

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

MODELADO MOLECULAR DE LA ENZIMA 6-FOSFOGLUCONATO
DESHIDROGENASA DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) MEXICANA* Y SU
APLICACIÓN EN EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA
LEISHMANIASIS.

Autor:

Lic. Mariana Graterol

Tutor:

Dra. María Luisa Serrano

Dr. Alexis Mendoza-León

Caracas,

2016

**MODELADO MOLECULAR DE LA ENZIMA 6-FOSFOGLUCONATO
DESHIDROGENASA DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) MEXICANA* Y SU
APLICACIÓN EN EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA
LEISHMANIASIS.**

Mariana José Graterol Guía

**Tesis Doctoral presentada ante
la ilustre Universidad Central de Venezuela como
requisito para optar al título de Doctor en Ciencias,
Mención Química.**

**Tutores. Dra. María Luisa Serrano
Dr. Alexis Mendoza León**

**Este trabajo se realizó en
la Unidad de Química Medicinal en la
Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.**

Resumen

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH) es la tercera enzima de la ruta de las pentosas fosfato y ha mostrado ser esencial en la generación del poder reductor en forma de Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) que protege al parásito contra estrés oxidativo; razón por la que es considerada como un potencial blanco terapéutico.

Estructuralmente la 6-PGDH es homo-dimérica y se ha relacionado el número de interacciones entre ambas sub-unidades con su estabilidad cinética en Kinetoplastidas. En la forma cristalina de *Trypanosoma brucei* se han identificado cinco puentes salinos que ayudan a mantenerlas unidas para formar el dímero: puente 1 R459 → E134, puente 2 E477 → K139, puente 3 E463 → R259, puente 4 R464 → D246 y puente 5 D466 → H255. Las enzimas 6-PGDH de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania (Leishmania) mexicana* son inestables y no se encuentran cristalizadas. En *L. (L.) mexicana* un cambio en la secuencia de aminoácidos resulta en la pérdida del puente 2, mientras que en *T. cruzi* cambios puntuales en dos aminoácidos de su secuencia originan la ausencia de los puentes 3 y 4, los mismos que al ser restituidos mediante experimentos de mutagénesis sitio-dirigida dan como resultado una enzima doble mutante estable.

En este trabajo se realizó el modelaje molecular de la enzima 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*, y sus correspondientes enzimas mutadas *in silico*, a objeto de evaluar mediante dinámica molecular el comportamiento de los residuos que forman los pares iónicos de interés. El análisis estructural en base a las trayectorias obtenidas ha permitido encontrar argumentos para explicar la inestabilidad de la 6-PGDH en Kinetoplastidas en relación con la ausencia de algunos puentes salinos y su ubicación en la estructura tridimensional de la enzima. Los resultados muestran que el puente 2 parece ser esencial en la actividad catalítica ya que en la estructura de la 6-PGDH se ubica en la entrada al sitio activo, enlazando ambas sub-unidades del dímero mediante los últimos residuos del tallo (extremo C-terminal). En esta enzima la pérdida del par iónico 2

también incide en los pares 3 y 4, siendo interacciones que no pueden clasificarse como puentes salinos en el sentido estricto, como consecuencia de la variabilidad encontrada para sus conformaciones respecto a la larga distancia entre residuos involucrados. Este hecho tiene influencia directa en la constitución del sitio activo, ya que si el par encargado unir las sub-unidades para cerrar la cavidad no existe o se alarga podría ocasionar la apertura de la cavidad por donde se posiciona el sustrato para la catálisis.

La obtención de un modelo tridimensional validado para la enzima de *L. (L.) mexicana* permitió realizar el barrido virtual en base al receptor de una librería química, que fue construida por similitud estructural con inhibidores de altos porcentajes de inhibición ensayados experimentalmente para la 6-PGDH de *T. brucei*. Mediante esta aproximación se encontraron tres compuestos (1, 3, 5) con propiedades ADME tipo fármaco, que muestran mayor afinidad por la enzima de *L. (L.) mexicana* en comparación a su contraparte humana. Las diferencias encontradas para la cavidad de la enzima en parásito y humana pueden seguir explotándose en el diseño racional de fármacos contra la leishmaniasis, en particular el hallazgo de la influencia del tallo en la cavidad y la interacción con los residuos Y194, R454 y H460 que pertenecen a la otra sub-unidad y son los encargados de anclar el sustrato al sitio activo.

Palabras clave:

6-Fosfogluconatodeshidrogenasa 6-PGDH, *Leishmania*, puente salino, ruta de las pentosas fosfato, barrido virtual.

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

*"Sólo en las misteriosas ecuaciones del amor puede encontrarse alguna lógica. Y si estoy aquí
hoy es gracias a ti. Tú
eres mi única razón de ser. Eres todas mis razones"*

J. Nash

A mi mamá, Mecha, tu recuerdo lo ilumina todo...

A mi abuela, tu ejemplo me acompaña siempre...

*La transformación de un átomo en otro tiene la misma esencia que la
transformación de una persona en otra diferente a la que es...*

A todo el que quiere algo, al que no se conforma, al que cambia, al que arriesga, al que no cae sin levantarse, al que sueña, al que se levanta por sus sueños y sale al mundo a buscarlos... Se cumplen.

AGRADECIMIENTOS

“Tras un paso otro, pequeñas distancias que no tienen destino, sólo secuencia, caminaba, caía, me levantaba... De pronto, la distancia crecía, cada paso se hacía más y más largo. De caminar a volar, pensé, pero no. No se trataba de volar, era algo más precioso y sutil, navegar a flor de piso, abrir los ojos, ver, derrotar la realidad, despertar soñando”.

La culminación de este trabajo no es más que la culminación de una etapa de mi vida. Vivir una vida sin sueños tiene tan poco sentido como vivir la vida sólo soñando con alcanzarlos. La vida, como un sueño, se hace segundo a segundo minuto a minuto.

Gracias a todas las personas que estuvieron conmigo durante este tiempo, a los amigos que estuvieron y a los que siempre están; he aprovechado el paso de cada uno de ustedes por mi vida para conocerlos, conservar la huella que dejaron en mí y he disfrutado de su compañía en cada tramo del camino, este largo camino, sí, tan largo como hoy es dichoso.

