



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y  
TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Identificación de ligandos y posibles compuestos guía  
para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción  
por fluorescencia y cristalografía de proteínas.**

Tesis que presenta  
**María Fernanda Huerta Anguiano**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Codirector de la Tesis:  
**Dr. Samuel Lara González**

Codirector de la Tesis:  
**Dra. Gabriela M. Montero Morán**

San Luis Potosí, S.L.P., 21 de octubre del 2020



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Identificación de ligandos y posibles compuestos guía para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción por fluorescencia y cristalografía de proteínas”, presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María Fernanda Huerta Anguiano** y aprobada el 20 de noviembre del 2020 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

Dr. Samuel Lara González  
Codirector de la tesis

---

Dra. Gabriela M. Montero Morán  
Codirectora de la tesis

---

Dr. J. Sergio Casas Flores  
Miembro del Comité Tutorial



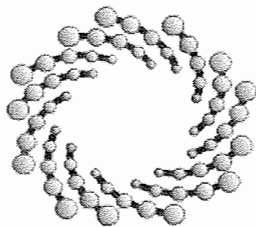
## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 931883 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.).

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACYT INFRA-2013-01 No 204373.

Agradecemos al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas del Instituto de Química (LANEM-IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo en la colecta, reducción y análisis de los datos de difracción de rayos-X.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 211 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de diciembre del año 2020, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Gabriela Margarita Montero Morán</b>	<b>Secretaria</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Samuel Lara González</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**María Fernanda Huerta Anguiano**

sobre la Tesis intitulada:

*Identificación de ligandos y posibles compuestos guía para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción por fluorescencia y cristalografía de proteínas*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Samuel Lara González**  
**Dra. Gabriela Margarita Montero Morán (UASLP)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 14:13 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de diciembre de 2020.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis padres que todo el tiempo me apoyaron incondicionalmente, por su amor y cariño, por enseñarme a ser responsable, a ser constante, por motivarme, y sobre todo por creer en mí.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo: Gustavo, Ana, Ariana, por la orientación, enseñanzas, comentarios y por escucharme muchas veces exponer mi trabajo y ayudarme a mejorar; a Páez por compartirme de su experiencia con sus recomendaciones y consejos técnicos: a Fitzya, por toda la paciencia que tuvo para explicarme las veces que fueron necesarias (muchas) los métodos para trabajar en el laboratorio e incluso enseñarme a interpretar los resultados e identificar los posibles errores que tuve. También porque hizo que mi tiempo en el laboratorio fuera ameno y divertido.

A mi director de tesis el Dr. Samuel por la oportunidad que me dió de realizar la tesis en su laboratorio, y la confianza brindada para que pudiera ser parte de este proyecto que me agradó mucho, también por resolver todas mis dudas con mucha paciencia, y orientarme cada que lo buscaba.

A mi codirectora la Dra. Gaby, primeramente, por la confianza al dejarme trabajar en su laboratorio, prestarme su equipo, placas o micropipetas, etc. Y por ayudarme bastante con sus recomendaciones cuando me estancué en el experimento que técnicamente hablando me costó mucho más que los demás experimentos. Su orientación fue de gran ayuda porque me sentí un poco bloqueada. También por sus aportaciones y comentarios acerca de mi redacción.

A mi sinodal el Dr. Sergio, porque sus dudas, comentarios y sugerencias enriquecieron mi trabajo, y su perspectiva me ayudó a pensar y profundizar más sobre el tema, cuestionarme otras cosas y no enfocarme solo en lo técnico; y también por ayudarme a expresar mis ideas con más claridad.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Samuel Lara González por su dirección y apoyo, Dra. Gabriela M. Montero Morán y Dr. Sergio J. Casas Flores, por el apoyo y aportaciones a esta tesis.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>i</b>
<b>Créditos Institucionales</b>	<b>ii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>vii</b>
<b>Anexos</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Expresión y purificación de la proteína FABP4.</i>	7
2.2 <i>Determinación de afinidades de unión a ligando</i>	8
2.3 <i>Compuestos para experimentos de "soaking" y co-cristalización</i>	9
2.4 <i>Ensayo de cristalización y experimentos de "soaking".</i>	10
2.5 <i>Experimentos de co-cristalización</i>	10
2.6 <i>Determinación de la estructura cristalográfica de FABP4 y FABP4/ibuprofeno.</i>	11
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>12</b>
3.1 <i>Expresión y purificación de FABP4.</i>	12
3.2 <i>Determinación de afinidades de unión a ligando.</i>	13
3.3 <i>Cristales de los complejos FABP4/ligando y colección de datos de difracción.</i>	14
3.4 <i>Determinación de la estructura cristalográfica de apo FABP4 y del complejo FABP4/ibuprofeno.</i>	14
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>16</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>24</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Compuestos naturales de la planta <i>Salvia amarissima</i> .	<b>27</b>
<b>Tabla 2.</b> Concentración del inhibidor que produce una inhibición del 50% (IC <sub>50</sub> ) de compuestos en ensayo de desplazamiento de unión de ligandos con 1,8-ANS.	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Cristales obtenidos con métodos de “soaking”.	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Cristales obtenidos mediante co-cristalización.	<b>30</b>
<b>Tabla 5.</b> Estadísticas de refinamiento de los datos de la difracción de rayos X de los cristales de FABP4	<b>31</b>



## Lista de figuras

<b>Fig. 1.</b> Purificación FABP4	<b>32</b>
<b>Fig. 2.</b> Unión de 1,8-ANS a FABP4	<b>33</b>
<b>Fig. 3.</b> Curva concentración-respuesta de Ibuprofeno (control)	<b>33</b>
<b>Fig. 4.</b> Curvas de concentración-respuesta	<b>34</b>
<b>Fig. 5.</b> Cristal de la proteína FABP4	<b>35</b>
<b>Fig. 6.</b> Superposición de estructuras FABP4 sin ligando y FABP4/ibuprofeno	<b>36</b>
<b>Fig. 7.</b> Residuos aminoacídicos que interaccionan con ibuprofeno.	<b>38</b>

## Anexos

### Tablas

<b>Tabla S1.</b> Inhibidores de FABP4 en humanos	<b>40</b>
<b>Tabla S2.</b> Familia de genes FABPs en humanos	<b>43</b>

### Figuras

<b>Fig. S1.</b> Mapa 2mFo-DFc a 1.38 sigma de contorno del ibuprofeno en su sitio de unión en FABP4.	<b>44</b>
<b>Fig. S2.</b> Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la familia de proteínas FABP presentes en humano.	<b>45</b>

## RESUMEN

### Identificación de ligandos y posibles compuestos guía para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción por fluorescencia y cristalografía de proteínas.

La proteína 4 de unión a ácidos grasos (FABP4, de sus siglas en inglés) juega un papel importante en la regulación de las vías metabólicas relacionadas a glucosa y lípidos, así como en las vías de señalización asociadas a inflamación. Al inhibir a la proteína o eliminar el gen, se genera protección y mejoría en afecciones relacionadas a obesidad como diabetes, hipertensión, aterosclerosis y enfermedades cardíacas, por lo que hay gran interés en el desarrollo de un fármaco inhibidor de esta proteína. Aunque, la gran similitud estructural que tiene FABP4 con los otros miembros de la familia de proteínas FABP dificulta el diseño de un fármaco específico que no tenga reacción cruzada. El objetivo central de este trabajo fue la estandarización de la estrategia que se utilizará para buscar sitios de unión a ligandos en FABP4 por cristalografía de rayos-X. En este trabajo expresamos a FABP4 en la cepa BL21 (DE3) Star de *Escherichia coli* y la purificamos en 3 pasos: por afinidad a Níquel, intercambio iónico y exclusión molecular; logrando un rendimiento de 7mg/L de proteína. Se seleccionaron 20 compuestos de la planta medicinal *Salvia amarissima* por su similitud química a inhibidores ya reportados de FABP4. Se evaluó la unión de los compuestos a FABP4 por un ensayo de competencia con ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico (1,8-ANS), que permitió determinar la concentración necesaria para obtener una inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) para cada uno de los compuestos, y el ibuprofeno se utilizó como control positivo, debido a que en un trabajo previo se describió al ibuprofeno como un posible inhibidor de FABP4. Los compuestos 2, 3, 4 y 5 son los compuestos con mejor afinidad respecto a los 20 evaluados, siendo el compuesto 3 el que se une mejor por mostrar un IC<sub>50</sub> menor al resto (189.3 ± 15.3µM). Conseguimos la cristalización de la proteína FABP4 sin ligando. Mediante el método de “soaking” a 2 h y 8 h, se obtuvieron cristales del complejo FABP4/ibuprofeno los cuales fueron difractados. Actualmente contamos con los datos de los cristales de FABP4 con 4-iodopirazol y 4-bromopirazol obtenidos por “soaking” a 2h y 8h para procesarlos. Sin embargo, con este método no se logró visualizar la presencia de los compuestos de *S. amarissima*. Como alternativa, realizamos experimentos de co-cristalización con los compuestos 2, 4, 5 y 6, quedando pendiente el compuesto 3, con un resultado positivo. Por lo tanto, en este trabajo mostramos las estructuras FABP4 sin ligando y FABP4/ibuprofeno resueltas por reemplazo molecular y refinadas mediante los programas de la plataforma PHENIX y el programa Coot.

**PALABRAS CLAVE:** FABP4, 1,8-ANS, cristalografía de proteínas, diseño de fármaco, obesidad.

## Abstract

### Identification of ligands and possible guide compounds for FABP4 protein by fluorescence interaction analysis and protein crystallography.

Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) plays an important role in the regulation of glucose and lipid-related metabolic pathways, as well as signaling pathways associated with inflammation. By inhibiting the protein or removing the gene, protection and improvement is generated in obesity-related conditions such as diabetes, hypertension, atherosclerosis, and heart disease, so there is great interest in developing a drug that inhibits this protein. However, the great structural similarity that FABP4 has with the other members of the FABP family of proteins makes it difficult to design a specific drug that does not cross react. The central objective of this work was the standardization of the strategy that will be used to search sites to ligands in FABP4 by X-ray crystallography. In this work we show the expression of FABP4, in the BL21 (DE3) Star cells of *Escherichia coli* and the purification in 3 steps: by nickel affinity, ion exchange and molecular exclusion; achieving a yield of 7mg/L of protein. Twenty compounds of *Salvia amarissima* were selected for their chemical similarity to already reported FABP4 inhibitors. The binding of the compounds to FABP4 was evaluated by a competitive displacement assay with 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS), which allowed to determine the concentration required to obtain a 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) for each one. We used ibuprofen as a positive control, since in a previous work ibuprofen has been described as a possible FABP4 inhibitor. Compounds 2, 3, 4 and 5 are the compounds with the best affinity with respect to the 20 evaluated, being compound 3 the one that binds better because it shows an  $IC_{50}$  lower than the rest ( $189.3 \pm 15.3 \mu M$ ). We achieved the crystallization of the FABP4 protein without ligand. By means of the soaking method at 2h and 8h, crystals of the FABP4/ibuprofen complex were obtained and diffracted. Currently we have the data to process of FABP4 crystals with 4-iodopyrazole and 4-bromopyrazole obtained by soaking at 2h and 8h. However, with this method we were not able to visualize the presence of *Salvia amarissima* compounds. As an alternative, we performed co-crystallization experiments with compounds 2, 4, 5 and 6, with compound 3 remain to be done. Crystallization was successful, and diffraction experiments will be performed shortly. Therefore, in this work we show the FABP4 unbound and FABP4/Ibuprofen structures solved by molecular replacement and refined by the PHENIX and Coot programs.

**KEY WORDS:** FABP4, 1,8-ANS, protein crystallography, drug design, obesity.

# **Identificación de ligandos y posibles compuestos guía para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción por fluorescencia y cristalografía de proteínas**

**Huerta-Anguiano M. F., Rodríguez-Romero A., Montero-Morán G. M., Lara-González S.\***

Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). San Luis Potosí, S.L.P. México, 78216.

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510.

**Autor de correspondencia:** Samuel Lara González,

Correo electrónico: [samuel.lara@ipicyt.edu.mx](mailto:samuel.lara@ipicyt.edu.mx)

**Título corto:** Identificación de ligandos y compuestos guía para la proteína FABP4

**Palabras clave:** FABP4, 1,8-ANS, cristalografía de proteínas, diseño de fármaco, obesidad.

# 1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una pandemia en la cual se produce una sobrecarga metabólica que conduce a la expansión del tejido adiposo<sup>1,2</sup>. El tejido adiposo se vuelve disfuncional y es infiltrado por células inmunes, lo cual produce un estado de inflamación crónica de bajo grado<sup>2</sup>. Lo anterior conlleva al desarrollo del síndrome metabólico, que consiste en un conjunto de patologías que incluyen dislipidemia, resistencia a insulina, diabetes tipo 2, hipertensión arterial y aterosclerosis<sup>3</sup>.

El tejido adiposo es responsable de almacenar energía, participa en el tráfico y la señalización de lípidos, produce y libera una variedad de sustancias bioactivas como adipoquinas, quimioquinas y ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo. Estas moléculas a través de sus acciones locales y sistémicas se coordinan para regular el metabolismo energético, la sensibilidad a la insulina, la inflamación y las respuestas vasculares<sup>3,4</sup>. En particular, las adipoquinas son factores derivados del adipocito y están involucrados en funciones fisiológicas como homeostasis, inflamación, inmunidad, entre otras<sup>5</sup>. La proteína de unión a ácidos grasos 4, es una de las adipoquinas más abundantes en humanos, la cual alcanza una concentración de 10–50 ng/mL en sangre<sup>6</sup>.

La proteína FABP4 al igual que el resto de la familia FABP, es citoplasmática y de baja masa molecular (14.6 kDa), consta de 132 aminoácidos que, al igual que el resto de la familia FABP forman una estructura con plegamiento tipo barril de 10 hojas beta anti paralelas y dos hélices alfa<sup>7</sup>. Se une de forma reversible a ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados, eicosanoides y otros lípidos con alta afinidad y selectividad<sup>8</sup>. El papel de FABP4 es el del transporte de ácidos grasos desde la superficie celular hacia tejidos periféricos para ser metabolizados o almacenados, de esta forma participa directamente en la homeostasis de los ácidos grasos y la vía de señalización de lípidos<sup>9,10</sup>.

