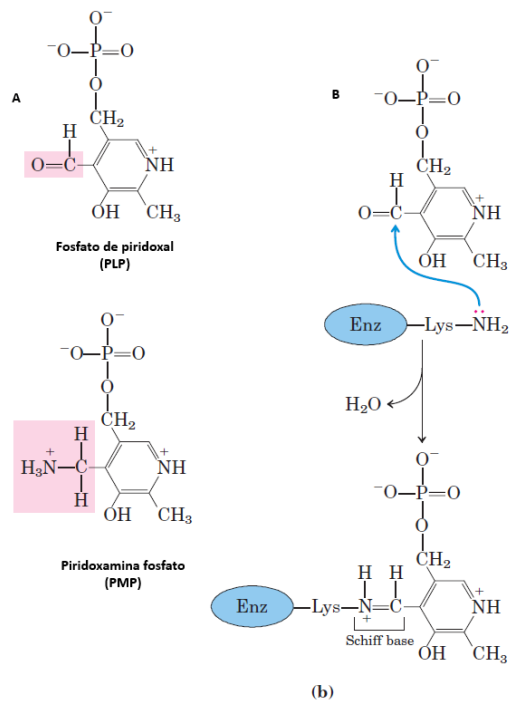
El piridoxal-5'-fosfato, más conocido como vitamina B6 o PLP, forma parte fundamental del funcionamiento de numerosas enzimas en el organismo actuando como cofactor. Son muchos los tipos de mecanismos en los que participa, pero encontramos en las reacciones de transaminación, racemización y descarboxilación un amplio número de estudios. Las enzimas encargadas de llevar a cabo estos procesos son, en algunos casos, responsables de producir ciertas enfermedades y el PLP se postula como diana terapéutica en el tratamiento de estas. Conocer los mecanismos endógenos, las estructuras enzimáticas y la relación del cofactor e inhibidores con ellas resulta de especial interés a la hora de desarrollar análogos y nuevos inhibidores de esta molécula que nos permitan tratar dichas patologías.

**INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES:**

El piridoxal-5'-fosfato o PLP participa como cofactor en un gran número de enzimas. Se trata de una molécula ubicua que cataliza reacciones como la α-eliminación y α-sustitución en serina y glicina, participa en la fosforólisis del glucógeno, pasa por la γ-eliminación y γ-sustitución en la cistationasa y permite la reactividad en el carbono α de aminoácidos.<sup>1</sup> Precisamente es en este último tipo de reacciones donde vamos a profundizar. Exponiendo la naturaleza y mecanismos de las reacciones de transaminación, racemización y descarboxilación.

**1. Punto común:**

Este conjunto de reacciones, las cuales comprenden un amplio grupo de enzimas, participan en múltiples rutas y procesos biológicos. Pero pese a la amplitud y variedad de estas, puede encontrarse una serie de intermediarios y mecanismos de reacción común. Dicha reactividad común se desarrolla en base a la formación de una imina o base de Schiff conocida como aldimina interna. Este compuesto se forma a partir de la unión del grupo aldehído del PLP con el grupo ε-amino de un residuo de Lys de la enzima correspondiente. Dicha unión es de carácter covalente y forma el complejo Enzima-Cofactor.

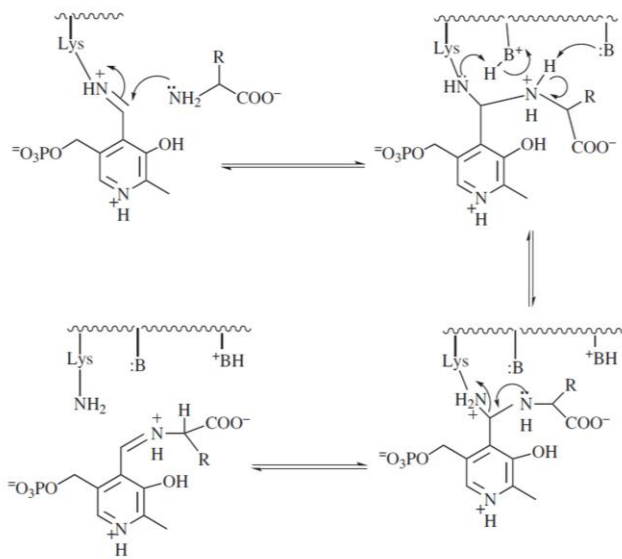


**Esquema 1:** Fosfato de piridoxal, el grupo protético de las aminotransferasas.<sup>1</sup>

- A. Fosfato de piridoxal (PLP) y su forma aminada, piridoxamina Fosfato (PMP).
- B. Formación de la aldimina interna mediante ataque nucleófilo del grupo amino del residuo de Lys al grupo aldehído del cofactor.

Posteriormente, esta forma activada del PLP, sufre una reacción de transaminación (transaldiminación<sup>2</sup>) con el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido sustrato. Reacción que es común para todas las transaminasas, racemasas y descarboxilasas PLP-dependientes. Durante este proceso se libera el residuo de Lys de la enzima, la cual es desplazada por el grupo amino del aminoácido entrante, y el cofactor queda unido al aminoácido sustrato. Formando así una segunda base de Schiff, conocida como aldimina externa.

La aldimida externa sirve como intermediario central común a todas las reacciones. Y es a partir de este punto donde inician las diferentes rutas metabólicas. Formándose diferentes intermedios quinonoides en función de la enzima.<sup>1,3,4</sup>



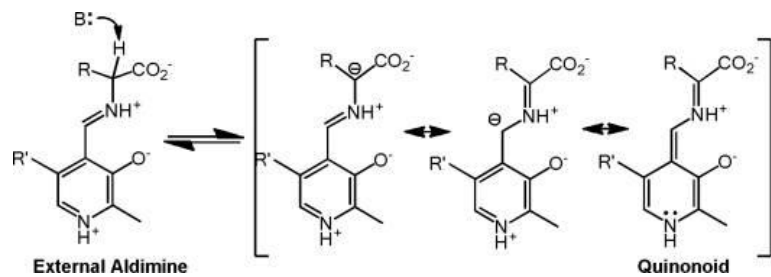
**Esquema 2: Primer paso en todas las reacciones enzimáticas dependientes de PLP.<sup>3</sup>**

- 1º. El grupo amino no protonado del sustrato ataca a la aldimina interna protonada.
  - 2º. Transferencia de protones entre grupos básicos de la enzima y el residuo PLP-Sustrato.
  - 3º. Colapso entre la base de Schiff y el sustrato. Formación de la Aldimida externa, mediante un proceso ácido base, con un intermediario diamina germinal.
- En el esquema 4 (racemización) se muestra el proceso contrario.

**2. Quinonoide:**

Este intermediario, recibe su nombre debido a que su estructura es muy similar a la de una quinona. Esta molécula se encuentra estabilizada por la resonancia establecida entre la base de Schiff y el anillo de piridina. Una de las formas resonantes se trata de un carbanión el cual puede protonarse dependiendo del medio.

En función de la enzima, el quinonoide, se forma bien por la abstracción de un protón del carbono unido al nitrógeno de la base de Schiff (En transaminasas y racemasas) o bien por la descarboxilación del mismo carbono (En descarboxilasas). En cualquiera de las dos situaciones se parte de la aldimina externa y se forma el quinonoide.<sup>1,4,5</sup>



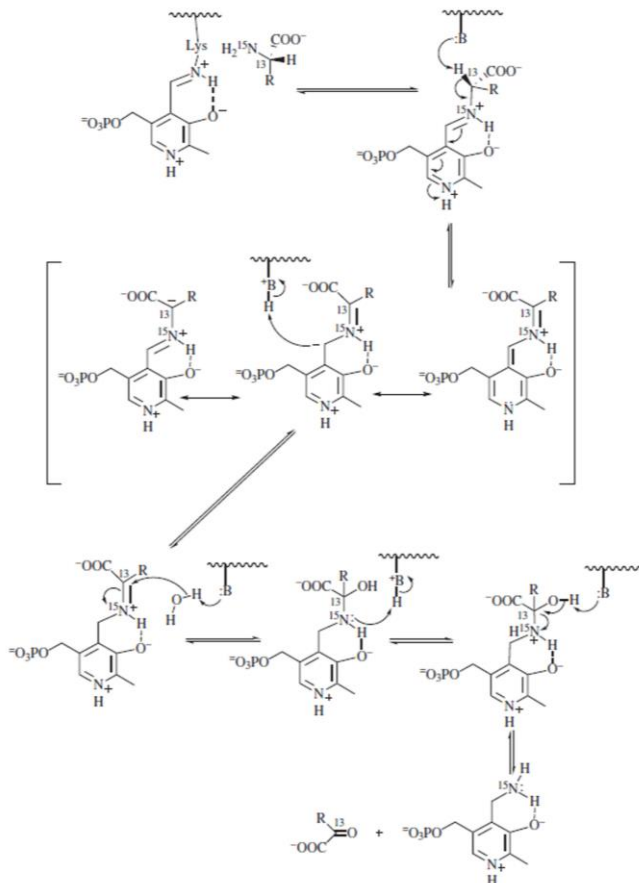
**Esquema 3: Estructuras de resonancia de intermedios carbaniónicos.<sup>5</sup>** La estructura quinonoide se muestra a la derecha y la aldimina externa a la izquierda.