Quiero agradecer especialmente a mis amiguitos del Laboratorio de Físicoquímica Teórica y Computacional de mi Escuela de Química en la Facultad de Ciencias de la UCV. Al Dr. Emilio Esquitieri por toda su sabiduría, por nuestras conversaciones, gracias por toda la ayuda que me brindó. Al Dr. Héctor Franco por su amistad, apoyo y buenas recomendaciones en la evaluación del proyecto. A mis queridos profesores de la Escuela de Química: al Dr. Manuel Caetano y a la Dra. Marisol Ortega muchas gracias por su consejo desinteresado y su mano amiga, por ayudarme cuando más lo necesité. A todos esos grandes profesores que dejaron en mí la semilla de la enseñanza para que naciera el sueño de lo posible. A todos los alumnos que tuve la suerte de conocer, especialmente a mis queridos ahijados de la promoción LV “Recordar es vivir” y promoción LVI “Si lo sueñas haz que pase”, del colegio Moral y Luces Herzl Bialik, gracias por todo su

amor y cariño, siempre les llevo en el corazón... Los sueños se hacen realidad para quién va en busca de ellos.

A todas mis compañeras del laboratorio de la Unidad de Química Medicinal: Nury gracias por tu ánimo y tu sonrisa desde el día uno. Gracias. A todas las personas que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo. Especial reconocimiento a todos los que trabajan en la Biblioteca Marcel Roche del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, quienes con su mística y amabilidad me ayudaron a convertir en fácil lo difícil. Inolvidable.

Tomar cada obstáculo del camino y transformarlo en valor, aprovechar cada crisis para sacar la enseñanza de la dificultad, la luz de la sombra, cada tropiezo convertirlo en oportunidades, con cada lágrima una sonrisa, en cada paso el impulso necesario para volver a comenzar, con el ímpetu de un explorador, la curiosidad de un alquimista...

Quiero agradecer con todo mi cariño y estima a mi tutora la Dra. María Luisa Serrano, gracias por su confianza, sin la cual no hubiera podido iniciar o terminar este trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir un proyecto lleno de preguntas que han encontrado respuestas, y más preguntas, aprendiendo como todo buen científico que hace caminos al andar. Muchas gracias por sus buenos consejos en el momento necesario y por compartir su experiencia personal y profesional. Ha sido un gran viaje y he aprendido mucho a su lado de la experiencia que me deja poder complementar nuestras opiniones.

Al Dr. Alexis Mendoza-León por sus sugerencias en cada presentación, su valioso aporte en la revisión de cada manuscrito y su conocimiento en la parte biológica. Gracias por la confianza para modelar la enzima, su apoyo incondicional y ayuda siempre desinteresada.

A la Dra. Marisela Cárdenas por acompañarme en el camino de descubrir mi paisaje emocional, a César Ricardo por guiarme mientras lo conocía y a

Patricia Escalona gracias por su apoyo y por ayudarme a comprender el mundo fuera del *PLANETA MARIANA*.

A la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras... cuna de mis sueños... *VOLVEREMOS*.

A Dios, por el milagro de la vida.

Busco el hilo de luz que rompe la noche, busco la sonrisa honesta que llena el corazón, busco la valentía del primer paso, la compañía de la soledad... la búsqueda que comienza antes de partir. Busco el campo donde sembrar mis ganas, busco horizontes para alcanzarlos, busco el cielo donde vivirán mis versos. Busco el valor, la justicia y la alegría. Busco y atravieso pasadizos en el laberinto de la memoria. Busco y vuelvo por la vida que queda en los rincones de mis recuerdos. Busco el papel donde se escribe la historia. Busco mis palabras, mis líneas, mi voz. Busco ese instante, dulce, cálido y eterno, que yace en cada segundo. Busco el ímpetu del mar bravío, lo infinito del silencio, busco el inicio en cada final...

Busco, busco y sigo buscando.

El futuro, el presente, la persona que seré desde hoy...

LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

6-PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.44)

6PG: 6-fosfogluconato

AA: Aminoácidos

ADME: Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción

C: aminoácido cisteína

CADD: *Computer Aided Drug Design* (Diseño de fármacos asistido por computadoras)

D: aminoácido aspártico

DM: Dinámica molecular

E: aminoácido glutámico

EI: Energía de interacción

fs: femtosegundo

H: aminoácido histidina

HBA: *Hydrogen Bond Acceptors*

HBD: *Hydrogen Bond Donors*

Hs6-PGDH: Enzima 6-PGDH de *Homo sapiens*

K: aminoácido lisina

LI6-PGDH: Enzima 6-PGDH de *Lactococcus Lactis*

Lm6-PGDH: Enzima 6-PGDH de *Leishmania (Leishmania) mexicana*

MM: Modelaje molecular

ns: nanosegundo

NADP⁺: Forma oxidada del Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato

NADPH: Forma reducida del Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato

Nam: Nicotinamida

NPT: Ensamble isotérmico isobárico

NVT: Ensamble canónico

Oa6-PGDH: Enzima 6-PGDH de *Ovis aries*

pH: Logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio

ps: picosegundo

PBC: *Periodic Boundary Conditions* (Condiciones periódicas de contorno)

PDB: *Protein Data Bank* (Banco de datos de proteínas)

PME: Particle Mesh Ewald Summatory (Método para la sumatoria de interacciones electrostáticas)

R: aminoácido arginina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMS: *Root-mean-square* (Raíz cuadrada media)

RMSD: *Root-mean-square deviation* (Desviación raíz cuadrática media)

Ru5P: Ribulosa-5-fosfato

SAS: Superficie Accesible al Solvente

Tb6-PGHD: Enzima 6-PGDH de *Trypanosoma brucei*

Tc6-PGDH: Enzima 6-PGDH de *Trypanosoma cruzi*

V: aminoácido valina

Å: angstrom

3D: tridimensional

ÍNDICE

RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	xi
ÍNDICE	xiii
1 INTRODUCCIÓN	21
1.1 Leishmaniasis.....	22
1.1.1. Características generales.....	22
1.1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	23
1.1.3. Fármacos utilizados en los tratamientos actuales.	24
1.2 La enzima 6-PGDH como blanco terapéutico.....	26
1.2.1 Bioquímica.....	26
1.2.2 Estructura de la enzima 6-PGDH.....	30
1.2.3 Estabilidad cinética.....	36
1.3 Diseño racional de fármacos asistido por computadora (CADD).....	40
1.3.1 Diseño racional de fármacos contra la leishmaniasis.	41
1.3.2 Inhibidores de la 6-PGDH.....	43
1.4 Modelado molecular de proteínas.....	46
1.4.1 Modelado por homología.....	46
1.4.2 Dinámica molecular.....	48
1.4.3 <i>Docking</i> molecular.....	50
1.4.4 Barrido virtual de librerías (<i>virtual screening</i>).	53
1.5 Justificación del trabajo.....	55
1.6 Objetivos.....	55
1.6.1 Objetivo General.....	55
1.6.2 Objetivos específicos.....	56
2 MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1 Materiales.....	58
2.1.1 Equipos y procesadores.....	58
2.1.2 Programas de modelado molecular y visualizadores.....	58
2.1.3 Herramientas de bioinformática en línea.....	59
2.2 Metodología Experimental.....	59
2.2.1 Obtención de los modelos estructurales de las enzimas nativas de la 6-PGDH.....	59
2.2.1.1 Identificación y selección de la enzima de referencia.....	59
2.2.1.2 Modelado por homología de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.....	60
2.2.1.3 Validación de los modelos obtenidos.....	61
2.2.2 Dinámica molecular de las enzimas 6-PGDH.....	62
2.2.2.1 Preparación de las estructuras.....	62