FABP4 juega un papel importante en la regulación de las vías metabólicas relacionadas a glucosa y lípidos, así como en las vías de señalización asociadas a

inflamación, por lo que contribuye a las respuestas metabólicas inadecuadas en condiciones patológicas como estrés metabólico<sup>11</sup>. En la obesidad, el estrés metabólico se produce por la ingesta calórica excesiva y la disminución del gasto energético, en donde la homeostasis metabólica e inflamatoria no pueden mantenerse<sup>12</sup>. El estrés se vuelve crónico, el cual puede conducir progresivamente a complicaciones metabólicas, en donde las respuestas metabólicas inadecuadas son prolongadas<sup>13</sup>. En particular, FABP4 responde inadecuadamente a las condiciones de exceso de nutrientes o estrés crónico, ya que contribuye a un estado proinflamatorio. Sin embargo, su respuesta puede ser beneficiosa para la supervivencia, por ejemplo, en condiciones de ayuno o inanición transporta ácidos grasos a sitios en donde se requiere energía<sup>14</sup>.

El papel fisiológico de FABP4 se observó en un estudio *in vitro*, que relacionó al gen de *FABP4* con el desarrollo de aterosclerosis, el evento iniciador crítico en la formación de un ateroma que implica la invasión de monocitos a través de la pared endotelial de las arterias y su transformación de macrófagos en células espumosas<sup>15</sup>. En el experimento se encontró mediante un cribado de mRNA que el gen *FABP4* se sobreexpresaba en células monocíticas THP-1 humanas que fueron diferenciadas a macrófagos con acetato de miristato forbol (PMA), y posteriormente fueron convertidos a células espumosas al exponerlos a la lipoproteína de baja densidad oxLDL. Luego, mediante una construcción en adenovirus sobreexpresaron a FABP4 y observaron que mejoró la acumulación de colesterol esterificado en células espumosas de macrófagos<sup>15</sup>. Es decir, el gen *FABP4* promueve la formación de células espumosas, por lo tanto, su papel es importante en el desarrollo de las lesiones típicas de la aterosclerosis, los ateromas<sup>15</sup>.

En contraste, la deficiencia de FABP4 tiene un efecto positivo, por ejemplo, en un estudio realizado por Makowski y colaboradores en 2001, se demostró *in vitro*, que los macrófagos deficientes de *Fabp4* reducen la producción de citoquinas inflamatorias y la formación de ésteres de colesterol, lo cual confiere protección contra la aterosclerosis. Adicionalmente, probaron que la expresión de *Fabp4* en macrófagos promueve la aterogénesis de forma independiente a la expresión en

adipocitos. Esto fue observado en ratones deficientes de apolipoproteína E (*ApoE*), con macrófagos deficientes de *Fabp4*, los cuales presentaron una reducción en lesiones ateroscleróticas a diferencia de los que tenían deficiencia total de *Fabp4* (en macrófagos y adipocitos). El modelo de ratón *ApoE*<sup>-/-</sup> desarrolla lesiones ateroscleróticas de forma espontánea alimentados con una dieta normal<sup>16</sup>.

Además, Makowski y colaboradores estudiaron dos grupos de ratones modelo *ApoE*<sup>-/-</sup>, uno de los dos grupos era deficiente de *Fabp4* y el otro no. A todos los ratones se les dio una dieta alta en grasa promoviendo obesidad, resistencia a insulina y aterosclerosis. El grupo *ApoE*<sup>-/-</sup> *Fabp4*<sup>-/-</sup> presentó una reducción significativa de colesterol total, glucosa y triglicéridos, en comparación con el grupo de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup> *Fabp4*<sup>+/+</sup><sup>16</sup>. Interesantemente, la deficiencia genética de *Fabp4*, también confiere protección contra la resistencia a la insulina y diabetes. De hecho, esto fue demostrado desde 1996, la primera vez que se trabajó con un modelo de ratón deficiente de *Fabp4*, al que se le indujo obesidad mediante dieta. En este trabajo se mostró una disminución moderada de los niveles de colesterol y triglicéridos en comparación con los ratones del grupo control. Sin embargo, se presentó un aumento leve, pero significativo, de ácidos grasos libres en plasma<sup>17</sup>. Estudios recientes añaden que la deficiencia genética *Fabp4* confiere una protección significativa contra la hiperinsulinemia e hiperglicemia<sup>3</sup>. También reduce la esteatosis hepática, mejora el control de la producción de glucosa hepática, y la eliminación de glucosa periférica<sup>11</sup>. Asimismo, mejora el perfil lipídico en tejido adiposo elevando los niveles de ácido palmitoleico C16:1n7, debido a su acción sensibilizante a insulina<sup>11</sup>.

Adicionalmente se ha propuesto a FABP4 como un posible biomarcador en un estudio clínico realizado en humanos para el diagnóstico de trastornos metabólicos y cardiovasculares relacionados con la obesidad. Mediante análisis proteómico por espectrometría de masas, se estudió a 229 personas: 100 de ellas delgadas con índice de masa corporal (IMC) <25 kg/m<sup>2</sup> y 129 individuos con sobrepeso/obesidad (IMC >25 kg/m<sup>2</sup>). Encontraron que las concentraciones medias circulantes de FABP4 eran significativamente mayores en personas con



sobrepeso/obesas que en personas delgadas. Asimismo, se observó una correlación positiva de las concentraciones de FABP4 séricas con circunferencia de la cintura, la presión arterial, la dislipidemia, la insulina en ayunas y el índice de resistencia a la insulina<sup>3</sup>.

En otro estudio clínico, se midió FABP4 sérico por medio de un ensayo de ELISA a 306 sujetos con accidente cerebrovascular isquémico agudo y 306 controles de edad, sexo e índice de masa corporal (todos los controles estaban libres de enfermedades cardiovasculares). También incluyó a 60 sujetos que murieron a los 3 meses de contraer un accidente cerebrovascular isquémico agudo. Observaron que el nivel de FABP4 sérico fue mayor en sujetos con accidente cerebrovascular isquémico en comparación con los controles. Además, encontraron que los altos niveles de FABP4 en las muestras de sangre tomadas en la semana siguiente a un accidente cerebrovascular agudo se asociaron con una mortalidad temprana (en un plazo de 3 meses). Por lo tanto, se propuso que la concentración sérica de FABP4 en humanos puede servir como un indicador de pronóstico útil para la mortalidad temprana en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico<sup>6</sup>.

Por lo anterior, se ha despertado el interés en el estudio de FABP4 para el desarrollo de un fármaco terapéutico que tenga como propósito inhibir a la proteína bloqueando la unión de ligandos endógenos y obtener efectos beneficiosos para las patologías relacionadas a obesidad. Hasta el momento en la base de datos Protein Data Bank, se han reportado al menos 22 ligandos inhibidores de FABP4 humano (Tabla S1). La mayoría de estos ligandos que inhiben a FABP4 también reportan actividad inhibitoria hacia las proteínas FABP3/5 o incluso FABP8; que son las únicas isoformas reportadas con las que se ha trabajado para probar la selectividad de un ligando inhibidor de FABP4<sup>9,18-22</sup>. Ha sido un reto el diseño de un fármaco eficaz que inhiba a la proteína FABP4 para fines terapéuticos, debido a que presenta gran similitud estructural con los otros miembros de la familia de proteínas FABP (FABP1-12), de todas estas únicamente FABP10 y FABP11 están ausentes en

humanos<sup>23</sup>. En la tabla S2 se muestran los genes de la familia FABP presentes en humanos.

La selectividad de los inhibidores de FABP4 se puede inferir a partir de un ensayo *in vitro*, en donde se midió la afinidad que presenta ante la proteína de interés y las demás isoformas. Un ejemplo notorio de la falta selectividad por parte de uno de los compuestos reportados en la Tabla S1, es la del compuesto 1 (PDB: 1TOW) reportado por Lehmann y colaboradores en 2004, el cual, presenta un IC<sub>50</sub> similar entre FABP4 (0.57  $\mu$ M) y FABP3 (< 0.6  $\mu$ M)<sup>9</sup>.

Los compuestos presentados en la Tabla S1 no han sido probados *in vivo*, excepto por el compuesto BMS309403, que mostró tener efectos antidiabéticos en un modelo de ratón, pero, su selectividad solo fue probada frente a las proteínas FABP5 y FABP8<sup>8</sup>. Es evidente que se requieren inhibidores altamente selectivos para evitar la inhibición cruzada y afectar la función de otras proteínas de la familia FABP<sup>24</sup>. Por ejemplo, en pez cebra se ha demostrado que la expresión reducida de FABP3 mediante "knockdown", resulta en la disfunción mitocondrial inducida por apoptosis y deterioro del desarrollo cardíaco<sup>25</sup>. En ratones mutantes FABP3<sup>-/-</sup>, la eliminación del gen de FABP3 provoca intolerancia aguda al ejercicio y, una hipertrofia cardíaca localizada en la vejez<sup>26</sup>.

Una estrategia que se ha utilizado para mejorar la especificidad y afinidad es el diseño de fármacos basado en estructura, es decir diseño por cristalografía de rayos-X. Esta estrategia, tiene la ventaja de dotar de información sobre las interacciones de la proteína con el ligando, con la finalidad de encontrar sitios de unión que proporcionen alta especificidad y afinidad<sup>27</sup>. El objetivo de este trabajo fue establecer la estrategia de búsqueda de nuevos sitios de unión a ligandos para la proteína FABP4. Logramos estandarizar un método que permite estimar la afinidad de posibles inhibidores a FABP4. Este método nos permitió seleccionar los mejores compuestos que interaccionan con FABP4 de 20 productos naturales provenientes de la planta medicinal *Salvia amarissima*. A la par, logramos estandarizar experimentos de "soaking" que nos permitieron obtener la estructura del complejo FABP4/ibuprofeno. Este experimento nos permitirá cristalizar a FABP4

con ligandos con una masa molecular inferior a la del ibuprofeno. Para compuestos con una masa molecular superior a ~206 g/mol, estandarizamos experimentos de co-cristalización que nos permitieron obtener cristales de FABP4 con ligandos con masas moleculares hasta de ~344 g/mol, que muestran características adecuadas para experimentos de difracción de rayos-X.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Expresión y purificación de la proteína FABP4.

El vector de expresión que se utilizó fue pET28·PPS/hFABP4, que se generó previamente en nuestro grupo de trabajo (Miriam Livier Llamas García), contiene la secuencia optimizada de FABP4 (132 residuos) para expresión en *E. coli* con una etiqueta de 6XHis en el extremo amino terminal y un sitio de corte para la proteasa PreScission (PPS). Se transformó en células calcio competentes BL21 (DE3) Star de *E. coli* y fueron cultivadas en medio LB con 50 µg/mL de Kanamicina a 37 °C/190 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) entre 0.6-0.8. La expresión fue inducida añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.4 mM a 37 °C/190 rpm por 4 h. Las células cosechadas se resuspendieron en 25 mL de amortiguador de lisis (50 mM Tris pH8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol y 5 mM de B-ME). Posteriormente se lisaron por sonicación por 7 min 30 s a una amplitud (amp) de 50% con pulsos 15 ON/45 OFF en hielo. El lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble, la cual se transfirió a una columna de 5 mL de agarosa Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con amortiguador de lisis con 4 volúmenes de columna (4CV). La proteína se eluyó con un gradiente escalonado de 10, 20, 250 y 500 mM de imidazol con 3CV cada uno, se colectaron fracciones de 3 mL y se tomaron 20 µL de muestra de cada una y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE. Las fracciones en las que se identificó a FABP4 se juntaron y se incubaron a 4 °C toda la noche con 5 unidades/mL de la proteasa PPS, para eliminar la etiqueta 6XHis.

La proteína sin etiqueta de histidinas se desaló por filtración en gel con una columna PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) y mantenerla en el amortiguador 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA, 5mM B-ME. La proteína se inyectó en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada con el amortiguador que se utilizó para desalar a la proteína. Se utilizaron las siguientes condiciones: P max =0.85 MPa, Flujo de corrida: 2 mL/min, Abs 280 nm. La elución de la proteína se realizó con un gradiente lineal de 0 a100% de amortiguador B (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA, 5mM B-ME, 1M NaCl). Por último, la proteína FABP4 fue purificada por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 (GE Healthcare) en las siguientes condiciones: Presión máxima = 2.0 Megapascales (MPa), Flujo de corrida: 0.8 mL/min, Absorbancia (Abs) 280 nm, 1.5 CV, previamente equilibrada en amortiguador C (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 5 mM B-ME ,150 mM NaCl). La pureza de la proteína se analizó por SDS-PAGE al 18% (Fig. 1). La proteína purificada se guardó a 4 ° C para experimentos posteriores.

## *2.2 Determinación de afinidades de unión a ligando*

Se determinó la unión de ligandos a la proteína FABP4 ( $IC_{50}$ ) mediante ensayos de desplazamiento por competencia con el fluoróforo 1,8-ANS. Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pozos Corning™, el volumen final de la reacción fue de 100µL, la concentración final de proteína fue de 2 µM, y la concentración final de ANS fue de 100 µM, en el amortiguador 150 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Se prepararon las muestras y se incubaron a temperatura ambiente, por 30 min con los componentes: proteína, amortiguador y compuesto; después se adicionó 1,8-ANS y se incubó 1 hr. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Otras condiciones evaluadas se mencionan en su caso a lo largo del texto.

Posteriormente se midió la fluorescencia en un equipo lector de microplacas Synergy HT marca BioTek, se utilizó una excitación de 340/40 nm y una longitud de emisión de 510/40nm. Los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 6.0. mediante el ajuste no lineal a un modelo dosis-respuesta sigmoidal, la ecuación

es la siguiente:  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ ). El programa de regresión no lineal se ajustará a las mesetas superior e inferior, el (log)  $\text{IC}_{50}$  y el factor de pendiente de Hill (HillSlope). Esto con el objetivo de determinar la concentración que provoca una respuesta a medio camino entre la respuesta máxima (Superior) y la respuesta máxima inhibida (Inferior), este punto medio ( $\text{IC}_{50}$ ) indica la concentración de compuesto requerida para que la intensidad máxima de fluorescencia del complejo saturado (1,8-ANS-FABP4) se reduzca al 50% del valor inicial<sup>28</sup>.