### 3. Reacciones:

#### Transaminación:

Este tipo de reacciones son llevadas a cabo por las aminotransferasas o transaminasas y son posiblemente de las enzimas PLP dependientes más complejas. En esta secuencia de reacciones se parte desde la aldimina interna y un aminoácido sustrato, y termina en un  $\alpha$ -cetoácido junto con la piridoxamina fosfato (PMP). Las aminotransferasas catalizan reacciones biomoleculares de tipo Ping-Pong, por tanto, el sustrato debe abandonar el centro catalítico para permitir la unión de un segundo sustrato. Este segundo sustrato se trata de otro  $\alpha$ -cetoácido (diferente al obtenido en la fase anterior) el cual permite regenerar el PMP a PLP, invirtiendo el sentido de todas las reacciones que han llevado a la formación de la piridoxamina fosfato. Por tanto, la transaminación, puede dividirse en dos fases sucesivas: la formación del PMP con desaminación del aminoácido, y la regeneración del enzima. Durante todo este proceso cabe destacar que no se produce una desaminación neta. En ningún momento se pierden los grupos amino debido a que el  $\alpha$ -cetoácido lo recibe, a la vez que el  $\alpha$ -aminoácido se desamina.

Esta ruta puede tener dos objetivos. El primero consiste en recoger los grupos amino de los diferentes aminoácidos en forma de moléculas dadoras de grupos amino, las cuales entren en las rutas biosintéticas de eliminación de productos nitrogenados de desecho. En cuanto al segundo, se trata de la conversión de un aminoácido sustrato, en un aminoácido producto diferente y necesario para el organismo.<sup>1,3</sup>



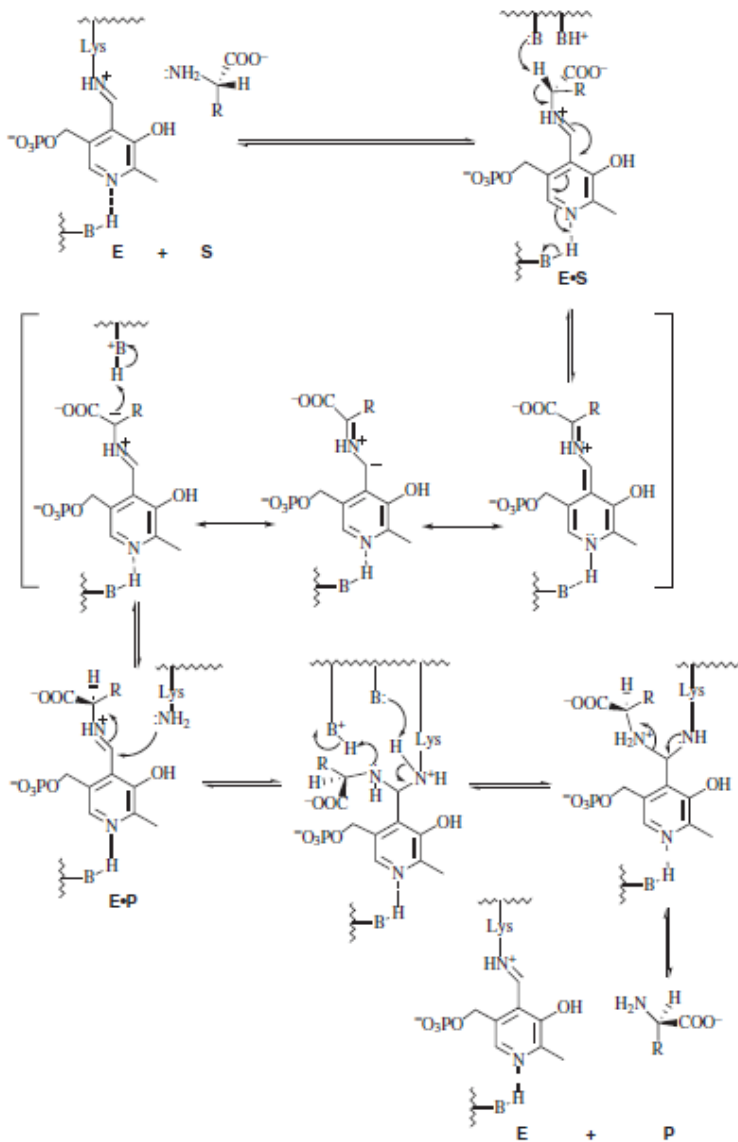
#### **Esquema 4: Primera semirreacción para el mecanismo de transaminación dependiente de PLP<sup>3</sup>**

- 1º. Formación del intermedio Quinonoide mediante la abstracción de un protón y formación de la Base de Schiff PMP-imina.
- 2º. Hidrolisis del PMP. Esta reacción es catalizada por un residuo básico de la enzima, el cual ataca a una molécula de agua en el centro activo. Activando la molécula y permitiendo la cascada de reacciones que finalizan en la escisión del  $\alpha$ -cetoácido y del PMP.
- 3º. El PMP debe regenerarse a PLP siguiendo la misma ruta, pero en sentido contrario (No mostrado en el esquema).

## Racemización:

Al contrario que la transaminación, se trata de una de las reacciones productivas más sencillas. Este tipo de reacción es llevada a cabo por los racemasas, enzimas altamente específicas, que permiten la conversión entre los enantiómeros de un aminoácido. El punto clave de la racemización se encuentra en la reprotonación en el carbono  $\alpha$  del quinonoide. Esto se lleva a cabo por la cara opuesta de la molécula, lo que permite el cambio del L-aminoácido a un D-aminoácido y viceversa. Esto ocurre gracias a que las racemasas tienen un equilibrio constante e igual a 1, por lo que, independientemente del enantiómero, la reacción se produce.

Cabe destacar que una de las racemasas más relevantes en el ámbito médico es la alanina racemasa, enzima implicada en la formación de la pared bacteriana y una de las dianas terapéuticas usada a la hora de tratar ciertas infecciones. Las racemasas también están implicadas en procesos como la obtención de D-serina, la cual participa en la activación de los receptores NMDA entre otros.<sup>1,3</sup>



