

## FUNCIÓN DE LA ENZIMA ANHIDRASA CARBÓNICA: CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO DE INHIBIDORES

J. Edgar González <sup>a</sup>, Adrián U. Garnica-Ortega <sup>b</sup>, Adriana Galván <sup>a</sup>, Edgar Rojas-Arroyo <sup>a</sup>, Ulises F. Reyes-González <sup>a</sup>, Marco A. García-Revilla <sup>a</sup>, Eduardo Peña-Cabrera <sup>a</sup>, Yolanda Alcaraz-Contreras <sup>b\*</sup>, Miguel A. Vázquez <sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto, [mvazquez@ugto.mx](mailto:mvazquez@ugto.mx).

<sup>b</sup>Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto, [yolaalca@ugto.mx](mailto:yolaalca@ugto.mx).

### Resumen

La anhidrasa carbónica (AC), es una enzima que interviene en muchos procesos fisiológicos y patológicos. La conversión de CO<sub>2</sub> en iones bicarbonato y protones es la principal función fisiológica que realiza este tipo de enzimas. Su actividad es necesaria para la respiración y el transporte de CO<sub>2</sub> y carbonatos entre los tejidos metabólicos y los pulmones, asimismo, en la homeostasis del pH, la secreción de electrolitos en diversos tejidos y órganos, reacciones biosintéticas, resorción ósea, calcificación, entre otras. En este documento, se abordan las principales funciones de las ACs en el organismo, además, su uso como diana terapéutica para enfermedades. Asimismo, se describen moléculas inhibitoras ejemplificando su modelo farmacofórico.

*Palabras clave:* Anhidrasa carbónica; Metaloenzima; Zinc (II); Diana terapéutica; Modelo farmacofórico; Inhibidores de anhidrasas carbónicas; Homeostasis.

## FUNCTION OF CARBONIC ANHYDRASE ENZYME: CONSIDERATIONS FOR INHIBITORS DESIGN

### Abstract

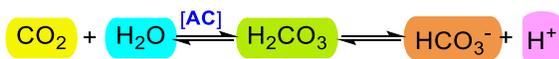
Carbonic anhydrases (CAs) convert CO<sub>2</sub> into bicarbonate ions and protons, the primary physiological transformation. They are vital for respiration and transport of CO<sub>2</sub> and carbonates between metabolic tissues and the lungs, as well as in pH homeostasis, electrolyte secretion in various tissues and organs, biosynthetic reactions, bone resorption, and calcification, among others. This document discusses the main functions of the ACs over organisms and their use as therapeutic targets for diseases. Inhibitory molecules are described, exemplifying their pharmacophoric model.

*Keywords:* Carbonic anhydrase; Metalloenzyme; Zinc(II), Therapeutic target; Pharmacophoric model; Carbonic anhydrase inhibitors; Homeostasis.

## 1. Introducción

La enzima anhidrasa carbónica o carbonato deshidratasa (AC), (Aggarwal y col., 2013) está clasificada como EC 4.2.1.1, la terminología EC4 hace referencia a las reacciones de adición o eliminación no hidrolíticas de grupos con enlaces C-C, C-N, C-O o C-S; el término 4.2 las define como liasas de carbono-oxígeno; el fragmento 4.2.1 se relaciona con enzimas que rompen C-O con eliminación de agua; finalmente 4.2.1.1 específica que son carbonato deshidratasas.

Este tipo de enzimas pertenecen a una superfamilia de metaloenzimas presentes en todos los reinos biológicos (células eucariotas como procariontas), ya que poseen la capacidad de equilibrar la reacción de hidratación/deshidratación de  $\text{CO}_2$  a bicarbonato (Esquema 1).



**Esquema 1.** Reacción general de las ACs.

Las ACs están involucradas en la regulación de pH y el metabolismo de muchos procesos fisiológicos y patológicos. En la actualidad, se han identificado al menos ocho familias genéticas de AC, designadas con letras griegas:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ -,  $\epsilon$ -,  $\iota$ -. Su clasificación se basa en su estructura y en el

organismo hospedero (Agarwal y col., 2019; Cuffaro y col., 2020; Deitmer y col., 2015; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Occhipinti y Boron, 2019; Supuran, 2018c, 2018b).