### 2.3 Compuestos para experimentos de “soaking” y co-cristalización

Se trabajó con 20 compuestos naturales provenientes de la planta *S. amarissima*, proporcionados por el Dr. Elihú Bautista, CIIDZA. Estos fueron seleccionados con base a su composición química, la cual es similar a la de los compuestos inhibidores de FABP4 reportados en la base de datos Protein Data Bank (Tabla S2), que por lo general presentan anillos aromáticos.

Los compuestos fueron diluidos en DMSO 100% y llevados a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . A partir de estos se prepararon 5 mezclas, cada una contenía 4 compuestos distintos entre sí según su tamaño y tipo (flavonoide o terpenoide). En la Tabla 1 se muestran los compuestos y su distribución en cada mezcla preparada. El volumen final de cada mezcla fue de 30  $\mu\text{L}$ : 27  $\mu\text{L}$  de solución Morpheus 1-17 y en 3  $\mu\text{L}$  de los 4 compuestos (0.75  $\mu\text{L}$  de cada compuesto). También se prepararon soluciones individuales de 4-iodopirazol, 4-bromopirazol, ibuprofeno, y de los compuestos 2, 4, 5 y 6; la solución consta de 27  $\mu\text{L}$  de solución Morpheus 1-17 y 3  $\mu\text{L}$  del compuesto.

En todos los casos la concentración final de los ligandos fue de 10 mM con 10% de DMSO. Las soluciones individuales fueron utilizadas para experimentos de “soaking” así como para el experimento de co-cristalización, y las mezclas de compuestos fueron utilizadas únicamente para experimentos de “soaking”. Mas adelante se mencionará en que consiste el experimento de “soaking”.

#### *2.4 Ensayo de cristalización y experimentos de "soaking".*

Los cristales de FABP4 fueron crecidos utilizando el método de difusión de vapor en gota sentada. Las gotas consistían en 1.5  $\mu\text{L}$  de muestra de proteína (10 mg/mL en amortiguador con 50mM de Tris-HCl y 150 mM de NaCl) y la solución del reservorio en una proporción 1:1. La solución del reservorio contenía 150  $\mu\text{L}$  de la solución Morpheus 1-17: 0.09M de halógenos (0.3M de NaF, 0.3M de NaBr y 0.3M de NaI), 0.1M del Sistema de Amortiguador 2 (1M HEPES; 1M MOPS), pH 7.5 50% v/v mix precipitante 1 (40% v/v PEG 500 MME y 20% p/v PEG 20000), los cristales observados tienen forma de barra y se obtuvieron a partir del día 3.

Los cristales de los complejos ligando/FABP4 se obtuvieron mediante remojo o "soaking" de cristales de FABP4 descritos en el párrafo anterior. Los experimentos de "soaking" o remojo consisten en lo siguiente. Los cristales de FABP4 fueron tomados de la gota donde crecieron y fueron traspasados con un asa o "loop" de resina de poliamida a gotas nuevas de 1.5  $\mu\text{L}$  de la solución madre adicionada con un coctel de ligandos (a una concentración final de 10mM) o ligandos individuales (concentración final de 10 mM). Se evaluaron los siguientes tiempos de incubación 10 min, 2 h y 8 h; las mezclas de compuestos se evaluaron únicamente con 10 min de incubación. Posteriormente, los cristales se montaron en "loops" de resina de poliamida (Molecular Dimensions) y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido, la solución madre es crioprotectora. Los ligandos evaluados aparecen en la Tabla 1.

#### *2.5 Experimentos de co-cristalización*

Se realizaron ensayos de co-cristalización para los compuestos 2, 4, 5 y 6. Los cristales de FABP4 fueron crecidos utilizando el método de difusión de vapor en gota sentada. Las gotas fueron de 3  $\mu\text{L}$ , con una relación 1:1 proteína-precipitante. Las gotas consistieron en: 1.5  $\mu\text{L}$  de muestra de una mezcla proteína-ligando en una relación 9:1, la concentración final de FABP4 fue de 12mg/mL en amortiguador 50mM de Tris-HCl y 150mM de NaCl, y la del ligando fue de 10mM en DMSO final

de 10%. Además de 1.5  $\mu\text{L}$  de la solución del reservorio (precipitante). La solución del reservorio contenía 150  $\mu\text{L}$  de la solución Morpheus 1-17.

### *2.6 Determinación de la estructura cristalográfica de FABP4 y FABP4/ibuprofeno.*

Las estructuras fueron resueltas por reemplazo molecular usando el programa Phaser, como modelo para el reemplazo molecular se utilizó el PDB 3RZY. Este modelo fue previamente modificado, se eliminaron residuos del N-terminal dejando como aminoácido inicial el residuo +4(Ala). El reemplazo molecular generó dos archivos que se utilizaron para el refinamiento: el mapa de densidad electrónica (.mtz) y el que contiene las coordenadas de los átomos (.pdb).

Las estructuras fueron refinadas usando PHENIX. Para cada átomo se refino la posición individual (XYZ), los factores B y la ocupación. Se utilizó la opción de refinamiento de "máxima verosimilitud (ML)". En los primeros ciclos se realizó un refinamiento de cuerpo rígido y un refinamiento de templado o "annealing refinement". En el primer refinamiento se generó el archivo con el mapa de densidad electrónica (data.mtz), el cual se utilizó en cada refinamiento. Posteriormente se procedió a refinar la estructura de manera manual con el programa Coot tomando los archivos resultantes del primer refinamiento uno de densidad electrónica (output.mtz) y el de las coordenadas (output.pdb). En este programa se corrigió errores como ubicaciones incorrectas de los aminoácidos con base a la densidad electrónica que se tenía. Asimismo, se añadieron moléculas de agua tomando como criterio un rango de distancia de puentes de hidrógeno de 2.6-3.2 angstroms. Se alternó el refinamiento manual en Coot así como por PHENIX iterativamente hasta conseguir a una relación  $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$  cercana a 0.2/0.25.

Después de agregar moléculas de agua, se modificaron los parámetros de refinamiento: se añadieron átomos de hidrógeno a la proteína para mejorar los factores R y la geometría del modelo, a la vez realizamos refinamiento TLS (Translation-Libration-Screw-rotation model), phenix de forma automática refinó los desplazamientos anisotrópicos para 7 grupos en los que la proteína fue segmentada. Adicionalmente, utilizamos los procedimientos automáticos de

phenix.refine para obtener factores  $R_{\text{free}}$  más bajos activando las opciones Optimize X-ray/stereochemistry weight (wxc) y Optimize X-ray/ADP weight (wxu) que determinan el peso de los datos experimentales para el ajuste de los átomos modelados. Finalmente, se realizó la validación de la estructura con la herramienta Molprobit.

Este procedimiento fue utilizado para ambas estructuras. Sin embargo, para la estructura con ibuprofeno, de forma adicional durante el refinamiento, se añadieron las coordenadas de los átomos de ibuprofeno tomando como referencia las coordenadas de la estructura del archivo PDB: 3P6H, luego de hacer una superposición de ambos archivos en Coot.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Expresión y purificación de FABP4.

La expresión de *FABP4* se realizó en la cepa BL21 (DE3) Star de *E. coli*. La inducción de la expresión se realizó con IPTG a una concentración de 0.4 mM por dos horas a 37°C una vez que alcanzó la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de 0.6. Antes de inducir la expresión, el tiempo de crecimiento que tomó alcanzar una  $DO$  ideal se prolongó 3 h más de lo que usualmente toma (2 horas), lo cual es consistente con la expresión basal elevada de *FABP4* que fue observada. Sin embargo, esto no influyó negativamente sobre la cantidad de proteína obtenida.

En la primera etapa de purificación que fue por afinidad a Níquel, la proteína eluyó en las concentraciones de 250mM de imidazol. En intercambio iónico la proteína eluyó a 4% de NaCl. Por último, en la cromatografía por filtración en gel la proteína eluyó en las fracciones 17 y 18 que corresponden al peso molecular del monómero (14.6 kDa); en la Fig. 1 se muestra el gel de cada paso de purificación. El rendimiento final fue de 7 mg/L de proteína.



### 3.2 Determinación de afinidades de unión a ligando.

La afinidad del ibuprofeno y de 20 compuestos naturales obtenidos de *Salvia amarissima* (Tabla 1) a FABP4 se estimó en ensayos de desplazamiento por competencia del fluoróforo 1,8-ANS. En este ensayo, primero se estima la concentración de 1,8-ANS necesaria para unirse y ocupar las regiones hidrofóbicas en FABP4. Al estar unido el reactivo en estas regiones emite fluorescencia al ser excitado a una longitud de onda de  $\sim 369 \text{ nm}^{30}$ . Una vez que se establece la concentración necesaria de 1,8-ANS, ésta se mantiene constante en todos los experimentos y se evalúa el desplazamiento de 1,8-ANS provocado por la unión del ligando, lo que a su vez produce un apagamiento de la señal de fluorescencia. A partir del análisis del apagamiento de la señal de fluorescencia se puede estimar la afinidad del ligando por FABP4. En nuestro caso estimamos únicamente el valor de  $IC_{50}$ .

Primero realizamos una curva de unión con 1-8 ANS, para comprobar que la unión fuera hiperbólica. El ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten nos permitió calcular una  $K_m$  de  $10.8 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , el sistema se satura a concentraciones de 1,8-ANS de  $100 \mu\text{M}$  o superiores (Fig. 2). Con base a esta información, se decidió trabajar en concentraciones saturantes de 1,8-ANS para los experimentos de desplazamiento por competencia con los compuestos de la tabla 1, lo cual corresponde a concentraciones de  $80$  a  $100 \mu\text{M}$  (10 veces el valor de la  $K_m$ ). La concentración final de FABP4 que se utilizó fue de  $2 \mu\text{M}$ . Trabajos previos demuestran que se puede utilizar en el intervalo de  $0.5 \mu\text{M}$  a  $10 \mu\text{M}^{18,20}$ . Luego, como experimento control, se evaluó la afinidad del ibuprofeno. El resultado se muestra en la Fig. 3 donde se observa la curva de desplazamiento de 1,8-ANS provocada por la unión de ibuprofeno a FABP4.

Posteriormente, se realizó un ensayo preliminar de desplazamiento por competencia con los 20 compuestos de la tabla I, lo que permitió identificar a los compuestos con mayor afinidad a FABP4, los cuales correspondieron a los compuestos: 2, 3, 4, y 5. Estos compuestos se evaluaron en experimentos por

triplicado. Las curvas de unión se muestran en la Figura 4 y los valores de  $IC_{50}$  calculados se muestran en la Tabla 2. Se puede observar que el compuesto 3 (Cirsiliol) presenta una afinidad mayor por FABP4 en comparación con el resto de los compuestos, mostrando un valor de  $IC_{50}$  de  $189.3 \pm 15.3 \mu M$ , esto también puede apreciarse en la Fig. 4B, en donde se observa en el eje de las X, que se requiere una menor concentración de este compuesto para desplazar 1,8-ANS por lo que la pendiente de la curva es más pronunciada que con el resto de los compuestos.

### *3.3 Cristales de los complejos FABP4/ligando y colección de datos de difracción.*

Se obtuvieron cristales en forma de barra con una longitud de 0.2 a 0.3 mm. Los cristales crecen a partir del tercer día de incubación una vez que inicia el experimento de gota sentada como se describe en la metodología. En la Fig. 5 se muestra un ejemplo de un cristal a los 4 meses.

En la tabla 3 se muestra un resumen de los cristales que fueron preparados y utilizados para experimentos de difracción de rayos-X, que incluyen a FABP4 sin ligando y a los cristales obtenidos por “soaking” con tiempos de incubación de 10 min, 2h y 8h. No probamos mezclas de compuestos en los cristales con tiempos de incubación de 2h y 8 h. En la tabla 4 se incluyen los cristales obtenidos por co-cristalización de FABP4 con los compuestos 2, 4, 5 y 6, individualmente. Los cristales obtenidos por este método presentaron forma de racimos de agujas, y su difracción está pendiente.

### *3.4 Determinación de la estructura cristalográfica de apo FABP4 y del complejo FABP4/ibuprofeno.*

Las estructuras cristalográficas resueltas corresponden a FABP4 sin ligando (apoproteína) y al complejo FABP4/ibuprofeno.

En el caso de la estructura de FABP4 sin ligando, la solución de reemplazo molecular mostró un valor logarítmico de verosimilitud (LLG) de 2162.4, con un valor para la función de traslación (TFZ, por sus siglas en inglés) de 41.3 y un valor para

la función de rotación de 7.1 (RFZ). El cristal pertenece al grupo espacial P21 21 2 y los parámetros de celda unitaria son:  $a=53.079 \text{ \AA}$ ,  $b=71.891 \text{ \AA}$  y  $c=31.581 \text{ \AA}$ ,  $\beta=90^\circ$  (Tabla 4). El valor  $R_{\text{work}}$  después del primer refinamiento fue de  $\sim 0.31$  y después de varios ciclos de refinamiento y reconstrucción del modelo con el programa COOT, se logró reducir a 0.2207 con un  $R_{\text{free}}$  de 0.2348. Se tiene 98.43% de ángulos de Ramachandran favorecidos, y un promedio del factor B de 16.4.

En el caso de la estructura del complejo FABP4/ibuprofeno, se obtuvo un LLG de 6608.548, un TFZ de 65.3 y un RFZ de 7.1. El grupo espacial del cristal fue P2 21 21. Los parámetros de celda unitaria fueron  $a=31.727 \text{ \AA}$ ,  $b=52.967 \text{ \AA}$  y  $c=71.606 \text{ \AA}$ ,  $\beta=90^\circ$ . El valor de  $R_{\text{work}}$  en el primer refinamiento fue de  $\sim 0.26$ , después de varios ciclos de refinamiento y reconstrucción del modelo de forma manual con COOT, el último valor obtenido de  $R_{\text{work}}$  fue de 0.2107 y el valor de  $R_{\text{free}}$  fue de 0.2254. Según los estadísticos de Ramachandran se tiene favorecido el 98.43%, y un promedio del factor B de 22.5.