### Esquema 5: Mecanismo para los racemasas dependientes de PLP<sup>3</sup>

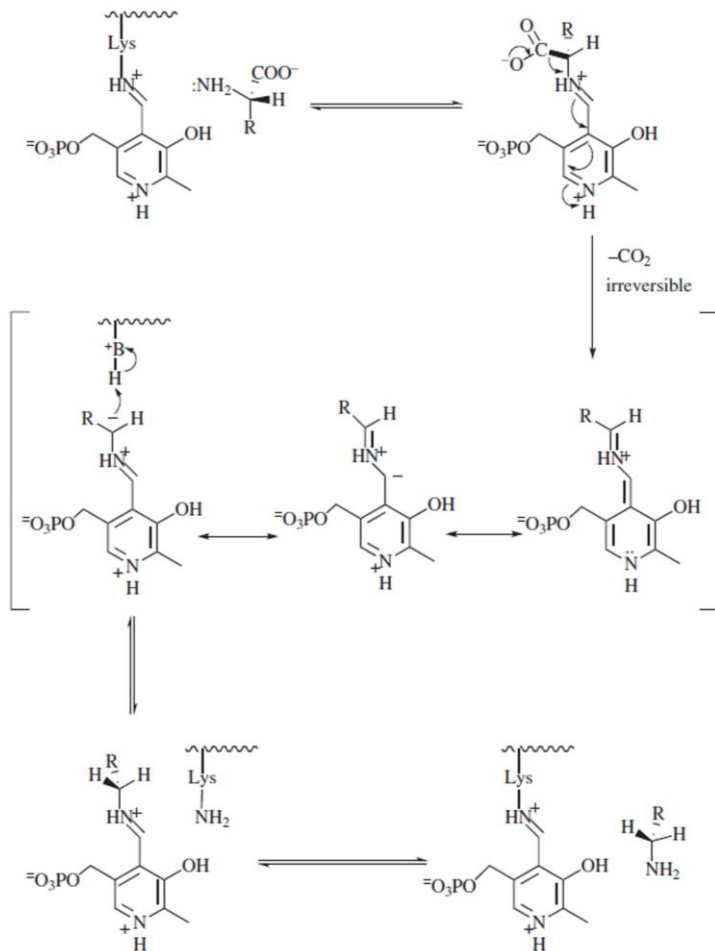
- 1º. Formación del intermedio Quinonoide mediante la abstracción de un protón de un residuo aminoacídico.
- 2º. Reprotonación de residuo aminoacídico por la cara opuesta a la sustracción original.
- 3º. Reversión de la aldimida externa a la aldimida interna y al aminoácido sustrato.

En este esquema se representa el proceso inverso al mostrado en el esquema 1.

**Descarboxilación:**

Este proceso es llevado a cabo por las descarboxilasas. Enzimas que catalizan la conversión de aminoácidos en aminas, con la pérdida de una molécula de CO<sub>2</sub>. Esta reacción tiene carácter irreversible y resulta un paso clave en la obtención de moléculas endógenas como la dopamina, GABA, histamina o serotonina.

Al igual que en los mecanismos anteriores, la secuencia de reacción comienza con la formación de la aldimina interna, y seguidamente con la formación de la aldimina externa. Pero al contrario que en las transaminasas y racemasas, la formación del intermedio quinonoide se lleva a cabo a través de la eliminación de una molécula de CO<sub>2</sub>. Dicha molécula proviene del carbono-α del residuo aminoácido que conforma parte de la estructura de la aldimina interna. Por tanto, se trata de una α-descarboxilación. A partir de este punto se forma el intermedio quinonoide y continua la reacción con un mecanismo idéntico al de las racemasas que, como única diferencia, dan lugar a una amina en lugar de a un D o L-aminoácido.<sup>1,3</sup>



**Esquema 6: Mecanismo para las descarboxilasas dependientes de PLP<sup>3</sup>**

- 1º. Formación de la aldimina externa
- 2º. α-descarboxilación.
- 3º. Término de la reacción de forma análoga al esquema 4.

**OBJETIVOS:**

El objetivo de la presente revisión bibliográfica es conocer un poco más en profundidad las reacciones de racemización, transaminación y descarboxilación en las que se ve implicado el PLP. Así como de los mecanismos existentes de inhibición de este cofactor, fármacos y enzimas sobre los que esos mecanismos se aplican, explorando brevemente la estructura de estas enzimas y su relación con el PLP y los inhibidores.

## **METODOLOGÍA:**

Se realizó una revisión bibliográfica utilizando un total de 4 libros, obtenidos de la biblioteca general de la UCM y de la facultad de farmacia perteneciente a la misma universidad, y 20 artículos publicados en las revistas *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *Biochimica et Biophysica Acta*, *Journal of Biological Chemistry*, *FEBS Press*, *Plos One*, *Future Medicine*, *Federation of American Societies for Experimental Biology* y *BioMed Research International*, obtenidos mediante los buscadores de las webs *National Center for Biotechnology Information*, *PubMed Central* y *PubChem*. Las palabras clave utilizadas para esta búsqueda fueron: Piridoxal fosfato, PLP, vitamina B6, transaminación, racemización, descarboxilación, quinonoide, GABA-T, D-Alanina Racemasa, Ornitina descarboxilasa, DOPA descarboxilasa, Vigabatrina, D-cicloserina, eflornitina,  $\alpha$ -difluorometilputrescina, carbidopa y benserazida.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **1. Transaminasas: GABA-aminotransferasa (GABA-T)**

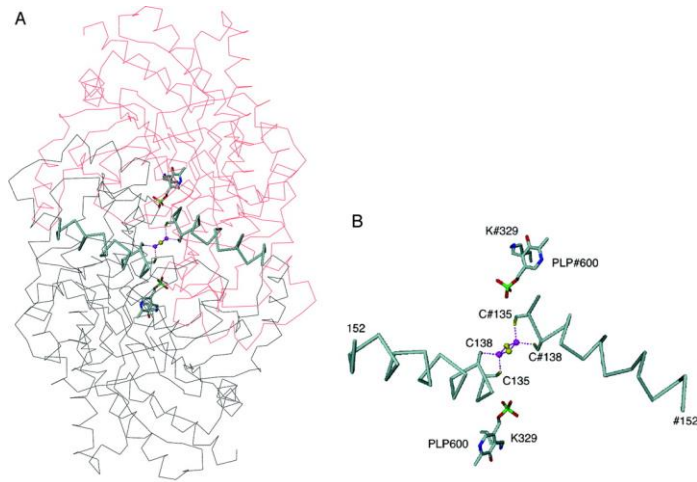
El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central. Su déficit puede conducir a patologías tales como epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y discinesia tardía. Siendo la responsable de la degradación de este neurotransmisor la GABA-T.

La GABA-T es una enzima, PLP dependiente, encargada de llevar a cabo la transaminación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico al semialdehído succínico. Regenerándose luego a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato. Se trata de una diana terapéutica para el tratamiento de la epilepsia.<sup>3</sup>

#### Estructura de la enzima:

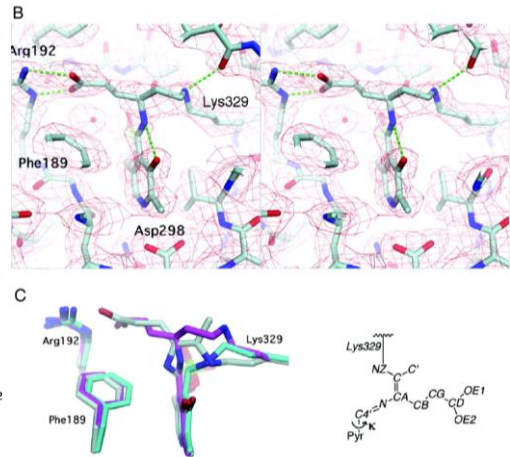
La Gaba-T pertenece a la subfamilia II de las  $\alpha$ -enzimas dependientes de PLP, siendo esta un homodímero, el cual utilizado dos moléculas de PLP como cofactores.

Se ha observado la formación de la aldimina interna a partir de los residuos de Lys329 y los cofactores. Esto ha sido estudiado en formas cristalizadas de la GABA-T, tanto en forma nativa, como en complejos con análogos (vigabatrina y GEG).<sup>3,6</sup> Estas estructuras, también sirvieron para definir otros detalles estructurales de la enzima como la Arg192, residuo posiblemente implicado en la unión del grupo carboxilo del GABA, y el complejo [2Fe-2S] en el centro activo de la GABA-T, el cual forma enlaces cruzados entra las dos subunidades del dímero. La enzima utiliza los átomos de azufre de los residuos de Cys135 y Cys138 (conservados en organismos superiores) para formar el complejo. Su función no está definida más allá de participar en la unión de los dímeros, y pese a situarse en la vecindad de los cofactores, el complejo, no participa en la catálisis.<sup>6</sup>



**Figura 1:** grupo [2Fe-2S] en el centro del dímero GABA-T<sup>6</sup>

- A.** Estructura del dímero GABA-T.  
**B.** Vista en primer plano del Complejo [2Fe-2S] y los cofactores.