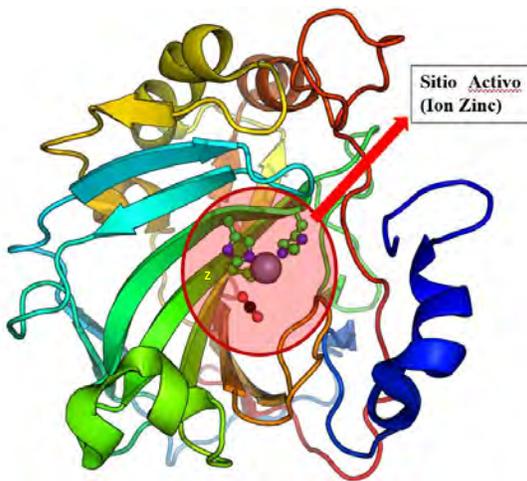
Las  $\alpha$ -AC se encuentran principalmente en mamíferos vertebrados, como los humanos, y se dividen en 16 isoenzimas que varían en su localización subcelular, actividad catalítica y susceptibilidad a diferentes tipos de inhibidores. La clasificación de las  $\alpha$ -AC incluye:

- Isoenzimas citosólicas: I, II, VII y XIII.
- Isoenzimas de membrana: IV, IX, XII, XIV, XV.
- Isoenzimas mitocondriales: VA y VB.
- Isoformas secretadas: VI.

Además, existen tres isoformas (VIII, X y XI) que no presentan actividad catalítica (Agarwal y col., 2019; Cuffaro y col., 2020; Deitmer y col., 2015; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Occhipinti y Boron, 2019; Supuran, 2018c, 2018b).

Las metaloenzimas se caracterizan por presentar un metal de transición en su sitio activo. Dentro de este grupo, la AC-II, es la enzima más estudiada, y su sitio activo que consiste en una cavidad cónica. Esta cavidad está compuesta por una región hidrofóbica (Val121, Val143, Leu198, Val207 y Trp209)

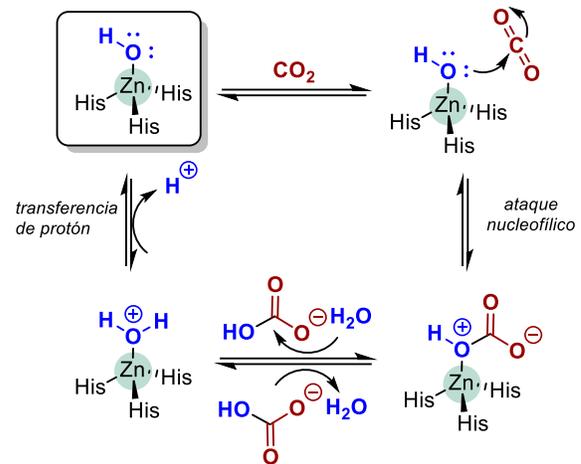
y una región hidrofílica (Tyr7, Asn62, His64, Asn67, Thr199 y Thr200). En la parte inferior de la cavidad se encuentra el zinc con estado de oxidación de +2 ( $Zn^{+2}$ ), que actúa como cofactor esencial para la catálisis enzimática. Este ion está coordinado tetraédricamente por tres residuos de histidinas conservadas (His94, His96 y His119), los cuales actúan como bases de Lewis o donadores de electrones debido a su anillo de imidazol, el cual se coordina con el metal funcionando como un ácido de Lewis (Figura 1) (Cuffaro y col., 2020; Kim y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019).



**Figura 1.** Estructura del sitio activo de la anhidrasa carbónica AC-II humana con zinc. PDB: 6LUX.

En la estructura de la AC-II, el ion de  $Zn^{+2}$  al actuar como un ácido de Lewis reduce el pKa del agua (10 a 7 unidades), la cual se une al

Zn. Esto permite la formación de un ion hidróxido unido al Zn bajo condiciones de pH fisiológico (Esquema 2) (Kim y col., 2020).



**Esquema 2.** Mecanismo de reacción cíclica catalizada por la AC-II.

## 2. Generalidades

### 2.1 Función metabólica en el cuerpo humano.

La anhidrasa carbónica es una de las enzimas más rápidas, pues es capaz de hidratar  $10^6$  moléculas de  $CO_2$  por segundo. Participa en las reacciones de carboxilación que provee de bicarbonato a enzimas carboxilantes como 1 piruvato carboxilasa, la acetil-coenzima la carboxilasa y la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa (Esquema 3).