Las estructuras presentan un plegamiento de tipo barril que cuenta con una cavidad interna, conformada por hebras beta antiparalelas y dos hélices alfa, que forman un motivo hélice-giro-hélice (Fig.6). En ambas estructuras, la región N-terminal a partir del aminoácido 1 hasta el aminoácido 14, se determinó muy bien, presentó factores B por debajo del promedio de ambas estructuras (16.4 FABP4 sin ligando y 22.5 para FABP/Ibuprofeno), lo mismo se observó con la región C-terminal a partir del aminoácido 122 en adelante. No hubo regiones en particular con un factor B alto, sino que aminoácidos de cadena larga tuvieron factores B muy por encima del promedio. En ambas estructuras fueron Met35, Lys37, Lys79 y Glu109, que presentaron factores B de 4 a 10 veces el promedio que corresponde a cada estructura, y el aminoácido Lys112 de la estructura sin ligando. Las cadenas laterales que no mostraron densidad electrónica y que no pudieron ser modeladas fueron: Asp2, Lys31 y Lys107 en la estructura FABP4 sin ligando y Lys107, Lys112 y Lys120, en la estructura de FABP4 con ibuprofeno. Por último y como parte del proceso de validación, en ambas estructuras se obtuvo un valor del percentil de 99<sup>th</sup> (molprobit score), mediante el programa Molprobit. Además, de acuerdo con los

resultados del refinamiento final en Phenix, el puntaje de choques estéricos (número de contactos con distancias intramoleculares  $\geq 0.4 \text{ \AA}$  por cada 1000 átomos) de ambas estructuras fue relativamente bajo, la estructura de FABP4 sin ligando presentó un puntaje de 1.96 y la estructura de FABP4/ibuprofeno tuvo un puntaje de 2.48 (Ver Tabla 5).

En la figura 7 se muestra la estructura de FABP4 con ibuprofeno unido en la cavidad de la proteína, cercano al sitio donde se encuentran las hélices alfa, y se destacan las cadenas laterales de los residuos con los que interacciona: Phe16, Met20, Asp76, Ile104, Val115, Arg126, y Tyr128. Las interacciones son tanto hidrofóbicas (líneas punteadas) como puentes de hidrógeno (líneas continuas azules). Los residuos que participan en la formación de puentes de hidrógeno son Arg126 y Tyr128, ambos interaccionan con el oxígeno 1 del ibuprofeno, con Arg126 se forman enlaces de  $2.68 \text{ \AA}$  y  $3.37 \text{ \AA}$  de distancia, y con Tyr28 un enlace de  $2.71 \text{ \AA}$  de distancia. En la figura 7 también se muestra un puente de hidrógeno de  $2.92 \text{ \AA}$  de distancia entre el oxígeno 2 del ibuprofeno y una molécula de agua cercana que a su vez interactúa con los residuos Met40, Ser53 y Tyr128.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Determinación de afinidades de unión a ligando.

Las afinidades de unión a ligandos de ibuprofeno y los compuestos 2, 3, 4 y 5 de *S. amarissima* fueron determinados a través del ensayo de desplazamiento de 1-8 ANS por competencia (Tabla 2). Anteriormente, otro grupo reportó la constante de disociación del ligando de ibuprofeno ( $K_i$ ), por lo tanto, decidimos usarlo como control positivo para estandarizar el método<sup>24</sup>. Nosotros obtuvimos una concentración del competidor necesaria para una inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ) de  $159 \pm 37.7 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ , el valor que obtuvimos no es idéntico al reportado, pero, es muy

similar, por lo que logramos estandarizar la prueba con éxito. El grupo de González y colaboradores fue el que reportó la constante de disociación de ibuprofeno, que probó su unión a la proteína FABP4 humana. Ellos analizaron por cristalografía a un grupo de moléculas pequeñas relacionadas estructuralmente a este fármaco antiinflamatorio no esteroideo, en donde S-ibuprofeno mostró la afinidad más alta ( $94.9 \pm 5.9 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ) con respecto a los otros compuestos: L2 [ácido 3- (4-metoxi-3-metilfenil) propiónico], L3 [ácido 3- (4- metoxifenil) propiónico], L4 (ácido S-3-fenilbutírico), L5 (R-ibuprofeno) y L6 (S -ibuprofeno) por lo que nosotros esperábamos obtener una afinidad alta con ibuprofeno<sup>24</sup>.

En este trabajo, se reporta por primera vez la afinidad de los compuestos naturales de *S. amarissima* a FABP4. En la tabla 2 se muestran las afinidades de los compuestos 2, 3, 4 y 5, de éstos el que mostró mayor afinidad fue el compuesto 3 (Cirsiliol) que presentó un  $\text{IC}_{50}$  de  $189.3 \pm 15.3 \mu\text{M}$ . Sin embargo, podemos observar que, no son tan afines como los inhibidores de la tabla S1, que presentan un  $K_i$  o  $\text{IC}_{50}$  en intervalo nanomolar, es decir, tres órdenes de magnitud más afines a FABP4, aunque, esto era algo esperado ya que los compuestos reportados en la base de datos Protein Data Bank sufrieron modificaciones químicas estructurales para mejorar su unión a FABP4. Uno de los objetivos del proyecto fue obtener compuestos guía, es decir, compuestos que sirvan como punto de partida generar nuevos compuestos optimizados que posean las cualidades de un fármaco seguro y eficaz. En este sentido, los compuestos 2, 3, 4, y 5 se pueden considerar como potenciales compuestos guía. Se ha reportado que los compuestos guía pueden presentar constantes de afinidad en el intervalo milimolar. Por ejemplo, Bauman y colaboradores en 2013 seleccionaron un compuesto para posteriormente optimizarlo hasta llegar a uno que tuviera actividad inhibitoria contra el virus de Influenza H1N1. El fin de la optimización del compuesto fue obtener interacciones con el dominio endonucleasa de la enzima polimerasa del virus, esto lo podían estudiar mediante cristalografía de rayos-X. Así que, a partir del compuesto 1 cuya actividad inhibitoria fue de 1mM ( $\text{IC}_{50}$ ), surgió una serie de compuestos que contaban con modificaciones químicas (por ejemplo, sustituciones), hasta llegar al

compuesto 7, el cual alcanzó una actividad inhibitoria de 11 $\mu$ M (IC<sub>50</sub>), y pudo demostrar su efecto antiviral y poca toxicidad<sup>31</sup>.

Anteriormente se han reportado inhibidores a FABP4, en estos trabajos presentan la constante de afinidad de unión (IC<sub>50</sub> o K<sub>i</sub>) y la estructura cristalográfica que prueban la unión y los sitios de la proteína a los que se une el ligando. En la tabla S2 mostramos un resumen de los 22 ligandos reportados en Protein Data Bank. Aunque la estructura de los 20 compuestos que seleccionamos de *S. amarissima* comparten características con los ligandos reportados, no todos los compuestos presentaron unión, únicamente los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 16. Algunos de ellos con un valor de IC<sub>50</sub> sumamente pobre por lo que los mejores fueron los compuestos 2, 3, 4 y 5. Sin embargo, estos compuestos (2, 3, 4 y 5) presentan una afinidad a FABP4 considerablemente menor a la de los ligandos reportados de la tabla S2, aun así, se pueden utilizar como puntos de partida para el diseño de fármacos y la selección de nuevos compuestos, cuyo objetivo principal es encontrar sitios de unión diferentes a los ya reportados que permitan el diseño de compuestos nuevos.

#### *4.2 Cristales de los complejos FABP4/ligando.*

El primer método que seleccionamos para obtener cristales de FABP4 en complejo con los ligandos fue el método de "soaking". Este método consiste en la incubación de cristales de la apoproteína con el ligando de interés y se basa en que los cristales presentan poros llenos de disolvente (20–100 Å), que proporcionan un buen acceso para ligandos pequeños los cuales difunden a través de estos canales e interaccionan con la proteína<sup>31</sup>.

Durante la estandarización de los experimentos de "soaking" decidimos utilizar como control positivo al ibuprofeno, pues ha sido utilizado con éxito en experimentos de este tipo con FABP4. El tiempo que probamos con base a lo reportado por González y colaboradores fue de 10 minutos<sup>24</sup>. Sin embargo, observamos que la densidad electrónica no cubrió por completo la molécula de

ibuprofeno, es decir, no obtuvimos una ocupación del 100%, (Fig. S1)<sup>29</sup>. Es muy probable que la baja ocupación se deba a que el tiempo del experimento de “soaking” fue muy corto<sup>32</sup>. Se ha reportado que al menos el 25-30% de los sitios de unión deben estar ocupados para que la densidad del ligando sea interpretable en mapas de densidad electrónica. No obstante, alcanzar este nivel de ocupación con experimentos de “soaking”, depende de la naturaleza de los canales de solvente dentro de la red cristalina y de otras consideraciones, por lo que el tiempo de incubación puede variar de minutos a días.<sup>32</sup>

Con el tiempo de incubación a 8 h pudimos observar al ibuprofeno en su totalidad, es decir, con una ocupación del 100%, aunque, no ocurrió así con los compuestos naturales. Esto puede deberse al tamaño relativo de los poros y del ligando, en este caso el peso molecular de los compuestos 2, 4, 5 (~330g/mol) y 6 (~270g/mol), es superior al del ibuprofeno (~206g/mol).<sup>29,33</sup> Por lo tanto, los cristales son aptos para experimentos de "soaking" con la condición de que sean compuestos de tamaño similar o inferior al del ibuprofeno. Con base a esta observación, esperamos encontrar al 4-bromo y 4-iodo pirazoles en los datos de cristales incubados a 8 horas (sus pesos moleculares son ~147g/mol y ~194g/mol, respectivamente).

En vista de que no pudimos observar los compuestos naturales con el método de “soaking”, optamos como alternativa realizar experimentos de co-cristalización. Cuando se realizó la co-cristalización de FABP4 con los ligandos naturales seleccionados (2, 4, 5 y 6), los cristales presentaron formas distintas a las de la apoproteína, en lugar de barras individuales se formaron racimos de agujas. Probablemente se deba a cambios menores en la superficie de la proteína ya que un cambio mínimo puede tener efectos importantes en la red cristalina<sup>32</sup>. Sin embargo, no podemos afirmar que el ensayo de co-cristalización fue exitoso porque aún falta difractar los cristales.

#### *4.3 Determinación de la estructura cristalográfica de FABP4 y FABP4/ibuprofeno.*

Se resolvieron dos estructuras: FABP4 con ligando (ibuprofeno) y FABP4 sin ligando (apoproteína). Con base a los criterios del programa Phaser, el reemplazo molecular fue exitoso en ambas estructuras, dado que el valor de TFZ fue superior a 8 (FABP4: 41.3 y FABP4-Ibuprofeno: 65.3) y el valor de LLG fue superior a 120 (FABP4:2162.440 y FABP4 -Ibuprofeno: 6608.548) y el valor de RFZ fue de 7.1 en ambas estructuras, es decir, lo suficientemente alta ( $> 7$ ) para indicar una rotación precisa.

Los valores de  $R_{\text{work}}$  y  $R_{\text{free}}$  de las estructuras con o sin ligando, se encuentran muy cercanos entre sí, en FABP4 sin ligando el  $R_{\text{work}}$  de 0.2207 y el  $R_{\text{free}}$  es de 0.2348, en la estructura con ibuprofeno el  $R_{\text{free}}$  es de 0.2255 y el  $R_{\text{work}}$  es de 0.2106, no rebasa la diferencia permitida, la cual de forma ideal debe ser menor al 5%.<sup>29</sup> Después de construir y refinar el modelo de proteína, se puede interpretar la densidad adicional que suele deberse a moléculas de agua presentes y conforme se agregaron moléculas de agua con el programa Coot, el valor de  $R_{\text{free}}$  y  $R_{\text{work}}$  fue disminuyendo, es decir, el modelo fue mejorando. Los datos estadísticos de Ramachandran nos demuestran la validez de los modelos, la cual es buena ya que se tiene en ambos modelos un valor de 98.4% favorable, es decir, no hay cadenas mal posicionadas, el resto de los datos que confirman su validación se encuentran en la Tabla 5.

La adición de hidrógenos mejoró la geometría general del modelo y combinado con el refinamiento por 7 grupos TLS, los cuales se determinaron de forma automática. El promedio del factor B que presentaron las estructuras fue de 16.4 Å<sup>2</sup> para la estructura sin ligando y de 22.5 Å<sup>2</sup> para la que tiene ibuprofeno. Aunque, de forma global el promedio del factor B en ambas estructuras es adecuado, para su resolución según los valores B máximos determinados en un estudio realizado por Carugo en 2019. En este estudio, reportan que en una estructura con alta resolución (menor a 1.5 Å), el valor máximo de B es 25 Å<sup>2</sup>, y en una estructura de resolución de 1.5-1.8, el valor B máximo es de 31 Å<sup>2</sup>.<sup>34</sup> Las estructuras de FABP4 y FABP4/ibuprofeno tienen resoluciones de ~1.4 Å, y ~1.6 Å,



respectivamente. Por lo que nuestros datos concuerdan con lo observado por Carugo.

De acuerdo con los parámetros de Phenix, el puntaje de choques estéricos debería ser lo más bajo posible, aunque un valor de cero es inusual. Nosotros obtuvimos 1.96 y 2.48 para FABP4 sin ligando y con ibuprofeno, respectivamente, según los criterios clave sugeridos por el Grupo de trabajo de validación de rayos-X del PDB mundial (VTF, por sus siglas en inglés), un puntaje de choque ideal debe ser menor a 5, en estructuras de muy alta resolución con un factor B bajo <sup>35</sup>.

En resumen, con base a los estadísticos del refinamiento, (Ramachandran, factores B y choques estéricos) en ambas estructuras, el modelo es realista y con base al  $R_{\text{free}}$  hay un buen ajuste a los datos experimentales y con respecto a la relación de los valores  $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$  no hay sesgo en el modelo. Sin embargo, dado que las resoluciones de estas estructuras son altas, todos estos valores aún pueden mejorarse<sup>36</sup>. Finalmente, al realizar la validación de ambas estructuras en Molprobit, se obtuvo un valor del percentil de “molprobit score” de 99<sup>th</sup>, lo que nos dice que la estereoquímica de ambos modelos es buena, dado que el valor de 100<sup>th</sup> representa el mejor percentil entre estructuras de resolución comparable.