2.2.2.2	Calentamiento.....	63
2.2.2.3	Pre-equilibrio con liberación de restricciones.....	65
2.2.2.4	Equilibrio.....	65
2.2.2.5	Producción.....	65
2.2.2.6	Validación de los modelos obtenidos.....	65
2.2.3	Análisis de trayectoria y puentes salinos.....	66
2.2.4	Clasificación de los pares iónicos.....	67
2.2.5	Enzimas mutadas Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH.....	69
2.2.6	Identificación y caracterización de la cavidad de sitio activo.....	70
2.2.7	Ensayos de posicionamiento molecular (<i>Docking</i>).....	71
2.2.7.1	Preparación del receptor Lm6-PGDH.....	71
2.2.7.2	Preparación del ligando 6PG.....	71
2.2.7.3	Posicionamiento del 6PG en el sitio activo de Lm6-PGDH.....	72
2.2.7.4	DM del complejo Lm6-PGDH/6PG.....	72
2.2.7.5	Obtención de la estructura del receptor de Hs6-PGDH.....	72
2.2.8	Construcción de la librería de compuestos a ensayar.....	73
2.2.9	Barrido virtual de la librería de ligandos.....	73
2.2.9.1	Análisis de las poses y energías de interacción de los ligandos.....	74
2.2.10	Optimización de los complejos enzima-ligando.....	74
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
3.1	Modelado molecular de la enzima 6-PGDH.....	76
3.1.1	Obtención de los modelos estructurales de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.....	77
3.1.1.1	Introducción.....	77
3.1.1.2	Modelado por homología de la estructura de la enzima 6-PGDH de <i>L. (L.) mexicana</i> y <i>T. cruzi</i>	77
3.1.1.3	Discusión.....	79
3.1.2	Dinámica molecular de las enzimas nativas y mutadas de la 6-PGDH de <i>T. brucei</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> y <i>T. cruzi</i>	79
3.1.2.1	Introducción.....	79
3.1.2.2	Preparación de las estructuras de las enzimas 6-PGDH para la dinámica molecular.....	80
3.1.2.2.1	Minimización de energía.....	80
3.1.2.2.2	Protocolo de simulaciones.....	81
3.1.2.2.3	Validación de las estructuras de la enzima 6-PGDH obtenidas con DM.....	82
3.1.2.2.4	Discusión.....	86
3.2	Pares iónicos inter sub-unidades en la 6-PGDH de Kinetoplastidas. 87	
3.2.1	Introducción.....	88
3.2.2	Ubicación de los pares iónicos en la 6-PGDH de Kinetoplastidas.....	88

3.2.3	Análisis de las trayectorias de DM para las enzimas 6-PGDH de Kinetoplastidas.	90
3.2.4	Enzimas nativas.....	94
3.2.4.1	Par iónico 1.	94
3.2.4.2	Par iónico 2.	94
3.2.4.3	Par iónico 3.	95
3.2.4.4	Par iónico 4.	96
3.2.4.5	Par iónico 5.	97
3.2.5	Enzimas mutadas.	98
3.2.5.1	Par iónico 1.	98
3.2.5.2	Par iónico 2.	99
3.2.5.3	Par iónico 3.	99
3.2.5.4	Par iónico 4.	100
3.2.5.5	Par iónico 5.	101
3.2.6	Naturaleza de los pares iónicos inter sub-unidades en la estructura de la 6-PGDH.....	102
3.2.7	Discusión.	105
3.3	Barrido virtual de librerías en base al receptor de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.	114
3.3.1	Introducción.	115
3.3.2	Preparación de las estructuras de los receptores Lm6-PGDH y Hs6-PGDH para el barrido virtual.	115
3.3.3	Comparación de las estructuras de los complejos de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH con 6PG.	116
3.3.3.1	Hs6-PGDH y Oa6-PGDH.	116
3.3.3.2	Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.	119
3.3.4	Barrido virtual de librerías para los modelos de las enzimas Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.	125
3.3.5	Estructura de los complejos de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH con los <i>hits</i> obtenidos del barrido virtual.	130
3.3.6	Discusión.	137
4	DISCUSIÓN GENERAL.....	139
5	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	144
6	BIBLIOGRAFÍA	147
7	APÉNDICE.....	164

7.1 APÉNDICE A	165
Validación de los modelos obtenidos por homología para Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.	
7.2 APENDICE B	170
Validación de la trayectoria de DM de las enzimas nativas y mutadas de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.	
7.3 APÉNDICE C	173
Superposición de la estructura de la 6-PGDH de <i>L. (L.) mexicana</i> con los de otras especies <i>T. brucei</i>, <i>T. cruzi</i>, <i>H. sapiens</i> y <i>O. aries</i>.	
7.4 APÉNDICE D	174
Códigos de acceso para los 780 compuestos de la librería química construida en las bases de datos ZINC y Malaria Box.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Distribución mundial de la leishmaniasis.....	22
Fig. 1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	24
Fig. 1.3. Estructura química de los fármacos utilizados a la fecha contra la leishmaniasis.....	25
Fig. 1.4. Pasos catalíticos de la reacción enzimática de la 6-PGDH.....	28
Fig. 1.5. Esquema del mecanismo catalítico propuesto por sub-unidad para la 6-PGDH.....	30
Fig. 1.6. Sub-unidad A de la 6-PGDH de <i>T. brucei.</i>	31
Fig. 1.7. Complejo del dímero de la enzima 6-PGDH de <i>L. lactis</i> con sustrato y NADP ⁺	32
Fig. 1.8. Superposición de los dímeros de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.....	36
Fig. 1.9. Sitio activo de la 6-PGDH de <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> y <i>L. (L.) mexicana</i>	39
Fig. 1.10. Inhibidores selectivos de la Tb6-PGDH.	44
Fig. 1.11. Estructuras de nuevos inhibidores <i>in vitro</i> encontrados por barrido virtual de librerías para la enzima de Tb6-PGDH	45
Fig. 2.1. Preparación de la proteína para realizar la simulación utilizando condiciones periódicas de contorno (celda con dimensiones $a \times b \times c$) y agua como solvente.....	64
Fig. 2.2. Nomenclatura de los átomos en los residuos involucrados en los puentes de interés en la enzima 6-PGDH.....	67
Fig. 2.3. Centroides para los grupos cargados en las cadenas laterales de los AA involucrados en los pares iónicos entre sub-unidades bajo estudio de la 6-PGDH	68
Fig. 2.4. Tipos de interacciones entre pares iónicos presentes en proteínas: (a) Puente salino (b) Par N-O (c) Par iónico de largo alcance.....	69
Fig. 3.1. Validación de las trayectorias de DM para las estructuras de enzimas nativas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas respecto a energía y RMSD.	83
Fig. 3.2. Evolución de la estructura secundaria de Tb6-PGDH en el tiempo de simulación.	86
Fig. 3.3. Dímero de la 6-PGDH en distintos Kinetoplastidas.....	89
Fig. 3.4. Distancia entre centroides (r) en función del tiempo para los pares iónicos presentes en las enzimas 6-PGDH nativas y mutadas (del lado AB del homodímero).....	92
Fig. 3.5. Distancia entre centroides (r) en función del tiempo para los pares iónicos presentes en las enzimas 6-PGDH nativas y mutadas (del lado BA del homodímero).....	93