**Esquema 3.** Reacciones de carboxilación donde las ACs generan  $HCO_3^-$ .

Estas enzimas a su vez participan en procesos como la gluconeogénesis, que es una ruta metabólica anabólica para la síntesis de glucosa, y la lipogénesis, que es una secuencia de reacciones bioquímicas para la síntesis de ácidos grasos y su posterior funcionalización para la generación de triglicéridos (Deitmer y col., 2015). También, desempeñan un papel crucial en el cuerpo humano debido a la regulación del pH. Por ejemplo, median la producción de ácido carbónico mediante fosforilación oxidativa en forma de  $\text{CO}_2$ , y mediante glucólisis anaeróbica (Deitmer y col., 2015). Además, el bicarbonato generado funciona como buffer, contribuyendo al proceso de homeostasis (Occhipinti y Boron, 2019).

La reacción catalizada por las ACs está involucrada en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la homeostasis de pH y  $\text{CO}_2$ ; la secreción de electrolitos en varios tejidos y órganos; reacciones biosintéticas como la gluconeogénesis, la lipogénesis y la ureagénesis; la resorción ósea; la calcificación; la tumorigenicidad y la virulencia de varios patógenos. Además, participa en la respiración y el transporte de  $\text{CO}_2$  y bicarbonato entre los tejidos en

metabolismo y pulmones (Mishra y col., 2020; Supuran, 2018a, 2018b).

## 2.2 Relación de las isoformas $\alpha$ -AC con enfermedades.

Se ha investigado en las últimas décadas el papel que juegan la  $\alpha$ -AC en múltiples enfermedades como por ejemplo el glaucoma, la obesidad, la osteoporosis, el cáncer, el mal de altura, la epilepsia, el dolor neuropático y la apnea del sueño (Agarwal y col., 2019; Cuffaro y col., 2020; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2018a). Se ha constatado que la AC-I está involucrada en algunas condiciones patológicas como el edema retinal y cerebral, ya que está presente en varios tejidos (Abdoli y col., 2017; Agarwal y col., 2019; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2018a). La forma más dominante fisiológicamente de las anhidrasas carbónicas es la AC-II, la cual se expresa en el plexo coroideo, oligodendrocitos, tractos mielinizados, astrocitos y vainas de mielina en el cerebro de los vertebrados. La AC-II cataliza la formación de bicarbonato, lo que es el principal mecanismo de transporte de sodio y agua en el ojo, su inhibición baja la presión intraocular (Agarwal y col., 2019; Supuran, 2018a).

La AC-III es una enzima citosólica que se sabe que se expresa en gran medida en el músculo esquelético, en tejidos que sintetizan y/o almacenan grasa: hígado, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón. Muestra una actividad catalítica muy baja como hidrasa de CO<sub>2</sub>. Está vinculada al estrés oxidativo y se asocia con diversas enfermedades inflamatorias como miastenia gravis y artritis reumatoide (Agarwal y col., 2019; Mishra y col., 2020; Supuran, 2018a).

La AC-IV es una enzima de membrana anclada a glicofosfatidilinositol que se encuentra en los capilares pulmonares y en los túbulos renales proximales. Esta enzima facilita el intercambio de gases, que es crucial para los altos requerimientos metabólicos. Además, desempeña un papel esencial en el mantenimiento del equilibrio ácido en la retina y el epitelio retinal, así como en la liberación de ácido en la coriocapilaris de la coroides. Finalmente, se ha estudiado a profundidad como objetivo farmacológico para el glaucoma, el accidente cerebrovascular y la retinitis pigmentosa (Agarwal y col., 2019; Mishra y col., 2020; Supuran, 2018a).

La AC-V se presenta en dos formas mitocondriales, AC-VA y AC-VB, siendo AC-VB la que muestra una distribución

tisular más amplia. AC-VA desempeña un papel crucial en el hígado al proporcionar el bicarbonato necesario para cuatro enzimas ubicadas en las mitocondrias: sintetasa de carbamoil fosfato-1, carboxilasa de piruvato, carboxilasa de propionil-CoA y carboxilasa de 3-metilcrotonil-CoA. El papel de estas isoformas está bien documentado en relación con la obesidad (Agarwal y col., 2019; Cuffaro y col., 2020; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2018b).