Una vez que las estructuras fueron refinadas y validadas, realizamos una superposición de ambas para observar si hay cambios en la estructura provocados por la unión de ibuprofeno a FABP4. Como resultado, se obtuvo un valor de distancia media cuadrática o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 0.233 angstroms, lo que indica que tienen gran similitud, basados en el hecho de que un valor de 0 angstroms indica que se trata de conformaciones totalmente idénticas <sup>37</sup>. Por lo tanto, podemos decir que, a nivel de la conformación de la cadena principal, son prácticamente idénticas. Sin embargo, observamos pequeños cambios locales a nivel de las cadenas laterales de los residuos Glu14, Met35, Lys58, Asp77, donde observamos rotámeros diferentes entre ambas estructuras, estos residuos se encuentran en el exterior de la proteína. Por otro lado, no observamos un cambio en los rotámeros de las cadenas laterales de los residuos que están implicados en la interacción con ibuprofeno (Phe16, Met20, Asp76, Val115, Arg127 y Tyr128). Sin

embargo, se puede apreciar una diferencia mínima entre las cadenas laterales de ambas estructuras, ya que no se empalman totalmente cuando son sobrepuestas (Fig. 6).

Por otro lado, al estudiar los sitios de unión de ibuprofeno observamos que, este al igual que los ligandos reportados en la tabla S2, presentan frecuentemente interacciones en los mismos sitios que el ligando natural, ácido palmítico: Phe16, Met20, Asp76, Ile104, Arg126, y Tyr128, que como se muestra en la figura 7 estos residuos se encuentran dentro de la cavidad de FABP4, el único residuo con el que no interacciona ácido palmítico, pero ibuprofeno sí, es Val115.

También podemos observar en la Fig. S2 que algunos de estos residuos como Arg126 y Tyr128 (señalados con flechas azules) están conservados también en otros miembros de la familia de FABP presentes en humanos, en esta figura se muestra un alineamiento de estas proteínas. En la figura S2 se indica con un número sobre el alineamiento, la cantidad de ligandos que se unen al residuo correspondiente, con asteriscos rojos se señalan los residuos de unión del ligando natural y con estrellas negras los sitios de unión del ibuprofeno. Incluso podemos observar que entre los ligandos reportados en Protein Data Bank, los sitios de unión tienden a ser los mismos, no hay sitios aparentemente nuevos.

A pesar de que realizamos ensayos de co-cristalización con los compuestos naturales 2, 4, 5 y 6, y obtuvimos cristales, no presentamos aún las estructuras cristalográficas resueltas y, por lo tanto, el análisis de las interacciones a FABP4. Aunque éstos compuestos son de gran interés porque pueden ser potenciales inhibidores o incluso dar información de sitios nuevos de unión a FABP4. Tampoco se presentaron los datos de los cristales de FABP4-4-Bromopirazol y FABP4-4-Iodopirazol a pesar de que también se incluyeron en los ensayos de cristalización. Se espera que en un futuro puedan ser analizados, ya que son importantes para el cribado cristalográfico. Estas moléculas de tamaño pequeño normalmente se unen en el intervalo micromolar a milimolar y esta unión a menudo es de alta calidad.<sup>38,39</sup>. Esto dará ventaja de poder identificar “cavidades ocultas” (hidden pockets) que no son fácilmente observables en la forma no ligada de la proteína. Un claro ejemplo

es el caso del trabajo de Bauman y colaboradores en 2016, reportaron que el compuesto 4-bromo-pirazol es capaz de unirse a muchos de los "Hot spots" en la transcriptasa inversa (RT) del VIH-1, y también se descubrió el potencial de 4-iodo-pirazol en la unión de "Hot spots" en proteinasa K. <sup>27</sup>

## 5. CONCLUSIONES

El procedimiento de expresión y purificación utilizados nos brindan buen rendimiento de proteína (7mg/L). Se logró optimizar y realizar ensayos de desplazamiento por competencia con 1,8-ANS, que permitieron determinar la concentración necesaria para obtener una inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) para cada uno de los compuestos. Cabe mencionar que esta es la primera vez que se estudian como inhibidores de FABP4, a compuestos provenientes de la planta *S. amarissima*. De 20 compuestos probados provenientes de esta planta, el compuesto 3 (Cirsiliol) mostró mayor afinidad a FABP4 (IC<sub>50</sub>:189.3 ± 15.3 μM) que el resto. Se optimizaron las condiciones de cristalización de FABP4 y se logró producir cristales adecuados para experimentos de difracción de rayos-X que difractan a alta resolución, en un intervalo de 1.4 a 1.6 Å. Los cristales de la apo proteína FABP4 son adecuados para ensayos de "soaking" con moléculas con un peso ≤206 g/mol. Los ensayos de co-cristalización fueron óptimos para obtener complejos de FABP4 con compuestos de mayor peso molecular. Se adquirieron datos de difracción de los complejos FABP4/4-iodopirazol y FABP4/4-bromopirazo, el análisis de su afinidad a FABP4 está pendiente, así como la determinación de su estructura. Este trabajo sentó las bases metodológicas para encontrar compuestos guía en el diseño de un fármaco altamente selectivo y con gran afinidad a FABP4, con posible uso terapéutico.

## REFERENCIAS

1. Zhang, Y. *et al.* Epidermal Fatty Acid Binding Protein Promotes Skin Inflammation Induced by High-Fat Diet. *Immunity* **42**, 953–964 (2015).
2. Morrison, M. C. & Kleemann, R. Role of macrophage migration inhibitory factor in obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, and associated hepatic co-morbidities: A comprehensive review of human and rodent studies. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
3. Xu, A. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Chem.* **52**, 405–413 (2006).
4. Wu, L. E. *et al.* Identification of fatty acid binding protein 4 as an adipokine that regulates insulin secretion during obesity. *Mol. Metab.* **3**, 465–473 (2014).
5. Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J. A., Fernández, S. & Rodríguez, A. *Regulation of adipocyte lipolysis. Nutrition Research Reviews* **27**, (2014).
6. Tso, A. W. K. *et al.* Serum adipocyte fatty acid-binding protein associated with ischemic stroke and early death. *Neurology* **76**, 1968–1975 (2011).
7. Alvite, G., Garrido, N., Kun, A., Paulino, M. & Esteves, A. Towards an understanding of *Mesocestoides vogae* fatty acid binding proteins' roles. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
8. Furuhashi, M. *et al.* Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* **447**, 959–965 (2007).
9. Lehmann, F. *et al.* Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 4445–4448 (2004).
10. Tagami, U. *et al.* Interaction Analysis of FABP4 Inhibitors by X-ray Crystallography and Fragment Molecular Orbital Analysis. *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 435–439 (2016).
11. Burak, M. F. *et al.* Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
12. Makowski, L. & Hotamisligil, G. S. Fatty Acid Binding Proteins—The Evolutionary Crossroads of Inflammatory and Metabolic Responses. *J. Nutr.* **134**, 2464S–2468S (2004).

13. Kyrou, I., Tsigos, C., Unit, D. & Hospital, E. Stress Mechanisms and Metabolic Complications. *Horm Metab Res* **39**, 430–438 (2007).
14. Prentice, K. J., Saksi, J. & Hotamisligil, G. S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses. *J. Lipid Res.* **60**, 734–740 (2019).
15. Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F. & Garvey, W. T. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* **165**, 259–269 (2002).
16. Makowski, L., Boord, J. B., Maeda, K., Babaev, V. R. & Teoman, K. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med.* **7**, 699–705 (2001).
17. Hotamisligil, G. S. *et al.* Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* (80-. ). **274**, 1377–1379 (1996).
18. Sulsky, R. *et al.* Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **17**, 3511–3515 (2007).
19. Barf, T. *et al.* N-Benzyl-indolo carboxylic acids: Design and synthesis of potent and selective adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 1745–1748 (2009).
20. Cai, H. *et al.* Novel fatty acid binding protein 4 (FABP4) inhibitors: Virtual screening, synthesis and crystal structure determination. *Eur. J. Med. Chem.* **90**, 241–250 (2015).
21. Kuhn, B. *et al.* A Real-World Perspective on Molecular Design. *J. Med. Chem.* **59**, 4087–4102 (2016).
22. Kühne, H. *et al.* Design and synthesis of selective, dual fatty acid binding protein 4 and 5 inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **26**, 5092–5097 (2016).
23. Venkatachalam, A. B., Fontenot, Q., Farrara, A. & Wright, J. M. Fatty acid-binding protein genes of the ancient, air-breathing, ray-finned fish, spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* **25**, 19–25 (2018).
24. González, J. M. & Fisher, S. Z. Structural analysis of ibuprofen binding to human adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4). *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* **71**, 163–170 (2015).
25. Liu, Y. Q. *et al.* Silencing of FABP3 leads to apoptosis-induced mitochondrial dysfunction and stimulates Wnt signaling in zebrafish. *Mol. Med. Rep.* **8**, 806–812 (2013).
26. Binas, B., Danneberg, H., Mcwhir, J., Mullins, L. & Clark, A. J. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization.

- FASEB J.* **13**, 805–812 (1999).
27. Bauman, J. D., Harrison, J. J. E. K. & Arnold, E. Rapid experimental SAD phasing and hot-spot identification with halogenated fragments. *IUCrJ* **3**, 51–60 (2016).
  28. Velkov, T. *et al.* The interaction of lipophilic drugs with intestinal fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 17769–17776 (2005).
  29. Tammy, N., Singh, N. & McCurdy, C. R. X-Ray Crystallography in Drug Discovery. in *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery* (ed. Roque, A. C. A.) **572**, 31-56,297 (Humana Press, Totowa, NJ, 2010).
  30. Kane, C. D. & Bernlohr, D. A. A simple assay for intracellular lipid-binding proteins using displacement of 1-anilinonaphthalene 8-sulfonic acid. *Anal. Biochem.* **233**, 197–204 (1996).
  31. Bauman, J. D. *et al.* Crystallographic Fragment Screening and Structure-Based Optimization Yields a New Class of Influenza Endonuclease Inhibitors. *ACS Chem Biol.* **8**, 2501–2508 (2013).
  32. Danley, D. E. Crystallization to obtain protein – ligand complexes for structure-aided drug design. in 569–575 (International Union of Crystallography, 2006). doi:10.1107/S0907444906012601
  33. Drenth, J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography.* (Springer Science+Business Media, LLC, 2007).
  34. Carugo, O. Maximal B-factors in protein crystal structures. *Zeitschrift fur Krist. - Cryst. Mater.* **234**, 73–77 (2019).
  35. Read, R. J. *et al.* A new generation of crystallographic validation tools for the Protein Data Bank. *Structure* **19**, 1395–1412 (2011).
  36. Headd, J. J. *et al.* Use of knowledge-based restraints in phenix.refine to improve macromolecular refinement at low resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 381–390 (2012).
  37. Damm, K. L. & Carlson, H. A. Gaussian-Weighted RMSD Superposition of Proteins : A Structural Comparison for Flexible Proteins and Predicted Protein Structures. *Biophys. J.* **90**, 4558–4573 (2006).
  38. Bauman, J. D. *et al.* Detecting allosteric sites of HIV-1 reverse transcriptase by X-ray crystallographic fragment screening. *J. Med. Chem.* **56**, 2738–2746 (2013).
  39. Huschmann, F. U. *et al.* Structures of endothiapepsin-fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library. *Acta Crystallogr. Sect. FStructural Biol. Commun.* **72**, 346–355 (2016).

**Tabla 1. Compuestos naturales de la planta *Salvia amarissima*.**

Mezclas	Tipo	#	Nombre	PM
			<b>Compuesto</b>	
A	Flavonoide	6	Apigenina	270.2369
	Terpenoide	8	Galfimina E (mayoritario) + Galfimina G	574.7022
	Terpenoide	10	Linearolactone	340.3698
	Terpenoide	15	Amarissinin C	374.3845
B	Flavonoide	2	Nuchensin	330.2889
	Flavonoide	4	5,6-dihidroxi-7,3' Trimethoxyflavone	344.3154
	Terpenoide	11	Polystachyne B	358.3851
	Terpenoide	17	Amarisolide F	594.5612
C	Flavonoide	3	Cirsiliol	330.2889
	Terpenoide	7	Galfimina D + Galfimina I (mayoritario)	574.7022
	Terpenoide	13	Salvifilina A/15 Epi Salvifilina A	374.3845
	Terpenoide	19	4-O-Acetyamarissinin C	416.4212
D	Flavonoide	5	5,6,3'- trihidroxi-7,4'- dimethoxyflavone	330.2889
	Terpenoide	9	Galfimina B (mayoritario)	516.6662
	Terpenoide	12	Polystachyne A	342.3857
	Terpenoide	16	Amarissinin A	370.3527
E	Flavonoide	1	Eupatorina	344.3154
	Terpenoide	14	Salvifilina C/15 Epi Salvifilina C	374.3845
	-	18	8-OH Salurarin	358.3851
	Terpenoide	20	Acetil-amarissinin B	398.4059

**Tabla 2. Concentración del inhibidor que produce una inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) de compuestos en ensayo de desplazamiento de unión de ligandos con 1,8-ANS**

	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
<b>Ibuprofeno</b>	159 ± 37.7 x10 <sup>-3</sup>
<b>Compuesto 2</b>	362.0 ± 119.3
<b>Compuesto 3</b>	189.3 ± 15.3
<b>Compuesto 4</b>	250.0 ± 12.4
<b>Compuesto 5</b>	611.1 ± 408.2



**Tabla 3. Cristales obtenidos con métodos de “soaking”.**

Cristal	Ligando	Tiempo de incubación			Procesados
		10 min Resolución	2 horas Resolución	8 horas Resolución	
FABP4-IBU	ibuprofeno	1.58	ND	1.62	0.2106/0.2255 (R/R <sub>free</sub> )
FABP4-B	4-bromopirazol	1.3	ND	1.52	por procesar
FABP4-I	4-iodopirazol	1.7	ND	1.48	por procesar
FABP4-C2	Nuchensin	NA	ND	1.58	NA
FABP4-C4	5,6-dihidroxi-7,3' Trimethoxyflavone	NA	ND	1.65	NA
FABP4-C5	5,6,3'- trihidroxi-7,4'-dimethoxyflavone	NA	1.6	2.13	NA
FABP4-C6	Apigenina	NA	1.79	1.87	NA
FABP4-Mezcla A:	Apigenina; Galfinina+Galfinina G; Linearolactone; Amarissinin C	1.4	NA	NA	NA
FABP4-Mezcla B:	Nuchensin; 5,6-dihidroxi-7,3' Trimethoxyflavone;Polystachyne B; Amarisolide F	1.6	NA	NA	NA
FABP4-Mezcla C:	Cirsilioi; Galfinina D+ Galfinina I; Salvifilina A/15 Epu Salvifilina A; 4-O- Acetyamarissinin C	1.4	NA	NA	NA
FABP4-Mezcla D:	5,6,3'- trihidroxi-7,4'-dimethoxyflavone; Galfinina B; Polystachyne; Amarissinin A	1.4	NA	NA	NA
FABP4-Mezcla E:	Eupatorina; Salvifilina C/15 Epi Salvifilina C; 8-OH Salurarin; Acetil-amarissinin B	1.5	NA	NA	NA