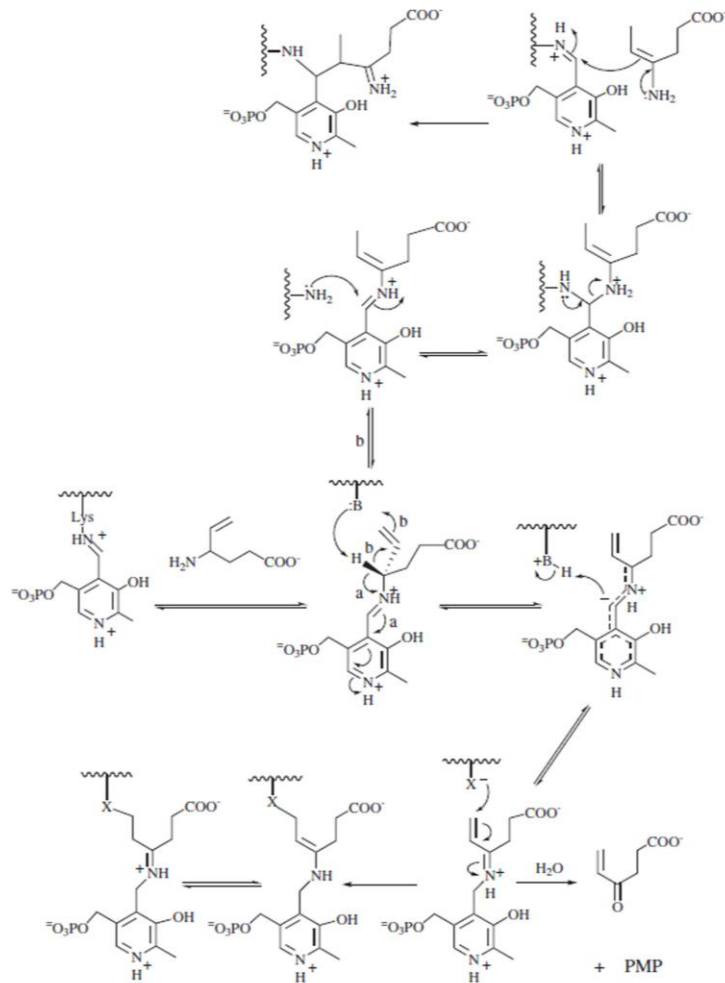
**Figura 2:** <sup>6</sup> **A.** Proyección estereográfica del sitio activo de GABA-AT después de modificación química con vigabatrina. **C.** Comparación de estructuras aductoras PLP (cian), GEG (gris) vigabatrina (magenta) con Lys329.

### Inhibidores que actúan sobre la PLP: Vigabatrina

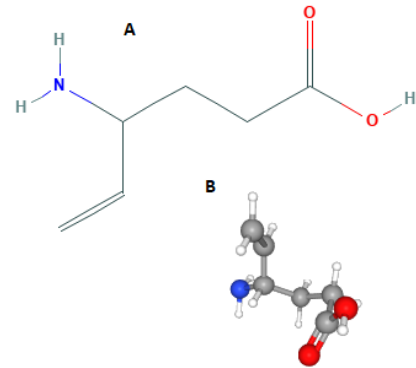
La vigabatrina (ácido 4-aminohex-5-enoico) se trata de un  $\gamma$ -aminoácido que tiene una estructura de gamma-vinil GABA,<sup>7</sup> es por tanto un análogo estructural del GABA. Es utilizado en el tratamiento de la epilepsia y los espasmos infantiles, ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica, gracias al mencionado sustituyente vinilo que le dota de una mayor lipófila.

El mecanismo de inhibición comienza una vez está formada la aldimida interna y la vigabatrina se sitúa en el centro catalítico. En ese momento, la vigabatrina puede formar dos complejos diferentes con la enzima. El primero de ellos se produce debido a una isomerización alílica y posterior ataque del grupo alilo a la aldimina interna, quedando unida de forma irreversible al aducto Enzima-Inhibidor. Representa un 30% de la inactivación. El segundo compuesto da lugar a la ruta de transaminación, la cual representa el otro 70% de la inactivación, la cual sigue el mismo esquema desarrollado en la introducción. Con la salvedad de que en lugar de utilizar un  $\alpha$ -aminoácido, para formar la aldimina externa, desarrolla la ruta con la vigabatrina, la cual es un  $\gamma$ -aminoácido. Esta ruta puede ramificarse en la molécula previa a la hidrólisis que forma el PMP y el  $\alpha$ -cetoácido. Pudiendo dar lugar a estos dos compuestos o, debido a su carácter electrófilo (aceptor de Michael), puede someterse a la adición conjugada por un grupo nucleófilo de sitio activo dando lugar a un aducto, con la consecuente inactivación de la enzima irreversiblemente.<sup>3</sup>





**Esquema 7:** Mecanismo hipotético para la inactivación de GABA aminotransferasa por vigabatrina.<sup>3</sup>



**Figura 3:** Representación de la estructura química de la Vigabatrina<sup>7</sup>

A. Estructura 2D.

B. Estructura 3D

## 2. Racemasas: D-Alanina Racemasa (Alr)

La Alr es una enzima PLP dependiente con plegamiento de tipo III<sup>2,8</sup>. Esta racemasa se encarga de catalizar la conversión del aminoácido L-Alanina en D-Alanina (precursor del peptidoglucano) reacción que se da en el citosol procarionta y resulta vital para la formación de la pared bacteriana. Esta enzima es de carácter ubicuo en bacterias, pero en el hombre no se encuentran enzimas análogas, de tal forma que resulta una buena diana en el tratamiento antibiótico.<sup>2,9</sup>

### Estructura de la enzima:

Esta enzima es homodimérica y al igual que la GABA-T utiliza dos moléculas de PLP como cofactores. Cuenta con dos dominios plegados, el C-terminal (formado por cadenas  $\beta$ ) y el N-terminal (el cual consiste en un conjunto de ocho cadenas  $\alpha/\beta$  que forman un barril).

En esta enzima, el PLP, está unido de forma covalente al residuo de Lys39 (formando la aldimina interna) ubicada en el extremo C terminal, en la primera cadena  $\beta$  del barril  $\alpha/\beta$ , encontrándose la cadena lateral apuntando hacia el centro del barril (el mecanismo que produce esta unión se encuentra previamente descrito en la introducción). El centro catalítico es compacto y solo permite acomodar una molécula pequeña, el aminoácido sustrato, y una molécula de agua en el entorno inmediato al PLP. En cuanto al grupo fosfato del cofactor, se

encuentra formando puentes de hidrogeno, que inmovilizan la estructura. Otros residuos importantes en la catálisis enzimática son la Arg219, Tyr265 ' y el Asp313. Una vez dispuestos todos los elementos, el mecanismo de reacción sigue los procesos explicados en la introducción. La enzima cuenta con un único canal de acceso al sitio activo.<sup>2,9</sup>