Fig. 3.6. Porcentaje de ocurrencia de interacciones de tipo puente salino, par N-O y par de largo alcance en los pares iónicos (2, 3 y 4) en enzimas 6-PGDH nativas y mutadas.....	104
Fig. 3.7. Superposición de la 6-PGDH de Kinetoplastidas con la superficie accesible al solvente SAS de la cavidad del sitio activo.....	107
Fig. 3.8. Estructura de Lm6-PGDH con sus pares iónicos inter sub-unidades respecto al sitio activo.....	108
Fig. 3.9. Comparación de los complejos enzima/sustrato de Oa6-PGDH y Hs6-PGDH.....	118
Fig. 3.10. Comparación complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH	119
Fig. 3.11. Residuos de importancia para la catálisis de la 6-PGDH de <i>L. (L.) mexicana</i> y mamíferos.....	120
Fig. 3.12. Volumen de la cavidad del sitio activo en los complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH	121
Fig. 3.13. Tallo de la sub-unidad (B) en la cavidad de los complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH respecto a la ubicación de NADP ⁺ y al 6PG	124
Fig. 3.14. Estructuras químicas de los mejores compuestos obtenidos por barrido virtual de la librería para Lm6-PGDH.....	128
Fig. 3.15. Modos de unión del compuesto (1) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH y Hs6-PGDH	134
Fig. 3.16. Modos de unión del compuesto (3) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH y Hs6-PGDH	135
Fig. 3.17. Modos de unión del compuesto (5) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Parámetros cinéticos de la enzima 6-PGDH entre diferentes especies.	34
Tabla 1.2. Identidad de secuencia de AA de la 6-PGDH en diferentes organismos	34
Tabla 1.3. AA involucrados en la formación de puentes salinos entre sub-unidades en la forma dimérica de la enzima 6-PGDH de <i>T. brucei</i> . Comparación con los residuos presentes en la secuencia de <i>L. (L.) mexicana</i> y <i>T. cruzi</i>	38
Tabla 2.1. Características de la estructura cristalina de la enzima plantilla Tb6-PGDH.	60
Tabla 2.2. Sistemas simulados para enzimas nativas de la 6-PGDH.	66
Tabla 2.3. Pares iónicos inter sub-unidades presentes en las enzimas nativas y mutadas de Tb6-PGDH, Lm6-PGDH, Tc6-PGDH.	70
Tabla 2.4. Sistemas simulados para enzimas mutadas de la 6-PGDH.	70
Tabla 3.1. Modelado por homología de las enzimas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH respecto a Tb6-PGDH.	78
Tabla 3.2. Elementos de estructura secundaria de Tb6-PGDH en la minimización con restricciones de Tb6-PGDH.	82
Tabla 3.3. Validación de los modelos de las enzimas nativas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas durante las etapas de DM.	85
Tabla 3.4. Frecuencia de los tipos de pares iónicos de acuerdo a su geometría en la trayectoria de DM para las enzimas nativas y mutadas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas.	91
Tabla 3.5. Residuos del extremo C-terminal de la enzima 6-PGDH en diferentes especies, comparados con la formación de puentes salinos en Tb6-PGDH.	113
Tabla 3.6. Compuestos con menor EI obtenidos del barrido virtual de los complejos con Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.	127
Tabla 3.7. Propiedades ADME para los compuestos con mayor afinidad por Lm6-PGDH.	129

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis.

1.1.1. Características generales.

Los parásitos protozoos del género *Leishmania* son causantes de la enfermedad conocida como leishmaniasis, la cual es endémica en aproximadamente 88 países pertenecientes a zonas tropicales y sub-tropicales (Figura 1.1), donde se encuentran por lo menos 350 millones de personas en riesgo¹.

Esta enfermedad presenta un amplio rango de manifestaciones clínicas, las cuales pueden estar asociadas tanto a las distintas especies del parásito como a la respuesta inmunológica del hospedador². Las principales formas en las que se presenta son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) la cual se caracteriza por la presencia de úlceras localizadas que, por lo general, desaparecen espontáneamente; leishmaniasis mucocutánea (LMC), ésta produce lesiones en las cavidades oral, nasal y faríngea, causando la destrucción de las mismas; leishmaniasis cutánea difusa (LCD), presenta nódulos diseminados en todo el cuerpo y leishmaniasis visceral (LV), la cual es conocida como kala-azar, y es la forma más severa de la enfermedad, pudiendo llegar a ser fatal de no ser tratada^{1,3}, sobre todo en niños.