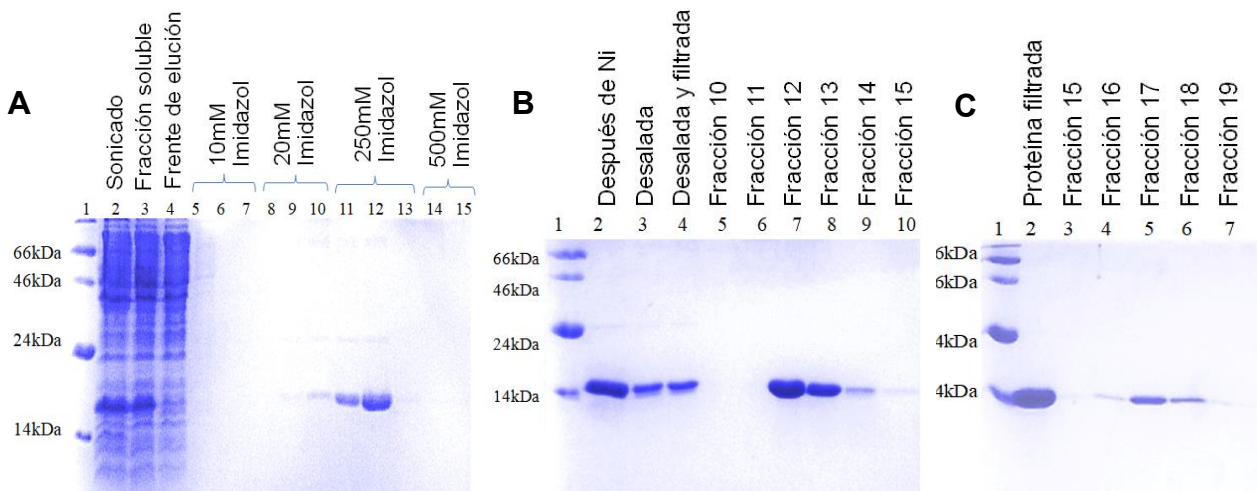
**Tabla 4. Cristales obtenidos mediante co-cristalización.**

<b>Cristal</b>	<b>Ligando</b>	<b>Peso molecular (PM)</b>
FABP4-Compuesto 2	Nuchensin	330.2889
FABP4-Compuesto 4	5,6-dihidroxi-7,3'-Trimethoxyflavone	344.3154
FABP4-Compuesto 5	5,6,3'- trihidroxi-7,4'-dimethoxyflavone	330.2889
FABP4-Compuesto 6	Apigenina	270.2369

*\*Está pendiente la difracción*

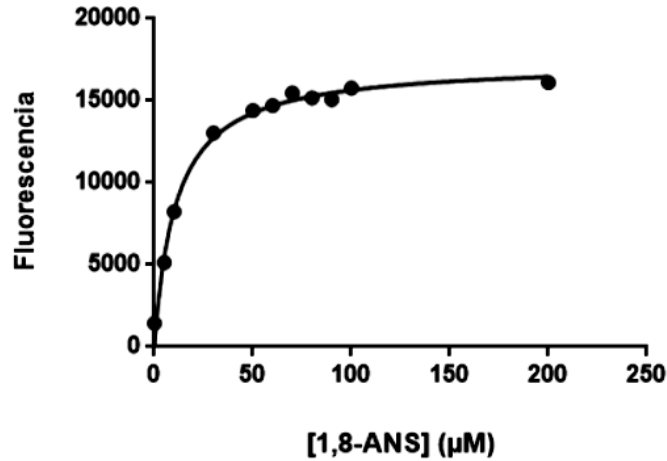
**Tabla 5. Estadísticas de refinamiento de los datos de la difracción de rayos-X de los cristales de FABP4**

	<b>FABP4</b>	<b>FABP4-IBUPROFENO</b>
Recopilación de datos		
Grupo espacial	<b>P 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2</b>	<b>P 2 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub></b>
Intervalo de resolución	31.58-1.385 (1.435 - <b>1.385</b> )	31.73-1.618 (1.676- <b>1.618</b> )
Completo (%)	99.15 (93.21)	99.90 (99.68)
Parámetros de celda unitaria		
a,b,c (Å)	53.079, 71.891, 31.581	31.727, 52.967, 71.606
$\alpha,\beta,\gamma$	90, 90, 90	90, 90, 90
Refinamiento		
<b><math>R_{work}</math></b>	<b>0.2207 (0.3082)</b>	<b>0.2106 (0.2427)</b>
<b><math>R_{free}</math></b>	<b>0.2348 (0.3675)</b>	<b>0.2255 (0.2298)</b>
Factor B promedio(Å <sup>2</sup> )	16.40	22.50
Proteína	16.18	22.09
Ligando	-	40.23
Solvente	19.47	25.65
Estadísticas de Ramachandran		
Ramachandran favorecido (%)	98.45	98.43
Ramachandran permitidos (%)	1.55	1.57
Ramachandran atípicos (%)	0.00	0.00
Rotameros atípicos (%)	0.00	0.00
Puntaje de choque	1.96	2.48
r.m.s.d para geometría ideal		
Enlaces (Å)	0.005	0.008
Ángulos (°)	0.75	0.81



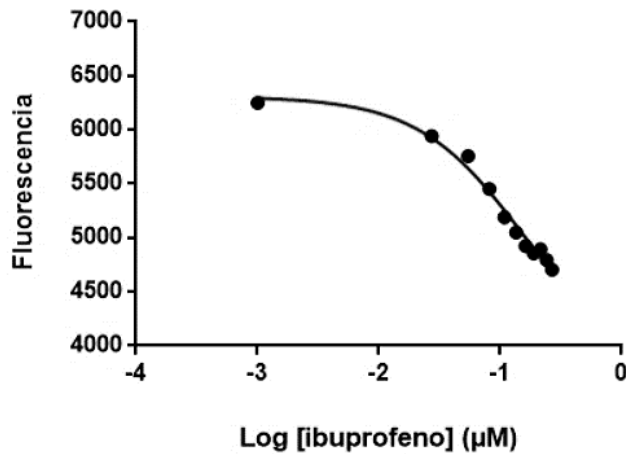
**Fig. 1. Purificación FABP4**

Se muestran los pasos de purificación de FABP4, **A) Purificación por afinidad a Níquel.** **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Muestra de proteína después de sonicar. **Carril 3.** Fracción soluble después de la centrifugación. **Carril 4.** Frente de la elución. **Carril 5-7.** Fracciones de elución con 10mM de imidazol. **Carril 8-10.** Fracciones de elución con 20mM de imidazol. **Carril 11-13.** Fracciones de elución con 250mM de imidazol, la banda de los carriles 11 y 12 son la proteína FABP4. **Carril 14 y 15.** Fracciones de elución con 500mM de imidazol. **B) Purificación por intercambio iónico.** **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Proteína resultante de la purificación por afinidad a Níquel después de retirar la etiqueta de histidinas con PPS. **Carril 3.** Proteína después de desalar. **Carril 4.** Proteína desalada y filtrada. **Carril 5-10.** Fracciones colectadas durante la elución, la proteína eluyó a 4% de NaCl 1M, FABP4 se colectó en las fracciones 12 y 13 que se encuentra en los carriles 7 y 8. **C) Purificación por exclusión molecular.** **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Proteína filtrada. **Carril 3-7.** Fracciones de elución, la proteína se colectó en las fracciones 17 y 18 (carril 5 y 6) que corresponden al peso del monómero de FABP4.



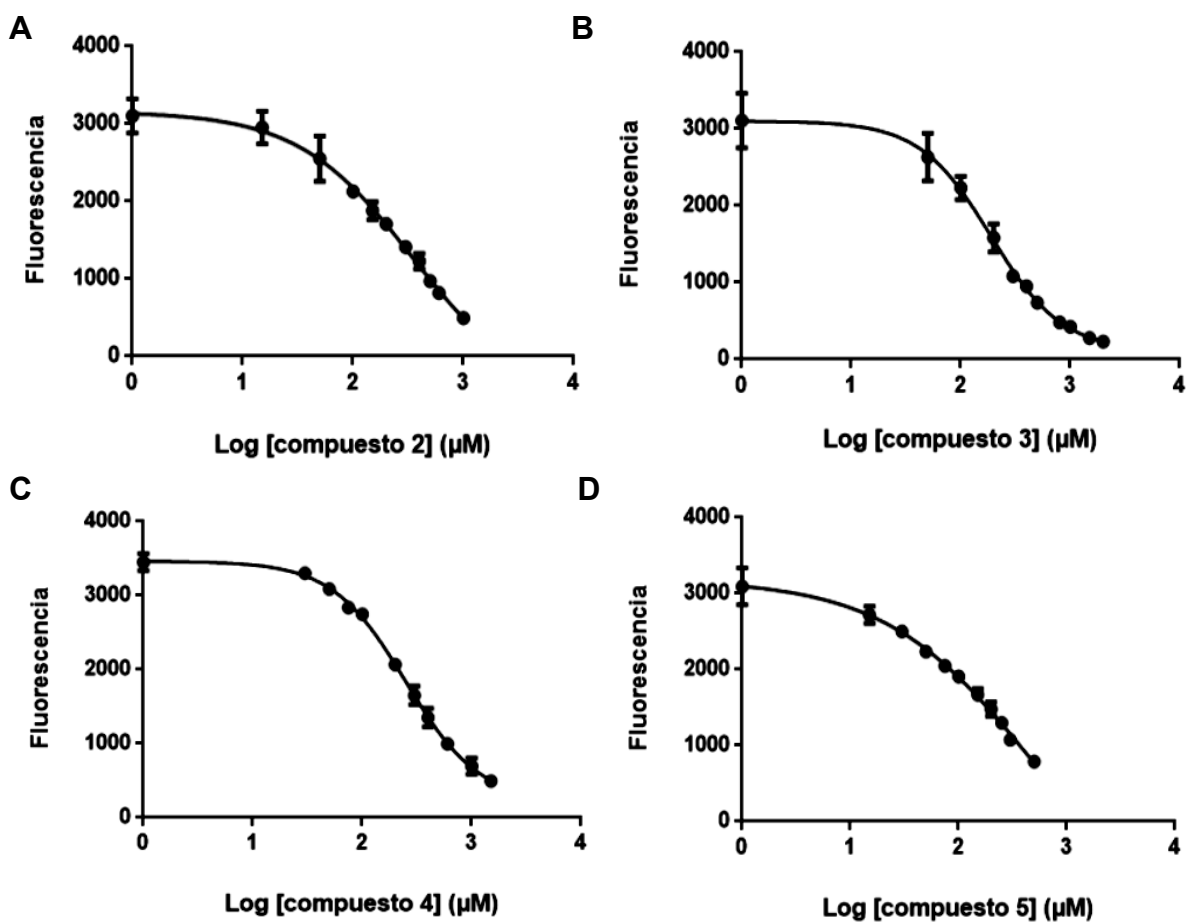
**Fig. 2. Unión de 1,8-ANS a FABP4**

Gráfico de Michaelis-Menten, donde se muestra que la unión de las moléculas de 1,8-ANS a FABP4 se comporta de forma hiperbólica. La proteína se satura a una concentración de 100μM de 1,8-ANS. Es decir, las moléculas de 1,8-ANS se encuentran unidas a la mayor parte de las regiones disponibles de las moléculas de proteína FABP4.



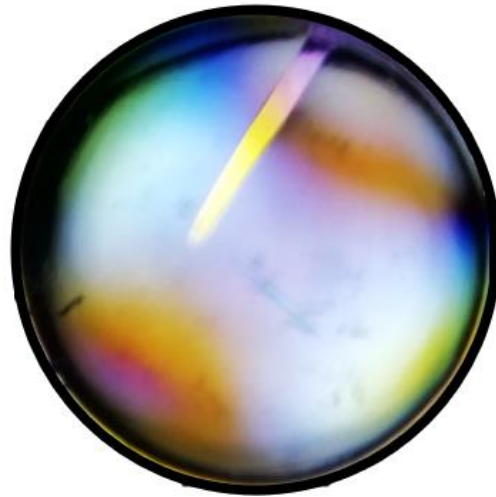
**Fig. 3. Curva concentración-respuesta de Ibuprofeno (control)**

Se muestra graficado el logaritmo de las concentraciones para ibuprofeno contra la señal de fluorescencia (respuesta). Se prueban diferentes concentraciones de ibuprofeno que van de 0 a 1mM, con FABP4 a 2 μM y 1,8-ANS a 80μM.