Una de las menos estudiadas es la AC-VI, sin embargo, se sabe que están dentro de las glándulas mamarias y salivales, por esto último es conocida como “*gustina*” (Agarwal y col., 2019; Nocentini y Supuran, 2019). Esta isoforma está involucrada en la génesis de las caries (Mishra y col., 2020).

La AC-VII muestra una alta actividad en la hidratación del CO<sub>2</sub>. Actúa como un recolector de radicales libres de oxígeno y contribuye a la regulación del pH. Está implicada en las fases postnatales iniciales del desarrollo cerebral y puede colaborar con la AC-II y XIV en procesos relacionados con la cognición, así como en la generación de excitación neuronal y convulsiones febriles.

Las enfermedades asociadas incluyen la tricosporonosis (Abdoli y col., 2017; Agarwal y col., 2019; Cuffaro y col., 2020; Mishra y

col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2018a).

La AC-VIII se ha estudiado por su participación en los trastornos neurodegenerativos y de retraso mental debido a mutaciones que puede tener dentro del gen que la codifica.

Actualmente, existe escasa información disponible sobre las funciones fisiológicas reales de las isoformas catalíticas AC-VIII, X y XI. La AC-X se conoce que está presente en el sistema nervioso central y la AC-XI abunda en el cerebro con expresiones moderadas en la espina dorsal y tiroides (Agarwal y col., 2019; Mishra y col., 2020).

La AC-IX, así como la AC-XII, son proteínas transmembranales que están presentes en riñón, próstata e intestino. Están relacionadas con tumores/metástasis en riñón, y su inhibición controla el crecimiento del tumor (Abdoli y col., 2017; Agarwal y col., 2019; Mishra y col., 2020). El papel de las AC es de suma importancia, ya que no solo se encuentra en humanos, en otros organismos como *plasmodium spp* se han identificado las  $\eta$ -AC y se les ha estudiado como blancos terapéuticos contra la malaria desde 2014 (Supuran y col., 2015).

### 2.3 Inhibidores de anhidrasas carbónicas.

Las AC están implicadas en múltiples enfermedades, por lo que se ha investigado su inhibición como una alternativa para su tratamiento. Los inhibidores descritos en la literatura se componen de tres elementos estructurales cruciales para su efectividad:

1. Sitio o grupo de unión al Zn (ZBG; *Zinc Binding Group*): es un grupo capaz de interactuar tanto con el ion de zinc como con residuos del sitio activo de todas las  $\alpha$ -AC como la Thr199 y Glu106.
2. Andamio o cuerpo: es una estructura orgánica que puede ser un anillo aromático o heteroaromático que se adhiere directamente a la cola.
3. Cola: grupos polares o lipofílicos que pueden interactuar con los residuos de aminoácido presentes en el sitio de activo (Figura 2) (Cuffaro y col., 2020; Supuran, 2020).

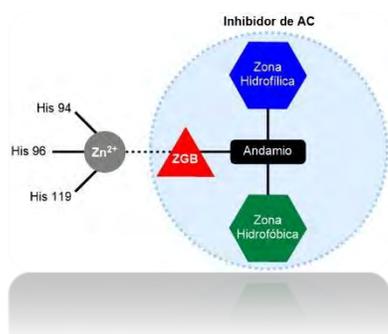
### 2.4 Mecanismos de inhibición.

En la actualidad se pueden encontrar cinco mecanismos de inhibición de las AC (Cuffaro y col., 2020; Supuran, 2016, 2020).

#### 2.4.1 Quelación del metal ( $Zn^{2+}$ ).

- Estos compuestos se coordinan al ion  $Zn^{2+}$ , sustituyendo tanto a la molécula de agua

como al ion hidroxilo de la enzima (Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016).