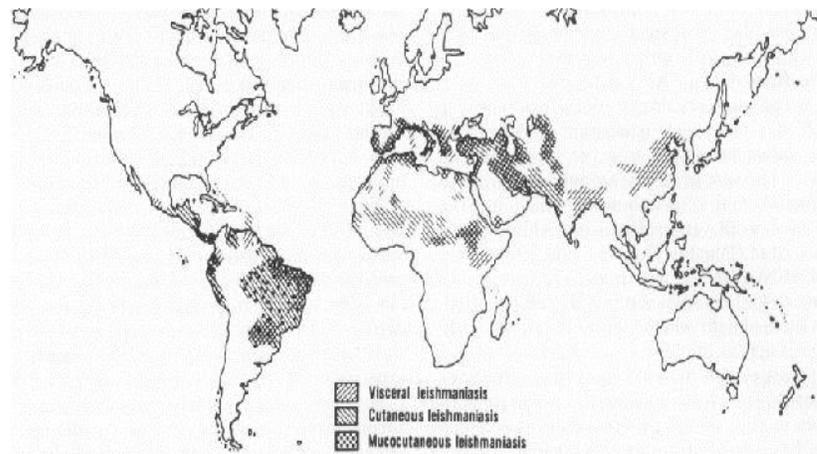


Fig. 1.1. Distribución mundial de la leishmaniasis.

En Venezuela la leishmaniasis está ampliamente distribuida en 21 de los 23 estados, especialmente en la región Andina, y en grandes poblados rurales de los estados Miranda, Carabobo, Bolívar, Zulia, Aragua y Yaracuy⁴. Se reportan en promedio tres mil nuevos casos por año de leishmaniasis en el país, con prevalencia de la forma cutánea, de acuerdo a los datos más recientes publicados por el Instituto de Biomedicina⁵.

1.1.2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Leishmania pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania*.⁶ Los kinetoplastidos son organismos unicelulares que poseen una estructura característica llamada kinetoplasto, encontrándose en su interior el DNA del kinetoplasto (KDNA). El género *Leishmania* se clasifica en dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*) de acuerdo al desarrollo del parásito en el tracto digestivo del insecto vector. En el primero los promastigotes se desarrollan en la región media y posterior del insecto (región Suprapylaria), mientras que en el subgénero *Viannia* los parásitos están restringidos a la región anterior (región Perypylaria).

La leishmaniasis es transmitida por medio de las picaduras de insectos hematófagos pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.⁶ En el tracto digestivo del insecto vector los parásitos se encuentran en la forma de promastigote (flagelado, mótil). Durante la picadura, el insecto infectado inocula los promastigotes al hospedador vertebrado, donde son fagocitados por los macrófagos y alojados en el fagolisosoma, allí se transforman en amastigotes, perdiendo su flagelo y adquiriendo una forma redondeada. Posteriormente, los amastigotes se multiplican por fisión binaria, provocando la lisis del macrófago, y liberándose al medio extracelular donde pueden infectar otros macrófagos. Los macrófagos infectados son ingeridos por el insecto durante su alimentación, liberándose así los amastigotes, los cuales se transforman inmediatamente en promastigotes procíclicos y sufren un proceso de

transformación bioquímica hasta convertirse nuevamente en promastigotes infectivos,⁶ por ello el ciclo de vida de *Leishmania* es digenético (Figura 1.2).

1.1.3. Fármacos utilizados en los tratamientos actuales.

Una vez que la leishmaniasis es diagnosticada se trata mediante quimioterapia y en este sentido encontrar un tratamiento óptimo ha resultado difícil, ya que el éxito del mismo depende de la especie del parásito, la severidad del estado en que se encuentre el paciente, el lugar donde se infecte el individuo y su estado nutricional e inmunológico.⁷⁻¹¹ Se han descrito más de veinte fármacos como eficientes, sin embargo, sólo algunos son utilizados en el manejo clínico de esta patología. Aquellos que se recomiendan en la actualidad incluyen la línea de antimoniales pentavalentes (Pentostam[®] de GlaxoSmithKline), antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime[®] Aventis), Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) y su formulación en liposomas como Ambisome[®] (Gilead), y la Pentamidina (Aventis) (Figura 1.3).

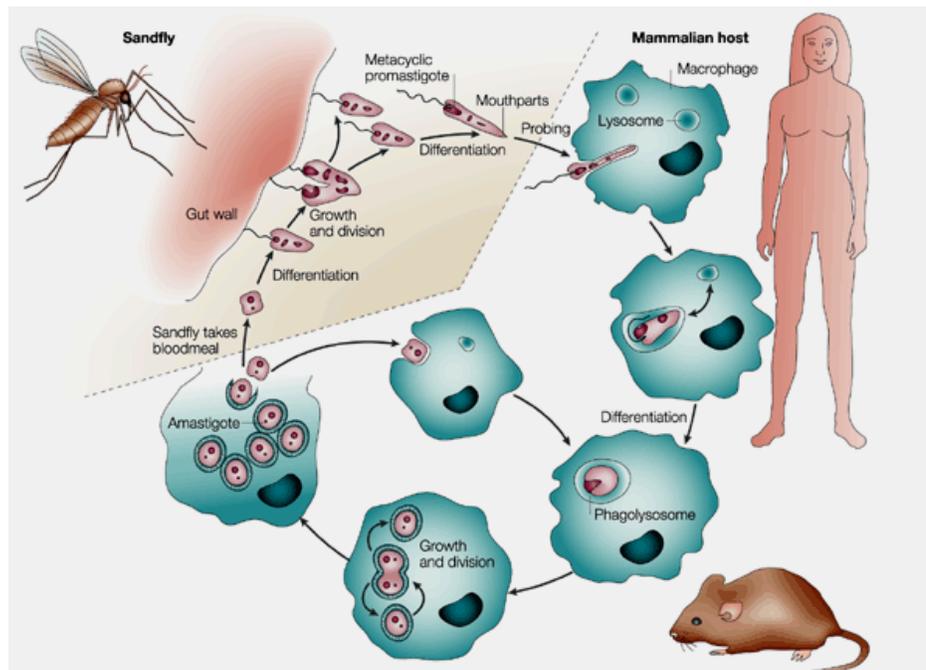


Fig. 1.2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Los antimoniales se introdujeron hace más de cincuenta años y continúan siendo los fármacos clásicos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis. Sin embargo, estos compuestos tienen sus limitaciones, ya que requieren de largos períodos de administración, su eficacia es variable y se ha encontrado un incremento de la resistencia del parásito a ellos.

Desde 1960 se ha utilizado la anfotericina B, un antibiótico poliénico que se administra vía parenteral como deoxicolato, y desde 1997 en liposomas (Ambisome). La anfotericina B¹² ha probado ser un fármaco altamente efectivo para el tratamiento de formas de *Leishmania* resistentes a los antimoniales, pero no es de fácil administración debido a su toxicidad, sus efectos secundarios y la necesidad de administrarse lentamente. Sus formulaciones en liposomas tienen toxicidad reducida y mayor tiempo de vida media en el plasma, pero sus elevados costos han limitado su uso.¹³ Como alternativas al tratamiento con antimoniales se han utilizado fármacos de segunda línea como la Pentamidina y la Paromomicina desde 1987, y el Ketoconazol y la Dapsona, más recientemente. La utilidad de la diamidina y pentamidina como nuevas drogas anti-leishmania también se ve limitada debido a su toxicidad.