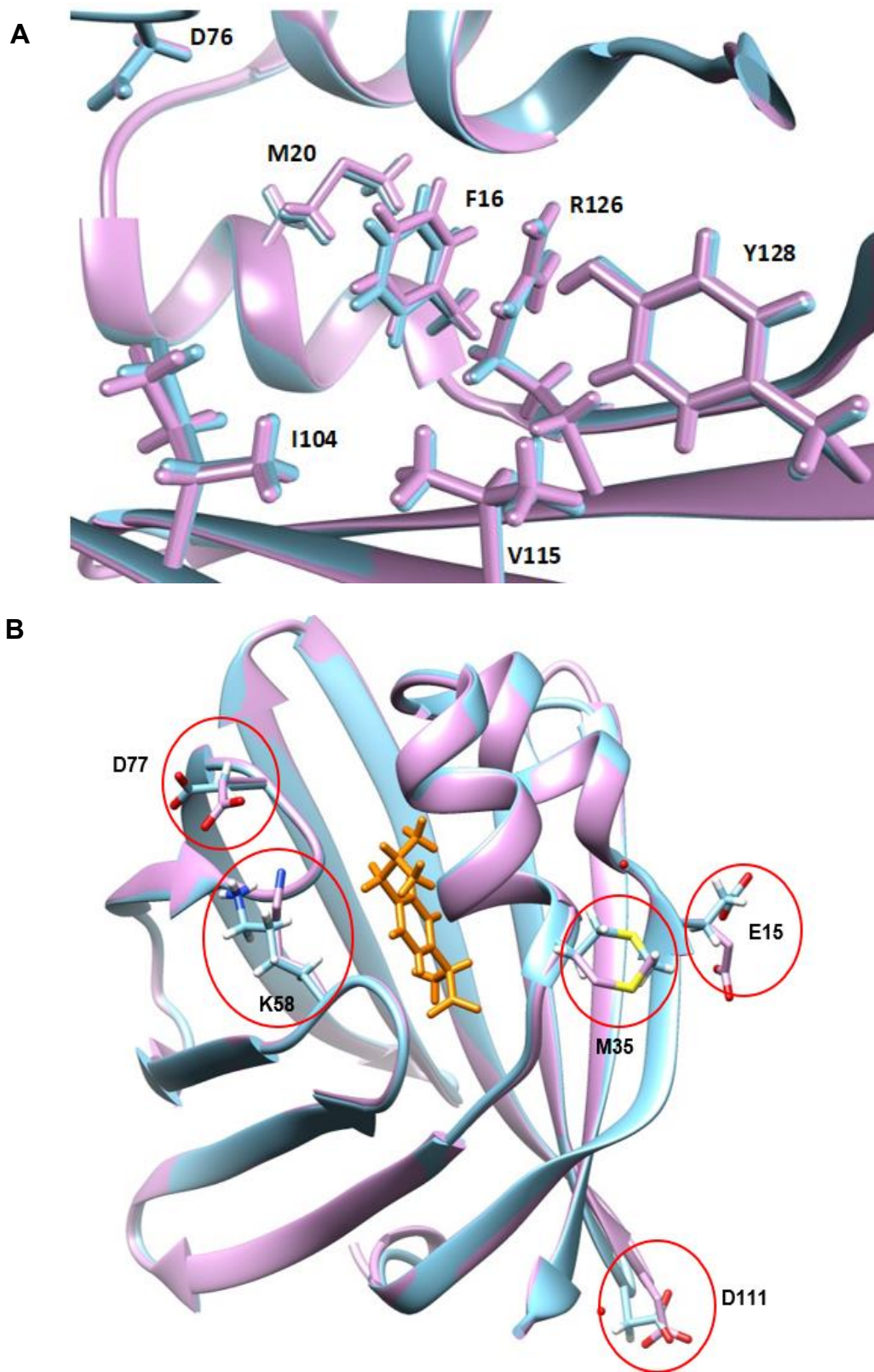
**Fig. 2. Curvas de concentración-respuesta**

Se muestran las curvas de la señal de fluorescencia contra el logaritmo de las concentraciones para cada compuesto. **A)** Compuesto 2, Nuchensin. **B)** Compuesto 3, Cirsiliol. **C)** Compuesto 4, 5,6-dihidroxi-7,3' Trimethoxyflavone. **D)** Compuesto 5, 5,6,3'- trihidroxi-7,4'-dimethoxyflavone. Se prueban diferentes concentraciones de los compuestos en una solución de ensayo de competición con FABP4 2 μM y 1,8-ANS 100μM. Datos ajustados a la ecuación dosis-respuesta sigmoideal mediante regresión no lineal.



**Fig. 5. Cristal de la proteína FABP4**

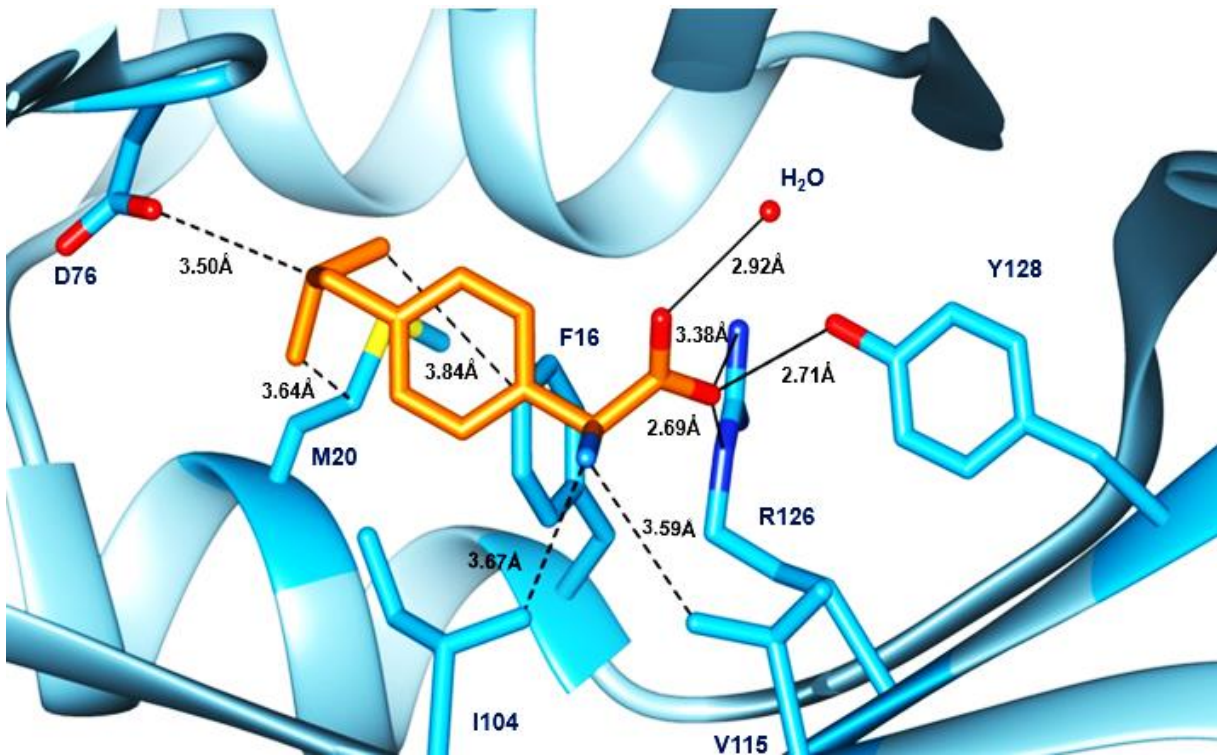
Cristal con forma de barra. Condición: 0.09M de halógenos (0.3M de NaF, 0.3M de NaBr y 0.3M de NaI) 0.1M del Sistema de Amortiguador 2 (1M HEPES; 1M MOPS), pH 7.5 50% v/v mix precipitante 1 (40% v/v PEG 500 MME y 20% p/v PEG 20000. Tamaño de la gota de 3 $\mu$ L con una relación 1:1 proteína-precipitante.



**Fig.6. Superposición de estructuras FABP4 sin ligando y FABP4/ibuprofeno**



Se muestra las estructuras de FABP4 sin ligando (color rosa) y FABP4 con ligando (color azul), el ligando ibuprofeno (color naranja). El r.m.s.d resultante de la superposición fue de 0.233. No hay un cambio conformacional global aparente y significativo cuando el ligando de ibuprofeno se une a la proteína. **A.** Cadenas laterales de los residuos F16, M20, D76, I104, V115, R126, y Y128 que interaccionan con ibuprofeno (la molécula de ibuprofeno no se muestra aquí), se observan cambios mínimos de posición cuando se sobreponen ambas estructuras. Sin embargo, hay residuos que sufren cambios más notorios en sus cadenas laterales. **B.** Se muestra en círculos rojos las cadenas laterales de: E14, M35, K58, D77 y D111 que presentan distintos rotámeros en cada estructura.



**Fig. 7. Residuos aminoacídicos que interaccionan con ibuprofeno.**

Se muestra la estructura del complejo FABP4/ibuprofeno (color verde), la molécula de ibuprofeno (color naranja), cercano a este se muestran las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que interaccionan con ibuprofeno: F16, M20, D76, I104, V115, R126, y finalmente Y128. Las líneas negras punteadas indican interacciones hidrofóbicas y las líneas continuas indican puentes de hidrógeno: Dos de R126 hacia el oxígeno 1 de ibuprofeno con 3.37Å y 2.68Å de distancia, un puente de Y128 al oxígeno 1 de ibuprofeno de 2.71 Å de distancia, y un puente formado por una molécula de agua (círculo rojo) con el oxígeno 2 de ibuprofeno de 2.92Å de distancia.

## **ANEXOS**

**Identificación de ligandos y posibles compuestos guía para la proteína FABP4, mediante análisis de interacción por fluorescencia y cristalografía de proteínas.**

**Huerta-Anguiano M. F., Rodríguez-Romero A., Montero-Morán G. M., Lara-González S. \***

Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT). San Luis Potosí, S.L.P. México, 78216.

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510.

**\*Autor de correspondencia:** Samuel Lara-González,  
Correo electrónico: [samuel.lara@ipicyt.edu.mx](mailto:samuel.lara@ipicyt.edu.mx)

**Tabla S1. Inhibidores de FABP4 en humanos**

<b>Inhibidor de FABP4</b>	<b>Actividad IC<sub>50</sub> o Ki</b>	<b>Interacciones puente de H+</b>	<b>Interacciones hidrofóbicas</b>	<b>Selectividad cruzada</b>	<b>PDB</b>	<b>Literatura</b>
<b>Compuesto 9/</b> <i>BDBM50063854</i> <b>2,4,6-tri(propan-2-yl)benzenesulfonic acid</b>	7.9uM IC <sub>50</sub>	Ser53 y Arg126	Ala75, Ile 104 y Phe57	FABP5: 16 uM IC <sub>50</sub>	4NNS	Cai 2015
<b>Compuesto 10/</b> <b>BDBM50063855</b> <b>2,4,6-tri(propan-2-yl)benzoic acid</b>	4 uM IC <sub>50</sub>	Gln95, Tyr128 y Arg126	Ala75, Ile 104 Phe16 y Ala33	FABP5: 50 uM IC <sub>50</sub>	4NNNT	Cai 2015
<b>Compuesto 3.</b> <b>3-(5-cyclopropyl-2,3-diphenyl-1H-indol-1-yl) propanoic acid</b>	Ki = 0.12 uM	Arg126 y Tyr128	Val25, Phe57, Met40, Pro38 y Ala36	-	5D45	Tagami 2016
<b>Compuesto 2</b> <b>3-[5-cyclopropyl-3-(3-methoxy-pyridin-4-yl)-2-phenyl-1H-indol-1-yl] propanoic acid</b>	Ki = 0.10 uM	Ser55, Arg126, y Tyr128.	Ala33, Ala36, Pro38, Lys58 y Ala75	-	5D47	Tagami 2016
<b>Compuesto 4</b> <b>3-(2-phenyl-1H-indol-1-yl)propanoic acid)</b>	Ki = >1.4 uM	Arg126 y Tyr128	Phe57, Pro38, Ala33 y Val115	-	5D4A	Tagami 2016
<b>Compuesto 1.</b> <b>3-{5-cyclopropyl-3-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)-2-[3-(propan-2-yloxy) phenyl]-1H-indol-1-yl}propanoic acid</b>	Ki = 0.03 uM	Ser55, Arg126 y Tyr128.	Ala36, Pro38, Phe57, Lys58 y Ala75	-	5D48	Tagami 2016
<b>Compuesto 16dK.</b> <b>2-fluoranyl-5-[(4-methoxynaphthalen-1-yl)sulfonylamino]benzoic acid</b>	Ki = 0.21 ± 0.01 uM	Gln95, Arg78, Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Ile104, Val115 y Phe16	FABP3: Ki= >100 uM	5Y0F	Gao 2018

<b>Compuesto 16do.</b> 4-fluoranyl-3-[(4-methoxynaphthalen-1-yl)sulfonilamino]benzoic acid	Ki = 0.20 ± 0.01 uM	Gln95, Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Val115 y Phe16	FABP3: Ki= >100 uM	5Y0G	Gao 2018
<b>Compuesto 16di.</b> 2-fluoranyl-3-[(4-methoxynaphthalen-1-yl)sulfonilamino]benzoic acid	Ki = 7.75 ± 0.09 uM Ki	Gln95, Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Val25 y Phe16	-	5Y0X	Gao 2018
<b>Compuesto 16d.</b> 5-[(4-methoxynaphthalen-1yl)sulfonilamino]pentanoic acid	Ki = 0.59 ± 0.03 uM	Gln95, Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Val25, Ile104 y Val 115	-	5Y12	Gao 2018
<b>Compuesto 16c.</b> 5-[(4-bromanyl)naphthalen-1-yl)sulfonilamino]pentanoic acid	Ki = 1.16 ± 0.07 uM	Gln95, Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Val115, Phe16 y Ala33	-	5Y13	Gao 2018
<b>Compuesto 10.</b> 6-chloranyl-2-methyl-4-phenyl-quinoline-3-carboxylic acid	Ki = 0.1 uM	Arg127	Ile105, Val116, Cys118 (Kuhn 2016) Ala37, Ala76, Val26, Pro39 y Asp77	FABP5: Ki = >23 uM. FABP3: Ki = 0.09 uM	5EDB	Kuhn 2016
<b>Compuesto 13.</b> 6-chloranyl-4-phenyl-2-piperidin-1-yl-quinoline-3-carboxylic acid	Ki = 0.022 uM	Ser53	Ala36, Ala75, Phe57, Ile104, Val115 y Phe16	FABP5: Ki= 0.49 uM. FABP3: Ki= 10 uM	5EDC	Kuhn 2016
<b>Compuesto 2a.</b> 9-benzyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-8-carboxylic acid	0.59 uM IC <sub>50</sub>	Tyr128 y Arg126	Ala75, Phe57, Pro38, Ile104 y Thr60	-	3FR2	Barf 2009
<b>Compuesto 26.</b> 9-[2(trifluorometil)benzil]-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-8-carboxylic acid	0.049 uM IC <sub>50</sub>	Tyr128 y Arg126	Ala75, Asp76, Ala36, Ala33, Pro38, Ile104 y Phe57	FABP3: 0.034 uM IC <sub>50</sub>	3FR4	Barf 2009