**Figura 2.** Estructura general de un inhibidor de AC-II con unión al sitio activo ( $Zn^{2+}$ ).

El "enfoque de anillos" es una estrategia que implica explorar varios sistemas de anillos que contienen un grupo ZBG de sulfonamida u otros grupos quelantes. Esta estrategia ha permitido identificar inhibidores que muestran interacciones prometedoras con el sitio de unión de la AC, a pesar de tener una baja solubilidad en agua. Sin embargo, todos ellos presentan un grave problema de selectividad, ya que pueden inhibir otras isoformas no involucradas en la patología objetivo y provocar una multitud de efectos secundarios adversos (Cuffaro y col., 2020). Un claro ejemplo de inhibidores que operan bajo este mecanismo son las sulfonamidas (1) (Figura 3); además, se puede mencionar a los aniones inorgánicos, algunos carboxilatos, hidroxamatos, ditiocarbamatos, monotiocarbamatos, xantatos, fosfonatos, benzoxaboroles, tioles, selenoles,

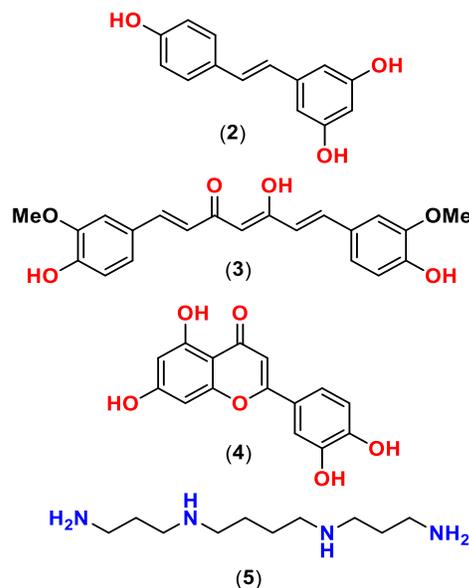
fosfonamidatos y algunos carbamatos (Kim y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016, 2020).



**Figura 3.** Estructura química de las sulfonamidas.

#### 2.4.2 Inhibidores que se anclan al ion hidróxido/agua con el zinc.

Este tipo de compuestos se anclan al agua o al ion hidroxilo que están unidos al zinc.



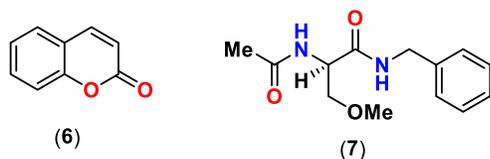
**Figura 4.** Estructura química de los inhibidores tipo II.

El más conocido es el fenol; sin embargo, derivados de este compuesto también se han estudiado como, por ejemplo, el resveratrol

(2), curcumina (3), luteolina (4) y espermina (5) (Figura 4). Derivados de otros compuestos también presentan este mecanismo como por ejemplo las poliaminas, sulfocumarinas y las 2-tiocumarinas (Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016, 2020).

#### 2.4.3 Inhibidores que obstruyen la entrada al sitio activo.

Los inhibidores que se van por esta ruta se unen a la entrada de la cavidad para el sitio activo, lo que obstruye a la enzima. Esto genera que los inhibidores de esta familia sean muy selectivos para cada isoforma. El primer compuesto estudiado de esta familia es la cumarina (6); sin embargo, también se pueden encontrar el fármaco antiepiléptico como la lacosamida (7) (Figura 5) (Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016, 2018a, 2020).



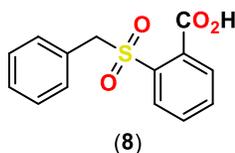
**Figura 5.** Estructura química de inhibidores tipo III.

#### 2.4.4 Inhibidores que se unen fuera del sitio activo.

El mecanismo de inhibición de esta familia se basa en la obstrucción de la entrada a la cavidad donde se encuentra el sitio activo.

Normalmente se produce una unión entre el inhibidor con los residuos de histidina, lo cual induce un colapso en el ciclo catalítico de la enzima ya que no se puede reformar el ciclo catalítico de la especie nucleofílica de la enzima (Abdoli y col., 2017; Mishra y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016). Los inhibidores de este tipo tienen una estructura básica que incluye un ZBG, generalmente una sulfonamida aromática o heteroaromática, con diferentes extensiones añadidas. Inicialmente, estas extensiones eran grupos hidrosolubles, como grupos amino, imino o hidroxilo, que podían ser funcionalizados. Más adelante, se modificó la estructura de las colas para incluir diversos grupos (como coordinadores de metales o funciones con carga positiva) capaces de interactuar con una región en el borde de la cavidad del sitio activo (Cuffaro y col., 2020; Mishra y col., 2020; Supuran, 2016). Un ejemplo bien estudiado de esta familia sería el ácido 2-(bencilsulfonil)-benzoico (8) (Figura 6), cuyo mecanismo se corroboró por

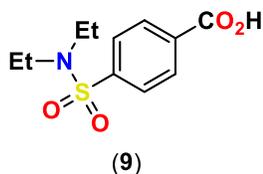
cristalografía de rayos X (Cuffaro y col., 2020; Supuran, 2016).