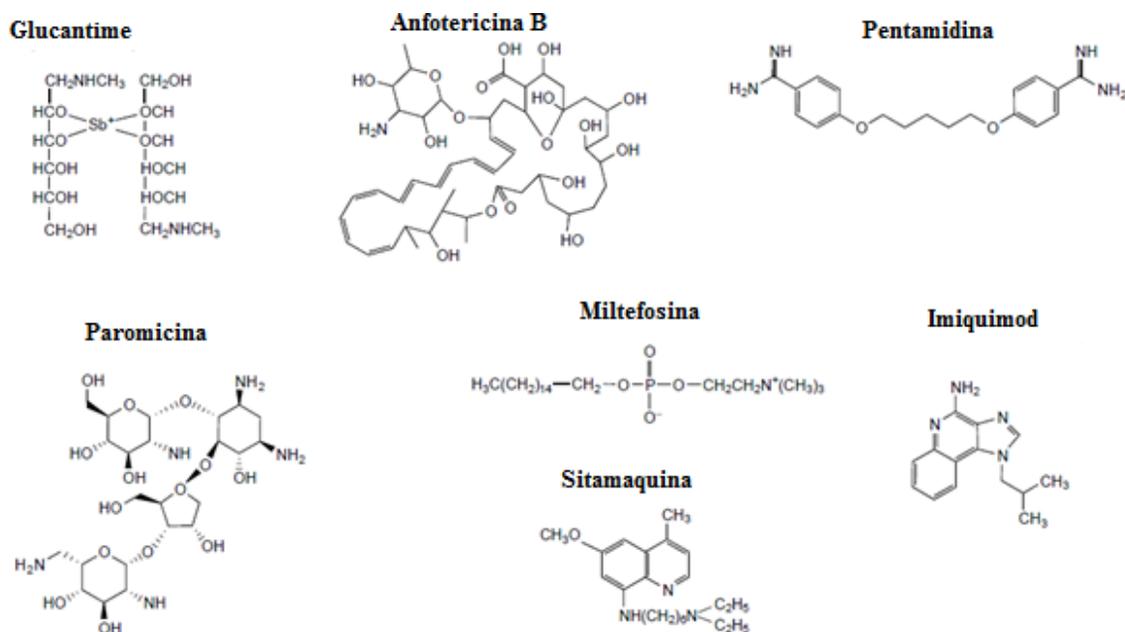


Fig. 1.3. Estructura química de los fármacos utilizados a la fecha contra la leishmaniasis (modificada de la ref. 7)

En 1980 se demostró la actividad *in vitro* de la miltefosina (Zentaris)¹⁴ contra amastigotes de *Leishmania* alojados en macrófagos y en modelos de infección en ratones. En 2002 se aprobó su uso como primer fármaco oral y los estudios pre-clínicos han sugerido elevados porcentajes de cura, sin embargo, su tiempo de vida media es relativamente largo y favorece la selección de parásitos quimio-resistentes, al menos en condiciones *in vitro*.¹⁵⁻¹⁷ En Venezuela, el tratamiento incluye el fármaco Glucantime® o la inmunoterapia a partir de 1987.

En resumen, la farmacopea disponible contra la leishmaniasis está lejos de ser satisfactoria. Está constituida por los mismos medicamentos utilizados desde comienzos del siglo XIX, exceptuando la miltefosina. En Fase II de evaluación clínica se encuentran actualmente el imiquimod (un inmunomodulador), y una combinación de paromicina con gentamicina y surfactantes para su uso tópico.^{18,19} No obstante, es una necesidad renovar los tratamientos, en el sentido de encontrar compuestos estructuralmente diferentes, que puedan servir como líderes para nuevos medicamentos, permitan aumentar la comprensión de su mecanismo de acción y superen las limitantes de los ya empleados.

1.2 La enzima 6-PGDH como blanco terapéutico.

1.2.1 Bioquímica.

Los Kinetoplastidas (*Leishmania* y *Trypanosoma*) son organismos unicelulares que han desarrollado soluciones alternativas para manejar las vías del catabolismo de carbohidratos.²⁰ Estos organismos presentan características especiales que los distinguen de otras especies, entre las que destacan la especificidad de los parásitos del metabolismo de los esteroides, el sistema de la tripanotionina en sustitución del glutatión para eliminar iones oxidados y el tener un organelo donde se encuentran las enzimas relacionadas con la glicólisis, el glicosoma.²¹

Mientras que la mayoría de las otras células eucariotas, incluyendo el hospedador mamífero, tienen todas sus enzimas glicolíticas presentes en el

compartimiento citosólico, los Kinetoplastidas tienen las primeras siete enzimas de la glicólisis, dos enzimas del metabolismo del glicerol y varias enzimas de la ruta de las pentosas fosfato^{22,23} (*Pentose Phosphate Pathway*, PPP) dentro de un organelo separado llamado glicosoma. La asunción de que una compartimentalización de una gran cantidad de rutas dentro de un organelo le daría a sus enzimas suficientes diferencias respecto a aquellas en el citosol del hospedador y que por lo tanto serían buenos blancos para el desarrollo de nuevos fármacos anti-tripanosomatideos, ha motivado la búsqueda de blancos terapéuticos en esa dirección, en el estudio del glicosoma y las rutas que contiene.

La glucosa es metabolizada por la ruta glicolítica (la glicólisis también se ha considerado como un buen blanco potencial dado que es la única fuente de ATP para la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*²⁴) y por la PPP. Mientras que el papel de la glicólisis es la generación de ATP y piruvato, la PPP está involucrada principalmente en el mantenimiento de la reserva de NADPH celular, el cual puede servir como donador de hidrógeno (en forma de hidruro) en la biosíntesis reductiva, particularmente en la producción de lípidos y en la defensa contra estrés oxidativo, vía sistema del tripanotión.²⁰ En particular, la tercera enzima de la fase oxidativa de la PPP, la 6-PGDH, es considerada como blanco quimioterapéutico por varias razones. La delección del gen que codifica a la 6-PGDH ha sido letal para otros organismos, probablemente porque disminuye la producción de Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato (NADP⁺) que constituye el poder reductor para proteger al organismo en presencia de especies reactivas de oxígeno.^{25,26} La 6-PGDH se encarga de catalizar la reacción de descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato (6PG) y producir, además de NADPH, ribulosa-5-fosfato (Ru5P) el cual es utilizado en la biosíntesis de nucleótidos. Además, se sabe que la acumulación del 6PG es tóxica en todas las células eucariotas estudiadas ya que este sustrato es un potente inhibidor de la enzima fosfogluconasa isomerasa bloqueando así la glicólisis.²⁷ En particular respecto a la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana*, Lm6-PGDH, al igual que en tripanosomas, ya se ha mostrado que tiene una localización dual, donde la mayor actividad se encuentra en el citosol (80%) y el resto (20%) apunta hacia el glicosoma,²⁸ lo que sostiene la idea de la

compartimentalización de al menos la fase oxidativa de la PPP en dicho organismo.