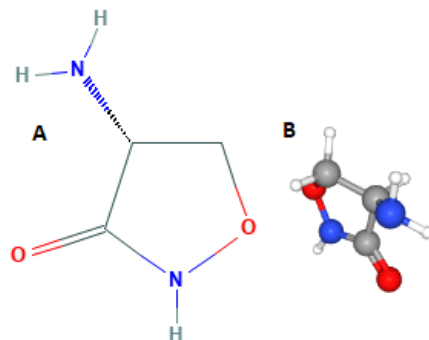


**Figura 4:** Vista pictórica del homodímero Alr en *Bacillus stearothermophilus*<sup>2</sup>

#### Inhibidores que actúan sobre la PLP: D-Cicloserina (DCS)

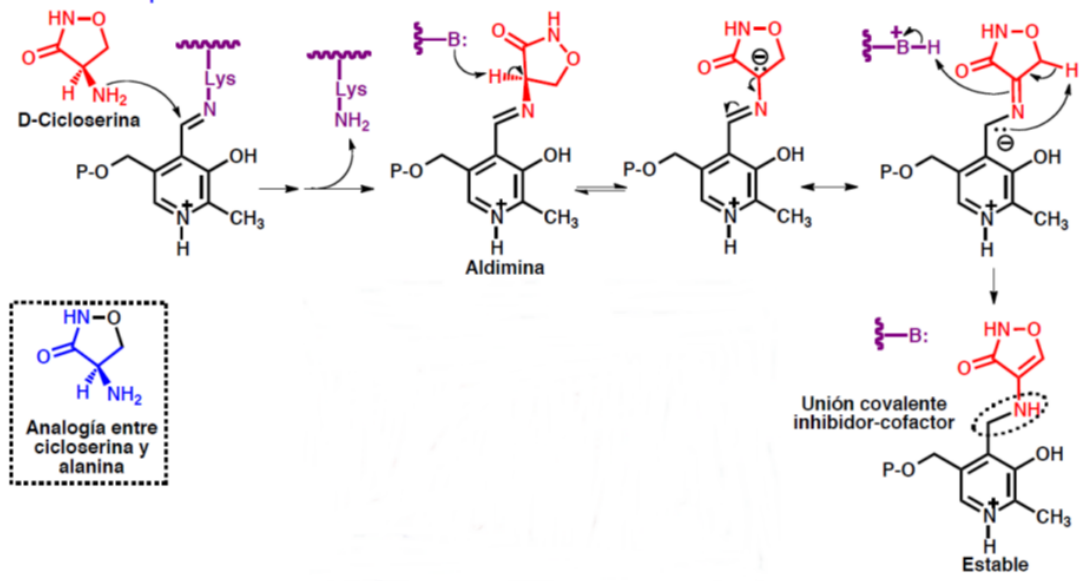
La D-Cicloserina [(4R)-4-amino-1,2-oxazolidin-3-ona] es un análogo del aminoácido D-alanina con actividades antibióticas y glicinérgicas de amplio espectro. La D-cicloserina interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana inhibiendo competitivamente dos enzimas, DCS y D-alanina:D-alanina ligasa, lo que altera la formación del peptidoglicano necesaria para la síntesis de la pared celular bacteriana.<sup>10</sup>

El mecanismo comienza con el ataque del grupo amino no protonado de la DCS a la aldimina interna protonada. En este primer paso ya se encuentra sustituido el sustrato endógeno por el inhibidor. La reacción termina con la formación de la aldimina externa en un mecanismo análogo al explicado en la introducción. A continuación, se produce la abstracción de un protón del carbono unido al nitrógeno de la base de Schiff, en lugar de formar el quinonoide con el sustrato endógeno. Por último, la reprotonación da lugar al aducto estable Inhibidor-cofactor. En este último paso es donde encontramos la mayor diferencia con el mecanismo endógeno, formándose el aducto en lugar de liberar la D-alanina y regenerar la aldimina.



**Figura 5:** Representación de la estructura química de la D-Cicloserina<sup>10</sup>

- A. Estructura 2D.
- B. Estructura 3D



**Esquema 8: Inhibición de Ala-racemasa por D-cicloserina<sup>4</sup>**

- 1º. Ataque del grupo amino no protonado de la DCS a la aldimina interna protonada.
- 2º. Abstracción de un protón del carbono unido al nitrógeno de la base de Schiff.
3. Reprotonación y formación del aducto Inhibidor-cofactor.

**3. Descarboxilasas: Ornitina descarboxilasa (ODC) y DOPA descarboxilasa (DDC)**

**Ornitina descarboxilasa (ODC):**

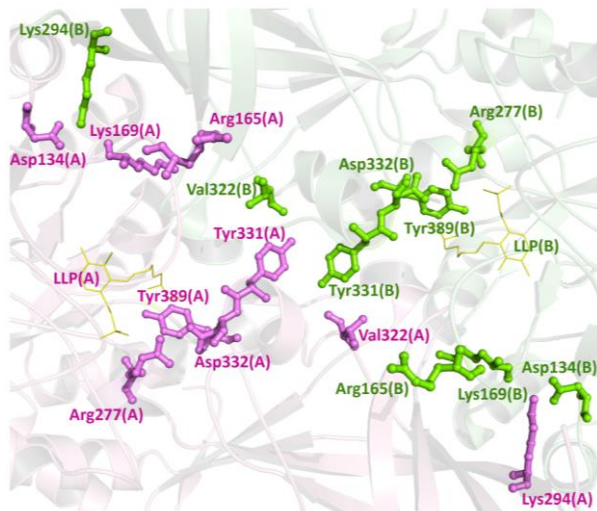
La ODC es una enzima implicada en la biosíntesis de poliaminas, a partir de ornitina, tales como la putrescina. Esta molécula es precursora de la espermidina y la espermina, ambas moléculas implicadas en el empaquetamiento del ADN. La reacción de descarboxilación de ornitina a putrescina es el paso limitante en esta vía y sigue los mismos mecanismos explicados en la introducción.

La acción de la ODC resulta de vital importancia en los procesos de crecimiento, división y diferenciación celular. Procesos que están especialmente presentes en las células de crecimiento rápido. Los inhibidores de esta ruta deberían ser útiles en el tratamiento de tumores (ya que la ODC está considerada como una enzima oncológica, y un aumento de su actividad se asocia con la mayoría de los tumores malignos), infecciones microbianas, y diferentes parasitosis.<sup>1,3,11</sup>

**Estructura de la enzima:**

La enzima es homodimérica, residiendo los centros activos en la interfaz del homodímero. Cada unidad cuenta con su propio sitio activo. Cada uno formado por el dominio N-terminal de una subunidad, que contiene los residuos involucrados en la interacción con el PLP, y el dominio C-terminal de la otra subunidad, que contiene los residuos involucrados en la unión al sustrato. Algunos residuos que destacar en la formación del dímero son Tyr331 y Val322 mediante interacciones hidrofóbicas, Asp134, Lys169 y Lys294 por atracción electrostática e

interacciones iónicas. En cuanto a la catálisis enzimática los estudios muestran que la mutación en Arg277 y Tyr389, implicados en la unión al PLP, llevan a la pérdida de la actividad catalítica. Mientras que la mutación en Tyr331 y Val322, situados en la interfaz del dímero, hacen a la enzima menos activa pese a no estar involucrados directamente en la catálisis. De manera similar, la mutación en los residuos Asp134, Lys169 y Lys294 mencionados anteriormente, es notablemente perjudicial para la actividad enzimática pese a no ser residuos catalíticos.<sup>11</sup>



**Figura 6: Residuos de aminoácidos en la interfaz del dímero de la ornitina descarboxilasa humana.<sup>11</sup>**

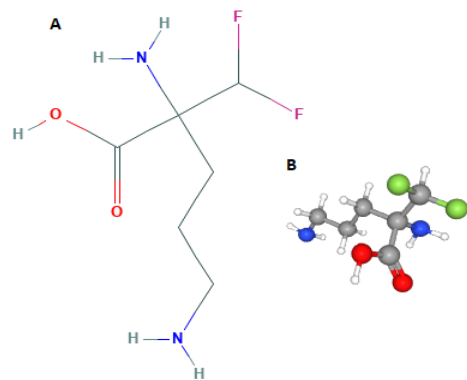
Residuos de la interfaz del dímero y LLP (análogo del PLP) en la interfaz del dímero. Estos residuos se muestran como un modelo de bola y palo; los residuos de una subunidad se muestran en verde, y los de la otra subunidad se muestran en rosa.

### Inhibidores que actúan sobre la PLP: Eflornitina, $\alpha$ -Difluorometilputrescina

#### **A. Eflornitina ( $\alpha$ -difluorometilornitina):**

La Eflornitina [ácido 2,5-diamino-2-(difluorometil) pentanoico] es un derivado difluorometilado de la ornitina<sup>12</sup> con actividad antineoplásica, el cual cuenta con y fue utilizado en el tratamiento de tripanosomiasis africana, causadas por *Trypanosoma brucei gambiense* (no tanto para otras subespecies por ser menos susceptibles), o neumonías en pacientes en VIH causadas por *Pneumocystis carinii*. Actualmente, la eflornitina solo está autorizada en el tratamiento tópico del hirsutismo facial en mujeres, debido a que también inhibe la producción del folículo del pelo.