**Figura 6.** Estructura del ácido 2-(bencilsulfonyl)-benzoico.

#### 2.4.5 Compuestos con un mecanismo de inhibición desconocido.

En este grupo se catalogan las sulfonamidas secundarias y terciarias, de las cuáles se desconoce su mecanismo de funcionamiento, aunque son inhibidoras eficaces de AC. Un ejemplo de ellas es el medicamento *probenecid*® (9) (Figura 7) (Cuffaro y col., 2020; Nocentini y Supuran, 2019; Supuran, 2016, 2018b).



**Figura 7.** Estructura química del medicamento *probenecid*®.

### 3. Conclusiones

La versatilidad de las isoformas de ACs está relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades en el ser humano. Por ello, se han desarrollado proyectos enfocados en el estudio de compuestos como inhibidores selectivos a sus distintas isoformas, cuyo mecanismo de acción depende de su estructura química. Dicha selectividad dicta su actividad como antidiuréticos frente a la CA-II, o aquellos orientados con enfoque anticancerígeno, como inhibidores de CA IX y/o XII. El desafío radica en la obtención de compuestos con buenos índices de selectividad para evitar el desarrollo de efectos colaterales graves. Es necesario seguir trabajando en el diseño de compuestos con potencial inhibición enzimática. Esto abarca un contexto multidisciplinario integrando áreas de química orgánica, química computacional, farmacología y biología, gestando contribuciones de alta relevancia clínica.

### Referencias bibliográficas

Abdoli, M., Angeli, A., Bozdog, M., Carta, F., Kakanejadifard, A., Saeidian, H., y Supuran, C. T. (2017). Synthesis and carbonic anhydrase I, II, VII, and IX inhibition studies with a series of benzo[d]thiazole-5- and 6-

sulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1071–1078. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1356295>

Agarwal, T., Singla, R. K., y Garg, A. (2019). Carbonic anhydrases and their physiological roles. *Proceedings of MOL2NET 2019, International Conference on Multidisciplinary Sciences*, 5th Edition, 6764. <https://doi.org/10.3390/mol2net-05-06764>

Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B., y McKenna, R. (2013). Structural annotation of human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2), 267–277. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.737323>

Cuffaro, D., Nuti, E., y Rossello, A. (2020). An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1906–1922. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1825409>

Deitmer, J. W., Theparambil, S. M., Ruminot, I., y Becker, H. M. (2015). The role of membrane acid/base transporters and carbonic anhydrases for cellular pH and metabolic processes. *Frontiers in*

*Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00430>

Kim, J. K., Lee, C., Lim, S. W., Adhikari, A., Andring, J. T., McKenna, R., Ghim, C. M., y Kim, C. U. (2020). Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nature Communications*, 11, 4557. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18425-5>

Mishra, C. B., Tiwari, M., y Supuran, C. T. (2020). Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2485–2565. <https://doi.org/10.1002/med.21713>

Nocentini, A., y Supuran, C. T. (2019). Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(11), 1175–1197. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1651289>

Occhipinti, R., y Boron, W. F. (2019). Role of carbonic anhydrases and inhibitors in acid–base physiology: Insights from mathematical modeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3841. <https://doi.org/10.3390/ijms20153841>

Supuran, C. T. (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 345–360. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1122001>

Supuran, C. T. (2018a). Applications of carbonic anhydrases inhibitors in renal and central nervous system diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(10), 713–721. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1519023>

Supuran, C. T. (2018b). Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(10), 709–712.

<https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1523897>

Supuran, C. T. (2018c). Carbonic anhydrases and metabolism. *Metabolites*, 8(2), 25. <https://doi.org/10.3390/metabo8020025>

Supuran, C. T. (2020). Exploring the multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(6), 671–686. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1743676>.

Supuran, C. T., y Capasso, C. (2015). The  $\eta$ -class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(4), 551-563. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.991312>.