El mecanismo de acción aceptado para la 6-PGDH ha sido propuesto de acuerdo al estudio de las estructuras cristalinas disponibles para la enzima de diferentes especies: *Ovis aries*,²⁹ *Trypanosoma brucei*,³⁰ *Lactococcus lactis*,³¹ *Escherichia coli*,³² *Klebsiella pneumoniae*,³² *Candida utilis*³³ y *Saccharomices cerevisiae*.³⁴ El análisis de las diferentes estructuras de los complejos enzima-ligando reportadas hasta la fecha demuestra que los residuos de la 6-PGDH que actúan como ácido y base general son E190 y K183, respectivamente, y se conservan en el sitio activo en todas las especies estudiadas. De acuerdo al mecanismo propuesto la reacción³² comienza cuando la base general acepta un protón del grupo hidroxilo del C3 del 6PG para que la oxidación de este grupo hidroxilo, con transferencia del hidruro del C3 del sustrato a la coenzima y así formar 3-ceto-fosfogluconato (Figura 1.4).

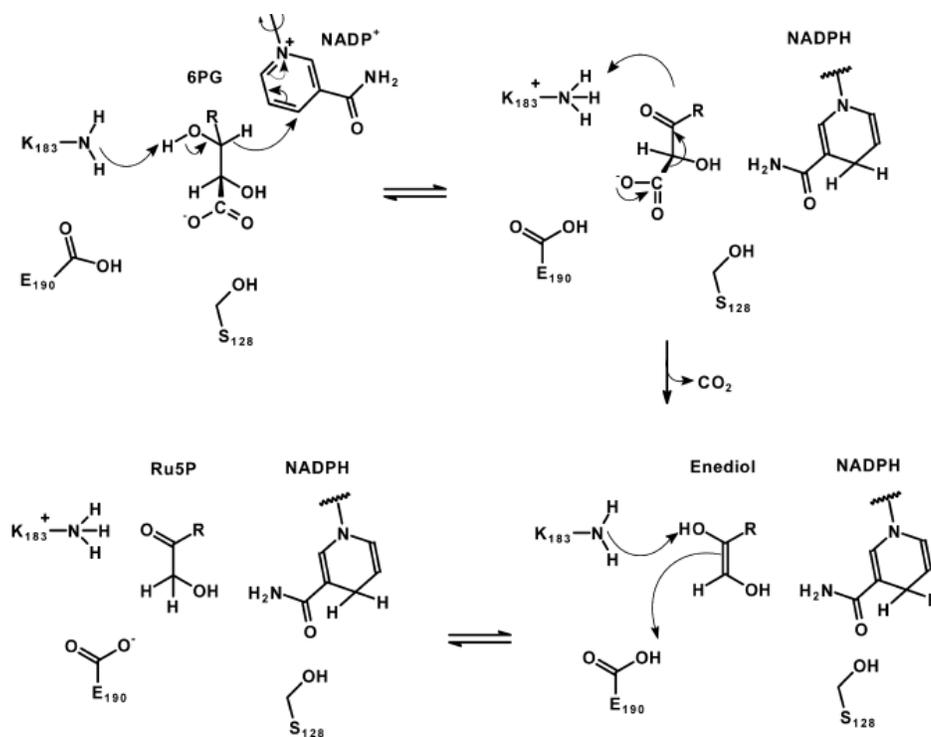


Fig. 1.4. Pasos catalíticos de la reacción enzimática de la 6-PGDH.³²

Luego, en el segundo paso, el 3-ceto-fosfogluconato resultante se descarboxila al intermediario 1,2-enodiol-6-fosfogluconato con una nueva intervención de la base general (K183) para la protonación del oxígeno del grupo carbonilo. En el último paso se necesita de un ácido general (E190) para la tautomerización que da lugar a producto, Ru5P, donde el protón es cedido también por la base general K183.

Aunque la enzima 6-PGDH es de naturaleza homo-dimérica y, por lo tanto, dispone de dos sitios de unión a 6PG y a NADP⁺, diferentes estudios han apoyado la hipótesis mecanística según la cual la reacción ocurre en cada sub-unidad del dímero por separado y no de manera simultánea (Figura 1.5), es decir, la oxidación del 6PG en el sitio activo ocurre con la entrada del cofactor a la cavidad de una sub-unidad primero, para su oxidación y la consecuente liberación de la coenzima reducida NADPH allí mismo, y en el otro sitio activo la reacción ocurrirá en otra secuencia de pasos iguales pero posteriores.³² Así solo un sitio activo cataliza a la vez, en un mecanismo con cambios conformacionales alternos en las correspondientes sub-unidades que involucran varios AA al unirse el NADP⁺, consistente con la asimetría encontrada entre las sub-unidades de las estructuras cristalinas que tienen el cofactor en comparación a las que no lo tienen.^{30,31} Por otro lado, experimentos con mutaciones y efectos isotópicos de carbono-13 (¹³C) han revelado el papel de los residuos Y191, K260, T262, R287 y R446 (este último del monómero B) los cuales contribuyen significativamente a la afinidad de la enzima con el sustrato, además de asegurar la orientación adecuada del 6PG y los ajustes conformacionales necesarios en el sitio activo para la catálisis. Todos los resultados indican que el paso determinante de la velocidad es la descarboxilación (paso 2).³³

Además de su importancia bioquímica cabe destacar el hecho de que la enzima 6-PGDH en parásitos como *L. (L).mexicana*, *T. brucei* y *T. cruzi* presenta diferencias estructurales a nivel molecular respecto a su contraparte en mamífero que podrían ser explotadas en el desarrollo de un nuevo fármaco.