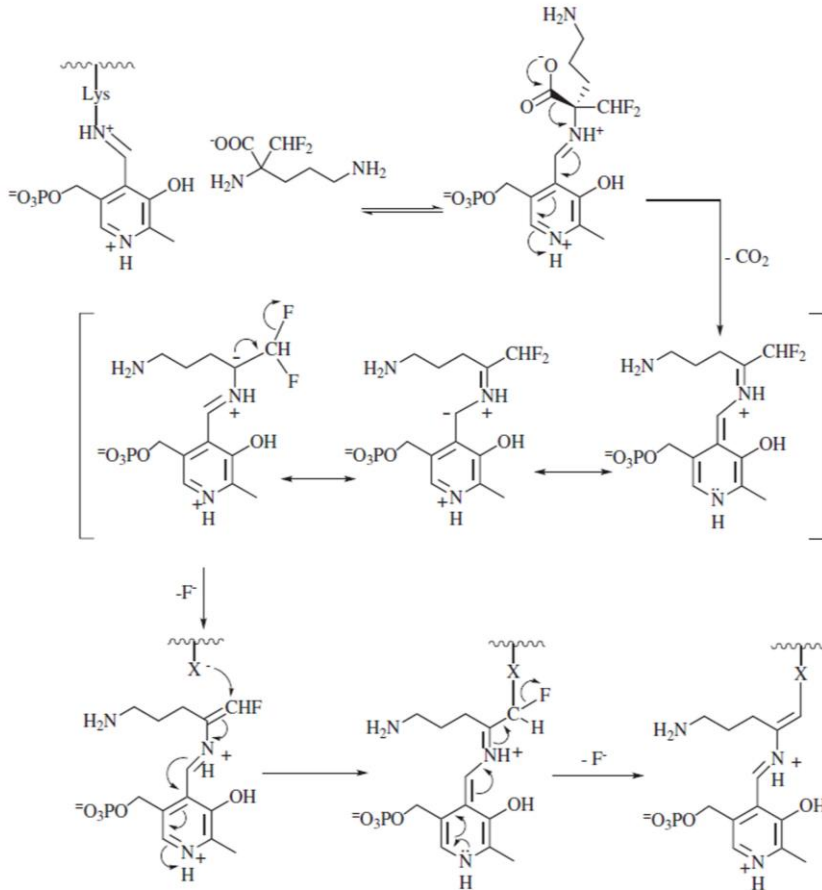
El mecanismo se inicia desde la aldimina interna. Se trata de una inhibición competitiva, es decir, la eflornitina sustituye al sustrato endógeno, y se lleva a cabo la formación de la aldimina externa con un mecanismo análogo al mostrado en la introducción y posteriormente se produce la  $\alpha$ -descarboxilación, paso fundamental e irreversible, la cual da lugar a una estructura resonante análoga a la del quinonoide. A continuación, la estructura resonante sufre una sustitución nucleofílica interna que lleva a la pérdida de uno de los dos átomos de flúor, se genera así un intermediario divinílico el cual es



**Figura 7: Representación de la estructura química de la Eflornitina<sup>12</sup>**

A. Estructura 2D. B. Estructura 3D

atacado por el grupo tiol de un residuo de cisteína del centro activo. Este último intermedio, resultado de la adición nucleofílica, sufre una última sustitución nucleofílica interna. Se pierde el último átomo de flúor dando lugar a un complejo Enzima-Inhibidor-Cofactor estable, quedando así inactivada la enzima de forma permanente.<sup>3,13,14,15</sup>

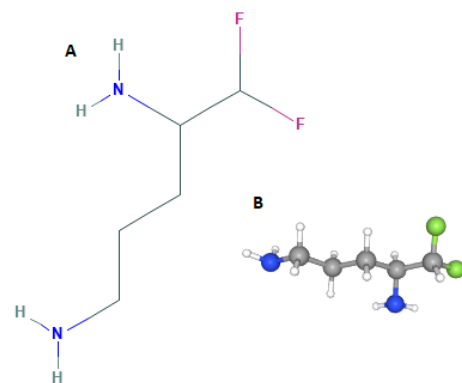


**Esquema 9: Mecanismo hipotético para la inactivación de la ornitina descarboxilasa por eflornitina.<sup>3</sup>**

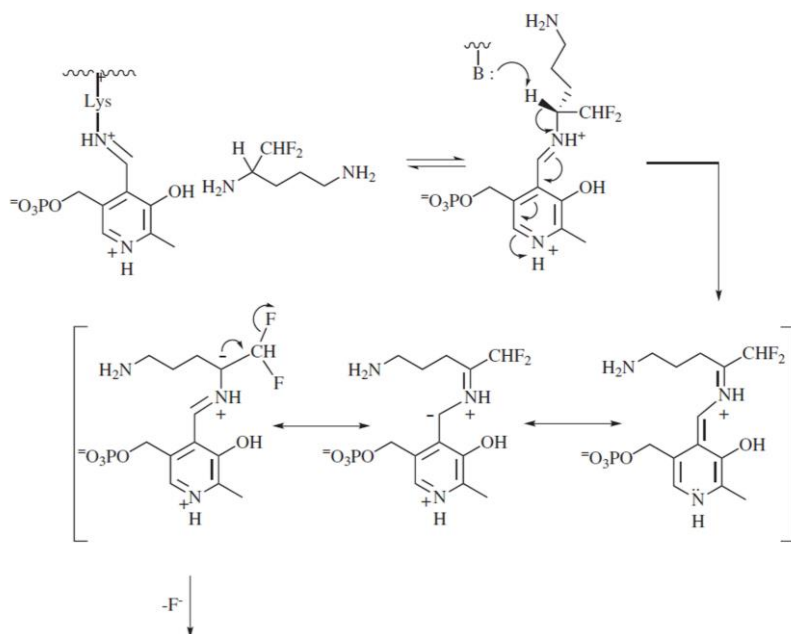
**B. α-Difluorometilputrescina:**

La α-Difluorometilputrescina [5,5-(difluoropentano-1,4-diamina)], en lugar de ser un análogo estructural del sustrato de partida (la ornitina), es un análogo al producto de la descarboxilación de la ornitina, es decir, a la putrescina.<sup>16</sup>

El inhibidor forma igual que en el caso anterior la aldimina interna, pero al contrario que la eflornitina no sufre la reacción de α-descarboxilación (debido a la ausencia del grupo carboxilo) obteniéndose directamente la estructura resonante análoga al quinonoide. Este intermediario es común a la ruta de inhibición de la eflornitina desarrollándose el resto de la ruta de la misma forma.<sup>3</sup>



**Figura 8: Representación de la estructura α-Difluorometilputrescina<sup>16</sup>**  
A. Estructura 2D. B. Estructura 3D



Mecanismo de inactivación idéntico a la eflornitina

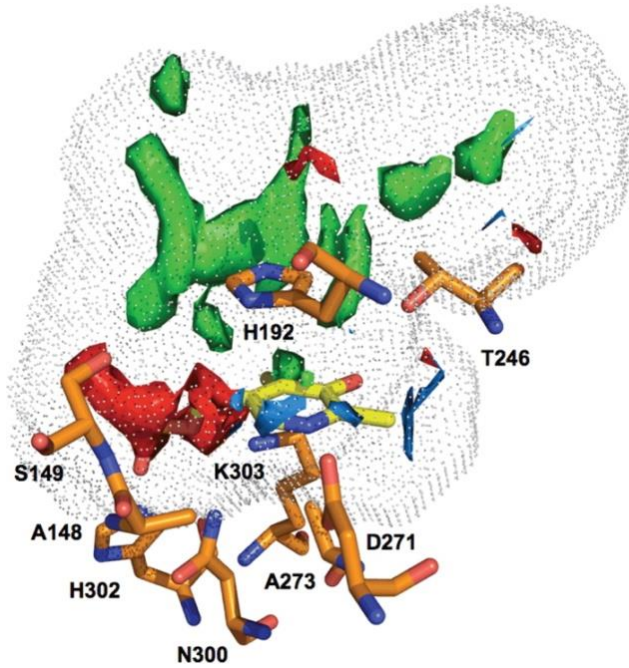
**Esquema 10:** Mecanismo hipotético para la inactivación de la ornitina descarboxilasa por la  $\alpha$ -difluorometilputrescina.<sup>3</sup>

### DOPA descarboxilasa (DDC):

La DDC es una enzima PLP dependiente que cataliza la  $\alpha$ -descarboxilación irreversible de L-aminoácidos aromáticos (relacionados con estructuras indol o catecol), por tanto, se la conoce también como descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (DCAA). Dos de los más importantes son la levodopa (L-Dopa) y el L-5-hidroxitriptófano (5-HTP) cuya descarboxilación lleva a la producción de los neurotransmisores dopamina y serotonina respectivamente.<sup>17</sup> El proceso de descarboxilación de los diferentes aminoácidos aromáticos sigue el modelo explicado en la introducción.