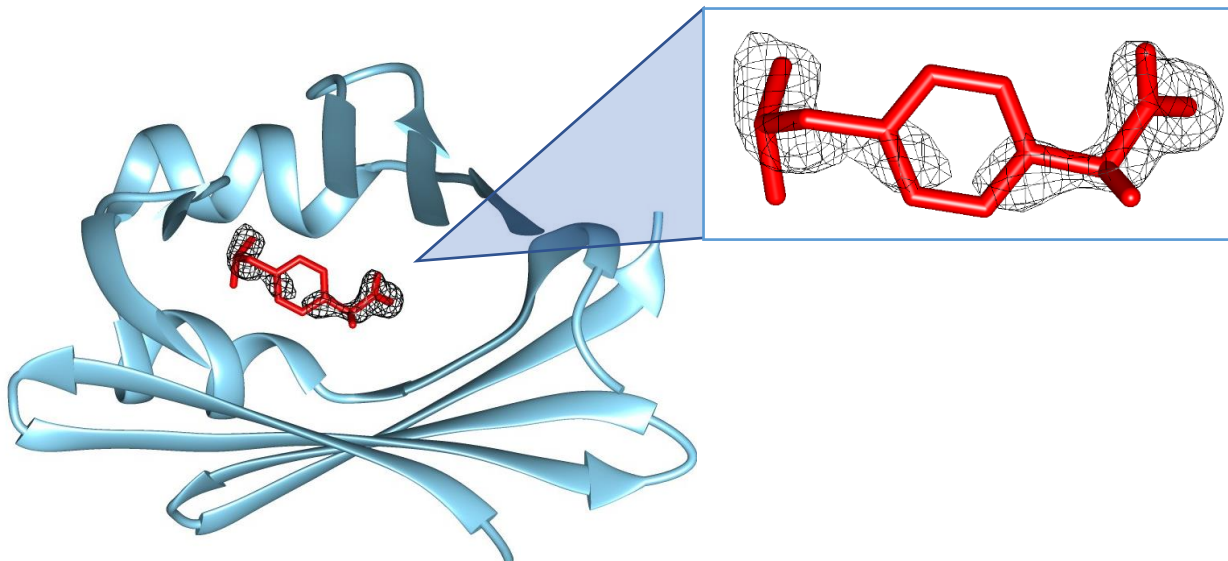
<b>Compuesto</b>	<b>30.</b>	<b>5-(3-carbamoylbenzyl)-5,6,7,8,9,10-hexahydrocyclohepta[b]indole-4-carboxylic acid</b>	0.069 $\mu$ M IC <sub>50</sub>	Ser53, Tyr128 y Arg126	Ser55, Tyr128 y Arg126	Ala75, Phe16, Tyr19, Asp76, Ile104, Val115 y Pro38, Val115 y Tyr19	FABP3: >10 $\mu$ M IC <sub>50</sub>	3FR5	Barf 2009
<b>Compuesto</b>	<b>1.</b>	<b>2-[(2-oxo-2-piperidin-1-ylethyl) sulfanyl]-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-ol</b>	1 $\mu$ M IC <sub>50</sub>	Tyr128 y Arg126	Phe16, Ala33, Phe57 y Ala75, Met20, Val23,	Val23,	-	1TOU	Ringorn 2004
<b>Compuesto</b>	<b>1.</b>	<b>4-(9H-CARBAZOL-9-YL) BUTANOIC ACID</b>	0.57 $\mu$ M IC <sub>50</sub>	Arg126 y Tyr128	Ala75, Phe57	Pro38, Ile104 y	FABP3: <0.6 $\mu$ M IC <sub>50</sub>	1TOW	Lehmann 2004
<b>Compuesto</b>	<b>11a/</b>	<b>BMS309403 ((2'-(5-ethyl-3,4-diphenyl-1h-pyrazol-1-yl)-3-biphenyl)oxy)acetic acid</b>	Ki = 0.0074 $\mu$ M (H 14 assay) ó <0.002 (1,8-ANS assay)	Cys117, Arg126 y Tyr128 y	Ala75, Phe16, Ile62, Asp76, Phe57, Pro38, Ile51 e Ile104	Ala36, Pro38,	FABP8: Ki = 250 nM FABP5: Ki = 350 nM	2NNQ	Sulsky 2007
<b>Compuesto</b>	<b>12/RO6806051</b>	<b>6-Chloro-4-phenyl-2-piperidin-1-yl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-quinoline</b>	Ki = 0.011 $\mu$ M	Tyr131 y Thr56	Ala39, Pro41, Val118 e	Ala78, Tyr22, Thr56, Asp79, Thr56,	FABP5: Ki = 0.086 $\mu$ M. FABP3: Ki = 2.3 $\mu$ M	5HZ5 (de FABP5)	Kühne 2016
<b>Compuesto</b>	<b>11.</b>	<b>6-Chloro-2-isopropyl-4-(3-isopropyl-phenyl)-quinoline-3-carboxylic acid</b>	Ki = 0.016 $\mu$ M	Arg127	Ala76, Phe58, Ile105	Ala37, Thr61 e Phe17,	FABP5: Ki = 4.3 $\mu$ M FABP3: Ki = 22.4 $\mu$ M	5HZ6	Kühne 2016
<b>Compuesto</b>	<b>9.</b>	<b>6,8-dichloro-4-phenyl-2-(piperidin-1-yl)quinoline-3-carboxylic acid</b>	Ki = 0.016 $\mu$ M	Arg127 y Tyr129	Ala34, Asp77, Leu118	Ala37, Leu105, Leu116, Ala76,	FABP5: Ki = 0.12 $\mu$ M. FABP3: Ki = 0.4 $\mu$ M	5HZ8 (de FABP3)	Kühne 2016

\*Las interacciones fueron obtenidas por medio de la herramienta de Lingand Interaccion de la base de datos Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/>

**Tabla S2. Familia de genes FABPs en humanos**

Nombre del gen	Alias proteína	Localización de la expresión <sup>1</sup>	Localización cromosomal	Número de aminoácidos	Gene ID	%Identidad con FABP4 <sup>2</sup>
FABP1	L-FABP; hepatic FABP; Liver FABP; Z protein; heme-binding protein	Hígado, riñón, intestino, páncreas, estómago y pulmón.	2p11.2	127	2168	27.91
FABP2	I-FABP; FABPI	Intestino, hígado, corazón, riñón y páncreas	4q26	132	2169	33.08
FABP3	H-FABP; heart-type FABP; MDGI; FABP11; M-FABP; O-FABP	Corazón, tejido adiposo, riñón, piel, intestino, ovario, placenta, testículo y válvula pulmonar	1p35.2	133	2170	64.89
FABP4	aP2; ALBP; AFABP; A-FABP; HEL-S-104	Tejido adiposo, hígado, intestino, glándula suprarrenal, corazón, riñón, placenta, glándula tiroides, epiplón, testículos, ovario y pulmón	8q21	132	2167	-
FABP5	E-FABP; epidermal FABP EFABP; KFABP; PAFABP; PA-FABP	Cerebro, cerebelo, esófago, vagina, pulmón, duodeno, testículos, riñón, glándula pituitaria, corazón, tejido del músculo esquelético, placenta y páncreas	8q21.13	135	2171	55.20
FABP6	ILBP; I-15P; I-BAP; ILBP3; ILLBP; I-BABP; I-BALB	Intestino, cerebro, cerebelo, pulmón, glándula suprarrenal y trompas de Falopio	5q33.3	128	2172	26.92
FABP7	B-FABP; MRG; BLBP; FABPB	Cerebro, corazón, amígdala, cerebelo, médula espinal, testículos y piel	6q22.31	132	2173	56.82
FABP8	Myelin FABP; M-FABP; P2; MP2; CMT1G; PMP2;	Amígdala, arteria, cerebro, cerebelo, próstata, médula espinal y nervio tibial	8q21.3	132	5375	67.18
FABP9	T-FABP; PERF; TLBP; PERF15	Cerebro, piel, tejido adiposo, testículos, diafragma, seno, cordón umbilical.	8q21.13	132	646480	64.12
FABP12	-	Testículos, ovarios, glándula suprarrenal, esófago, intestino, pulmón y médula espinal.	8q21.13	140	646486	55.73

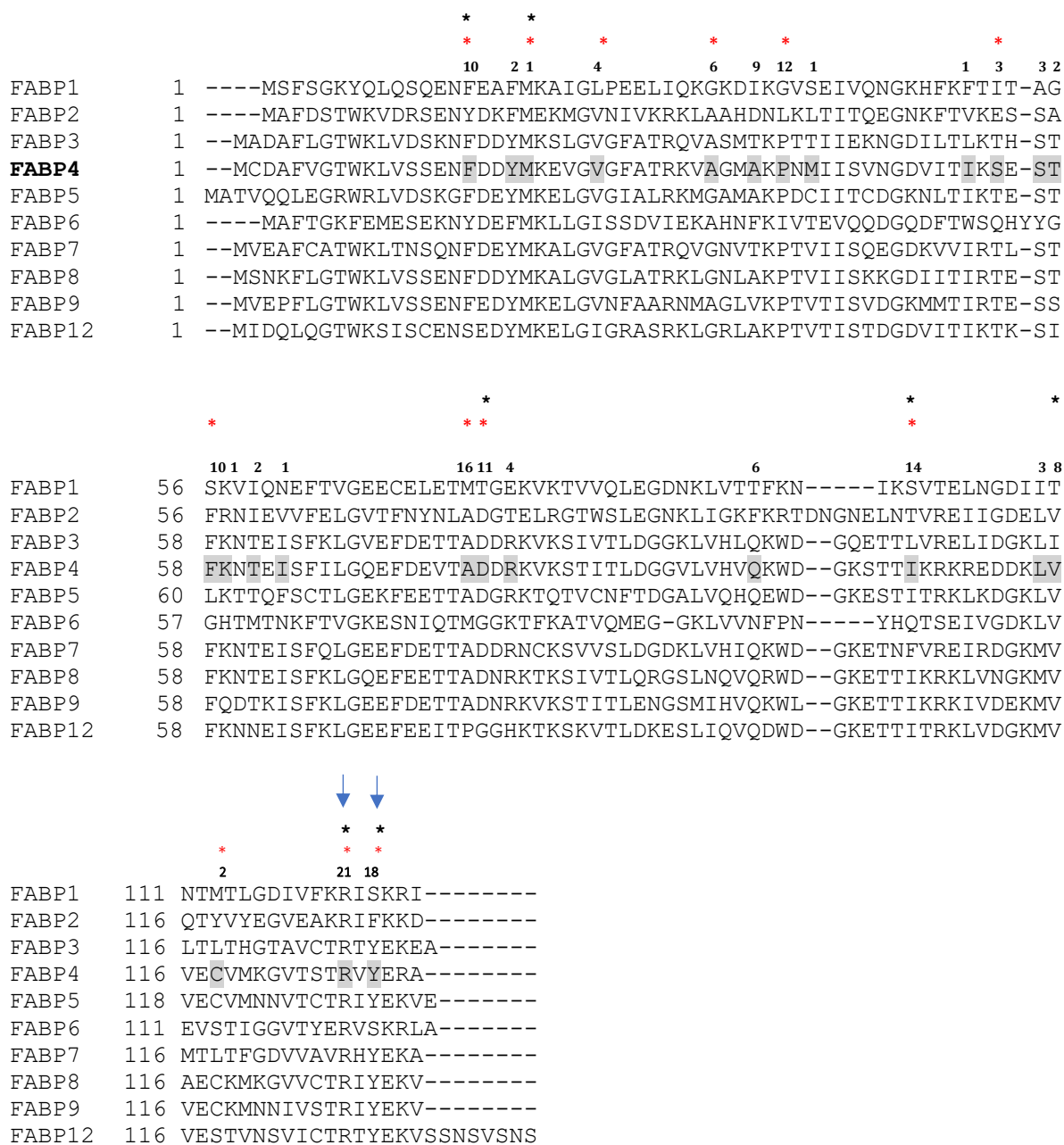
1. Datos obtenidos de la base de datos Expression Atlas: <https://www.ebi.ac.uk/gxa/about.htm>. 2. Porcentaje de identidad calculado por alineamiento local en plataforma Blastp suite-2sequence



**Fig. S1. Mapa 2mFo-DFc a 1.38 sigma de contorno del ibuprofeno en su sitio de unión en FABP4.**

Se muestra la densidad electrónica que cubre a la molécula ibuprofeno (color rojo) proveniente del cristal de proteína de FABP4 (su estructura está coloreada de azul) al que se aplicó el método de “soaking” con una incubación de 10 minutos. La ocupación no es al 100% porque la densidad electrónica no cubre en su totalidad a la molécula de ibuprofeno. Mapa 2mFo-DFc a 1.38 sigma de contorno. Programa Chimera.





**Fig. S2. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la familia de proteínas FABP presentes en humano.**

Alineamiento múltiple realizado con *Clustal W*. Se muestra en números negros la cantidad de inhibidores se unen al residuo aminoacídico sobre el que están (Con base a 22 inhibidores de la base de datos Protein Data Bank que analizamos), el residuo correspondiente a la secuencia de FABP4 está sombreado. El asterisco rojo

situado sobre determinado residuo aminoacídico señala el residuo con el que interacciona el ligando natural, ácido palmítico (PDB:2HNX): Phe16, Met20, Val25, Ala33, Pro38, Ser53, Ala75, Asp76, Phe57, Ile104, Cys117, Arg126 y Tyr128, datos obtenidos de *Ligand View* de base de datos *Protein Data Bank* (PDB). Del mismo modo la estrella negra señala el residuo con el que interacciona el ligando de ibuprofeno con base a la estructura que obtuvimos, los sitios de unión son: Phe16, Met20, Asp76, Ile104, Val115, Arg126, y Tyr128. Los sitios de unión conservados Arg126 y Tyr128 presentes en la mayoría de las isoformas, se encuentran señalados con flechas azules. Secuencias de los miembros 1-9 y 12 de la familia FABP en humano: FABP1 (EAW77076.1); FABP2 (AAH69617.1); FABP3 (CAG33148.1); FABP4 (CAG33184.1); FABP5 (NP\_001435.1); FABP6 (AAH22489.1); FABP7 (CAG33338.1); FABP8 (NP\_002668.1); FABP9 (NP\_001073995.1); FABP12 (NP\_001098751.1) GenBank del NCBI.