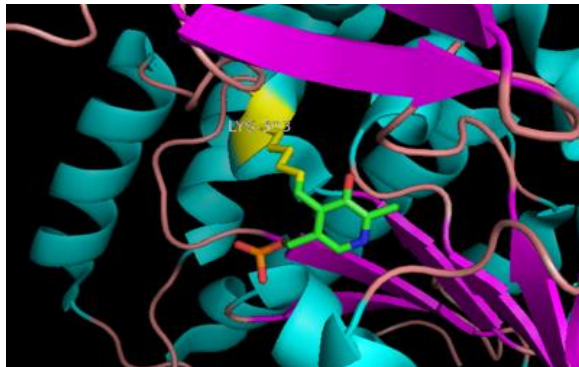
### Estructura de la enzima:

Estructuralmente la enzima es un homodímero, fuertemente unido, cuyo centro activo se encuentra inmerso en la parte central. Cada monómero está compuesto por una estructura tipo I, típico de las aspartato aminotransferasas, consistente en un gran dominio proteico, un dominio C-terminal de menor extensión y un dominio N-terminal con una estructura exclusiva de la DDC<sup>20</sup>. El cofactor se encuentra anclado a la enzima involucrando los residuos de His302 y His192, ambos residuos altamente conservados en las  $\alpha$ -descarboxilasas. Uno de estos residuos interactúa con el anillo de piridina de la PLP, mediante apilamiento, mientras que otro está en el sitio de unión al fosfato participando en la unión al cofactor. Además, presenta un motivo DXA (Asp-residuo variable-Ala) que rodea al cofactor. El residuo de aspartato interactúa con el anillo de piridina del PLP, mientras que la alanina ayuda a definir el parche hidrofóbico superpuesto al anillo de piridina del PLP, el cual se encuentra intercalado entre un residuo de His y Ala.<sup>18,19,20</sup> Otros residuos de interés son Ser193 y Thr82 conservados evolutivamente y que interactúan con el 3'O del PLP<sup>17,18,19</sup>, Asp271 el cual forma un enlace iónico con el nitrógeno de piridina protonado del PLP<sup>20</sup> y la Lys303 con la cual se forma la aldimina interna.<sup>19</sup>

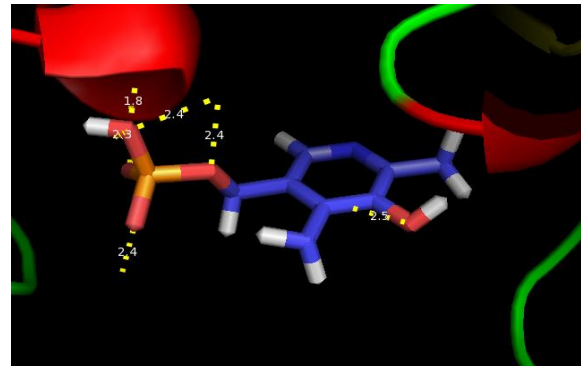


**Figura 9:** Mapa farmacofórico de la DDC.<sup>18</sup>

Los contornos verde, rojo y azul identifican regiones estéricas y energéticamente favorables para grupos hidrófobos, donantes de enlaces H y aceptores de enlaces H, respectivamente. La superficie punteada define el volumen accesible del bolsillo.



**Figura 10:** Enlace de base de Schiff de PLP a Lys303 en el sitio activo.<sup>20</sup>



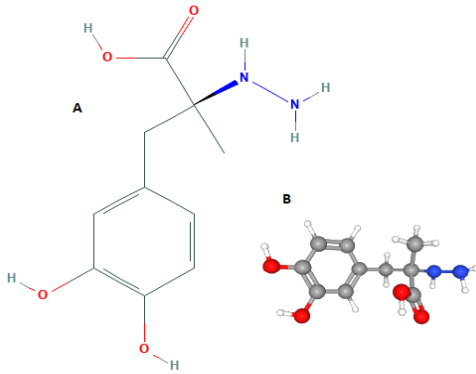
**Figura 11:** Red de enlace H de PLP en el sitio activo.<sup>20</sup>

### Inhibidores que actúan sobre la PLP: Carbidopa, Benserazida<sup>19</sup>

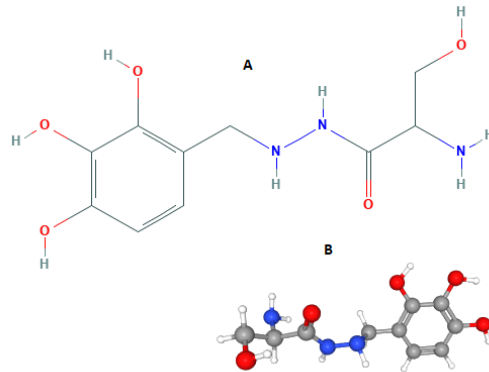
La alteración o disfunción en esta enzima tienen relevancia en enfermedades como el Parkinson (donde encontramos un déficit de dopamina por la muerte de las células productoras en la *sustancia nigra* en el mesencéfalo) en los tratamientos con L-Dopa, encontramos ciertos problemas como la degradación por las DDC periféricas o los efectos secundarios producidos por la acción de la L-Dopa en tejido periférico. Es por ello por lo que algunos tratamientos incluyen inhibidores de la DDC sin capacidad para atravesar la BHE, mejorando la eficacia terapéutica de la L-Dopa.<sup>3,19</sup>

Tanto la carbidopa [ácido (2S)-3-(3,4-dihydroxifenil)-2-hidrazinil-2-metilpropanoico]<sup>21</sup> como la benseracida [(2-amino-3-hidroxi-N'-[(2,3,4-trihydroxifenil)metil]propanohidrazida)]<sup>22</sup> son derivados de hidrazina aromáticos. Siendo la carbidopa el isómero levógiro anhidro de un derivado de hidracina sintética del neurotransmisor dopamina<sup>21</sup> y la benseracida un derivado de serilo trihidroxibencilhidrazina.<sup>22</sup> El grupo funcional hidrazina es el responsable de la

actividad, encontramos que la carbidopa posee acción directa sobre la enzima mientras que la benserazida, al tratarse de un profármaco, debe metabolizarse y escindirse en una molécula de serina y una molécula de trihidroxibencilhidrazina para poder ejercer su acción, siendo la responsable de la inhibición enzimática la trihidroxibencilhidrazina.<sup>19</sup>



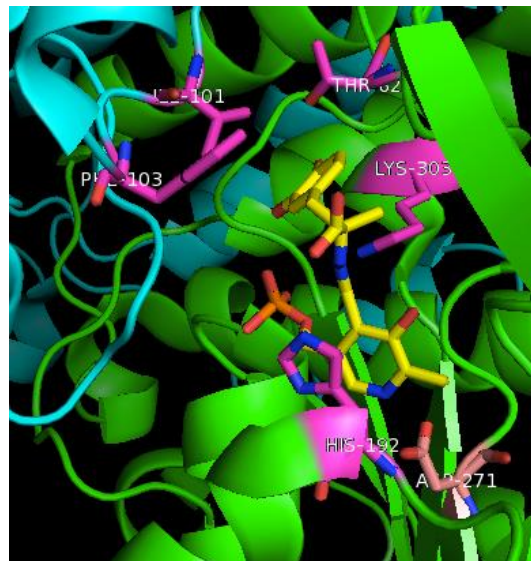
**Figura 12:** Representación de la estructura carbidopa<sup>21</sup>  
A. Estructura 2D. B. Estructura 3D



**Figura 13:** Representación de la estructura benserazida<sup>22</sup>  
A. Estructura 2D. B. Estructura 3D

Carbidopa y trihidroxibencilhidrazina, ambos análogos de sustrato dotados de una función de hidrazina sustituida, se unen a la DDC mediante la formación de un enlace de hidrazona con el cofactor PLP, funcionando, así como potentes inhibidores irreversibles de la enzima. Debido a este tipo de reactividad, pueden no solo actuar sobre la DDC si no que también pueden ejercer su acción sobre otras enzimas PLP dependiente dando lugar a efectos adversos.<sup>19</sup>

Particularmente la carbidopa, tras unirse al PLP mediante un enlace de hidrazona, entierra el anillo catecol en la hendidura del sitio activo, quedando estabilizado mediante fuerzas de van der Waals con Ile101 y Phe103, forma un puente de hidrogeno con Thr82. Adicionalmente, el PLP estabiliza aún más al inhibidor en el centro activo por formación de un enlace de hidrogeno adicional con el anillo catecol.<sup>20</sup>



**Figura 14:** interacciones clave entre los residuos del sitio activo, PLP y carbiDOPA.<sup>20</sup>



## **CONCLUSIONES:**

El PLP es uno de los cofactores imprescindibles del organismo, a través de esta breve revisión, se han expuesto algunos de los procesos tipo en los que participa y que no podrían llevarse a cabo sin su presencia. Haciendo hincapié en aquellas enzimas para las cuales existe un inhibidor que interactúa con el PLP descubrimos que, no solo resulta importante para el correcto funcionamiento del organismo, sino que es diana de múltiples tratamientos. Así mismo las características estructurales de las enzimas definen como van a interactuar el cofactor, los sustratos endógenos y los inhibidores, resultando imprescindible conocer a fondo las características estructurales para desarrollar moléculas y nuevos tratamientos. Cabe mencionar que las cuatro enzimas estudiadas son homodímeros, de los cuales GABA-T, Alr y ODC utilizan dos moléculas de PLP como cofactores. Y que el residuo de Lys que participa en la formación de la aldimina interna se encuentra definido para GABA-T, Alr y DDC.

Aun con toda la diversidad mostrada en esta revisión y las diferencias notables entre procesos y moléculas, encontramos en la reactividad del carbono  $\alpha$  de aminoácidos (reacciones de transaminación, racemización y descarboxilación) puntos en común que desarrollan esta reactividad específica más como una secuencia ramificada, que como líneas de reacción individuales y desconectadas entre sí. También pese a la variedad de moléculas inhibitoras, cada una de ellas enfocada a la interacción con una enzima PLP-dependiente distinta, descubrimos que sus mecanismos de inhibición no distan en exceso de los mecanismos endógenos, compartiendo parte del árbol de reacción, aunque finalmente se diferencien en la obtención de los productos. Formándose en caso de la vigabatrina (GABA-T), eflornitina,  $\alpha$ -difluorometilputrescina (ODC), carbidopa y benserazida (DDC) un complejo ternario Enzima-Inhibidor-Cofactor y en caso de D-cicloserina (Alr) y nuevamente vigabatrina un aducto inhibidor-Cofactor. Siendo la Vigabatrina la única en llevar a cabo el mecanismo endógeno completo en presencia del inhibidor.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger principios de bioquímica. 7ª ed. España: Omega; 2019.
2. Mohammed Afzal Azam, Unni Jayaram. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry [Internet]. 2015 [citado 29 Julio 2020]; 31: 517-526. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1050010>
3. Richard B Silverman, Mark W Holladay. The organic chemistry of drug design and drug action [Internet]. 3ª ed. ProQuest Ebook Central: Elsevier Science & Technology; 2014. [citado 29 Julio 2020]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=5754489>
4. Carmen Haro López. Fosfato de piridoxal: mecanismo de inhibición, sistemas enzimáticos con los que actúa y síntesis [Internet]. E-Prints Complutense; 2016 [citado 29 Julio 2020]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/49245/1/CARMEN%20HARO%20LOPEZ%20%281%29.pdf>
5. Toney MD. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes [Internet]. Biochim Biophys Acta. 6 Junio 2011. [citado 30 Julio 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
6. Paola Storici, Daniela De Biase, Francesco Bossa, Stefano Bruno, Andrea Mozzarelli, Caroline Peneff, Richard B. Silverman, Tilman Schirmer. Structures of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Aminotransferase, a Pyridoxal 5'-Phosphate, and [2Fe-2S] Cluster-containing Enzyme, Complexed with  $\gamma$ -Ethylnyl-GABA and with the Antiepilepsy Drug Vigabatrin. JBC [Internet]. 2004 [citado 30 Julio 2020]; 279, 363-373. Disponible en: <https://www.jbc.org/content/279/1/363.full#cited-by>
7. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5665, Vigabatrin; [Citado 23 agosto 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vigabatrin>
8. Ratna Singh, Francesca Spyraakis, Pietro Cozzini, Alessandro Paiardini, Stefano Pascarella, Andrea Mozzarelli. Chemogenomics of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry [Internet]. 2011 [30 Julio 2020]; Volume 28 (1): 183-194. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2011.643305?scroll=top&nedAccess=true>
9. Gareth A. Prosser Luiz Pedro S. de Carvalho. Kinetic mechanism and inhibition of Mycobacterium tuberculosis d-alanine: d-alanine ligase by the antibiotic d-cycloserine. FEBS Press [Internet]. 2013 [30 Julio 2020]; Volume 280(4): 1150-1166. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/febs.12108>
10. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6234, Cycloserine; [Citado 23 agosto 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cycloserine>
11. Lee CY, Liu YL, Lin CL, Liu GY, Hung HC. Functional roles of the dimer-interface residues in human ornithine decarboxylase. PLoS One. [Internet] 2014 [01 Agosto 2020]; 9(8):e104865. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104865>

12. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 3009, Eflornithine; [Citado 23 agosto 2020]. Disponible en : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eflornithine>
13. Levin, V. A., Ictech, S. E., Hess, K. R. Clinical importance of eflornithine ( $\alpha$ -difluoromethylornithine) for the treatment of malignant gliomas. CNS oncology. [Internet]. 2018 [01 Agosto 2020]; 7(2): CNS16. Disponible en: <https://doi.org/10.2217/cns-2017-0031>
14. Macedo, J. P., Currier, R. B., Wirdnam, C., Horn, D., Alsford, S., Rentsch, D. Ornithine uptake and the modulation of drug sensitivity in Trypanosoma brucei. FASEB journal [Internet]. 2017 [01 Agosto 2020]; official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 31(10): 4649–4660. Disponible en: <https://doi.org/10.1096/fj.201700311R>
15. Poulin R, Lu L, Ackermann B, Bey P, Pegg AE. Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. JBC [Internet]. 1992 [01 Agosto 2020]; 267(1):150-158. Disponible en: <https://www.jbc.org/content/267/1/150.long>
16. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 135151, 5,5-Difluoropentane-1,4-diamine; [Citado 01 agosto 2020]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-5-Difluoropentane-1-4-diamine>
17. Montioli, R., Cellini, B., Dindo, M., Oppici, E., Voltattorni, C. B. Interaction of human Dopa decarboxylase with L-Dopa: spectroscopic and kinetic studies as a function of pH. BioMed research international [Internet]. 2013 [Citado 01 Agosto 2020]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1155%2F2013%2F161456>
18. Singh R, Spyrakis F, Cozzini P, Paiardini A, Pascarella S, Mozzarelli A. Chemogenomics of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes. J Enzyme Inhib Med Chem. [Internet]. 2013 [Citado 01 agosto 2020];28(1):183-194. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.643305>
19. Daidone, F., Montioli, R., Paiardini, A., Cellini, B., Macchiarulo, A., Giardina, G., Bossa, F., Borri Voltattorni, C. Identification by virtual screening and in vitro testing of human DOPA decarboxylase inhibitors. PloS one [Internet]. 2012 [01 Agosto 2020]; 7(2), e31610. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031610>
20. Proteopedia [Internet]. Israel: Proteopedia; c2019 [12 Junio 2019; 02 Agosto 2020]. DOPA decarboxylase; [1 pagina] Disponible en: [https://proteopedia.org/wiki/index.php/DOPA\\_decarboxylase](https://proteopedia.org/wiki/index.php/DOPA_decarboxylase)
21. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 34359, Carbidopa; [Citado 23 agosto 2020]. Disponible en : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbidopa>
22. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 2327, Benserazide; [Citado 23 agosto 2020]. Disponible en : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benserazide>
23. Jesús Flórez, Juan Antonio Armijo, África Mediavilla. Farmacología humana. 6ª ed. España: Elsevier Masson; 2014.
24. John W. Baynes, Marek H. Dominiczack. Bioquímica Médica. 5ª ed. España: Elsevier; 2019.