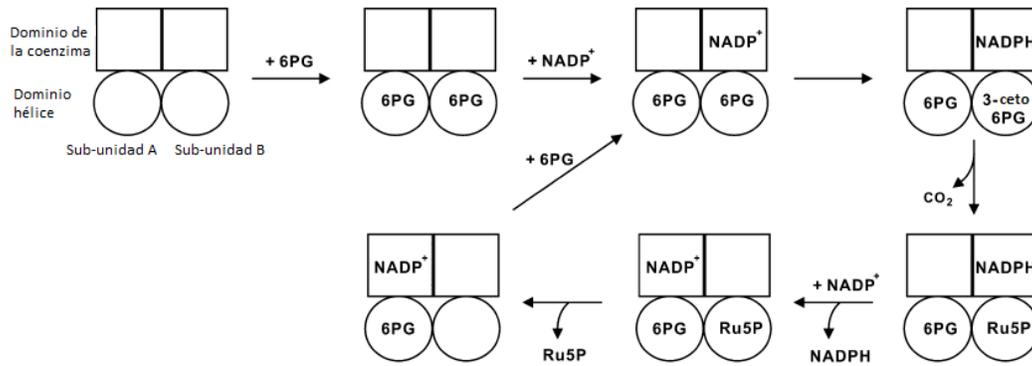


Fig. 1.5. Esquema del mecanismo catalítico propuesto por sub-unidad para la 6-PGDH.³²

A continuación se describe la estructura de la 6-PGDH y esas características diferenciales que han permitido considerarla un potencial blanco terapéutico selectivo.

1.2.2 Estructura de la enzima 6-PGDH.

Hasta la fecha se encuentran depositadas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, *Protein Data Bank*) diecisiete estructuras correspondientes a la enzima 6-PGDH para diferentes organismos, que han sido resueltas con la técnica de rayos-X. Entre ellas se cuentan las enzimas ya mencionadas de *O. aries*,²⁹ *T. brucei*,³⁰ *L. lactis*,³¹ *E. coli*,³² *K. pneumoniae*,³² *C. utilis*,³³ *S. cerevisiae*³⁴ y además, las estructuras de *Geobacillus stearothermophilus*,³⁶ *Geobacter metalloreducens*,³⁷ y la de la contraparte humana de esta enzima, *Homo sapiens*.³⁸

Las características más resaltantes encontradas para la enzima 6-PGDH de las diferentes especies estudiadas, a nivel de secuencia de AA, estructura y cinética, se compendian como sigue:

- La estructura de la 6-PGDH es un homo-dímero, en el cual cada monómero (o sub-unidad) tiene tres dominios y este tipo de plegamiento es característico sin importar la especie.³⁰ En la Figura 1.6 se observan los dominios en el monómero de la enzima de *T. brucei*, Tb6-PGDH. El dominio de la coenzima, (dominio I), N-terminal (residuos 1-178) contiene un típico plegamiento de Rossmann (1 a 130, β A... β F con las hélices incluidas) para la unión al nucleótido, y una unidad

adicional α - β - α (132 a 162, α F- β G- α g) con la hoja β G antiparalela a las primeras seis láminas. El dominio hélice (dominio II), comprende desde el residuo 179 hasta el 441, con α -hélices que proporcionan gran parte de la superficie dimérica (α h...ar), y el tallo (dominio III), que incluye los residuos 442-478 (α s...extremo C-terminal).

- La forma activa de la 6-PGDH es un homo-dímero y su formación comprende la interacción del tallo de una sub-unidad con el dominio hélice de la otra, conformando así gran parte de la interfase dimérica por residuos de ambas unidades. Esta forma de dimerizar se mantiene en todas las especies ya estudiadas.

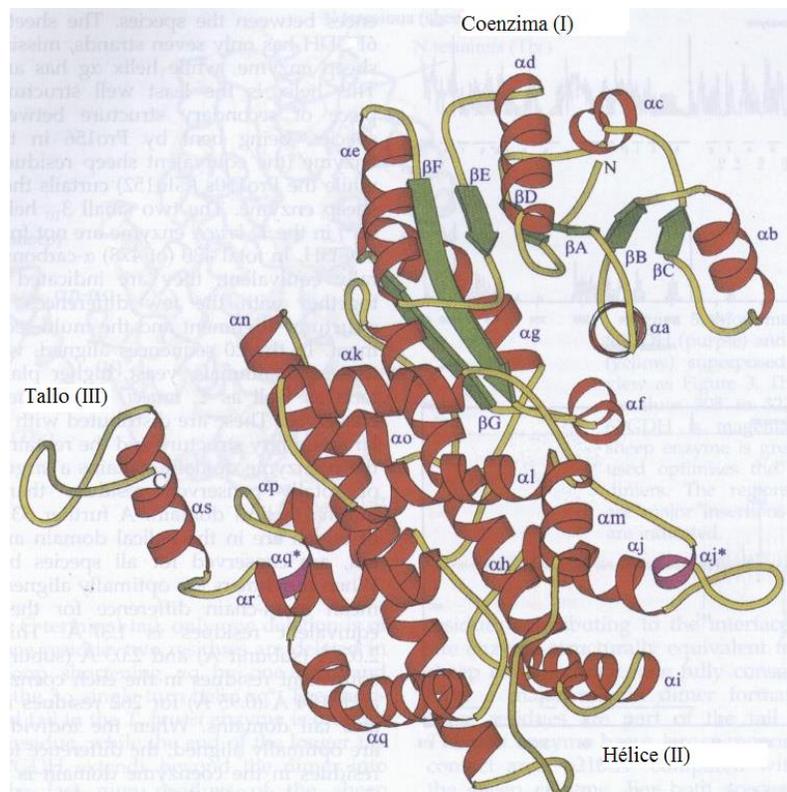


Fig. 1.6. Sub-unidad A de la 6-PGDH de *T. brucei*. Elementos de estructura secundaria: láminas β en verde, α -hélices en rojo y dos hélices 3.10 pequeñas en morado (Figura modificada de la ref. 30).

- La coenzima, NADP^+ , se une en la periferia del dominio I, por eso se conoce como el dominio de la coenzima, tal y como se ha reportado para la enzima 6-PGDH de bacteria *L. lactis*,³¹ LI6-PGDH, donde además se obtuvo el dímero co-cristalizado con el inhibidor ácido 4-fosfo-D-eritronohidroxámico, PEX (por sus siglas en inglés, *4-phospho-D-erythronohydroxamic acid*) (Figura 1.7).
- En la enzima de mamíferos, como la 6-PGDH de *O. aries*, Oa6-PGDH y *H. sapiens*, Hs6-PGDH, la “huella dactilar” del sitio de unión a la coenzima es GxAxxG mientras que en *Tripanosoma*, como Tb6-PGDH, es GxGxxG.³⁹ El cambio en el residuo central de alanina por glicina influye en la estructura de la cavidad en que interactúa el NADP^+ con la enzima, aunque la enzima del parásito mantenga todos los residuos en contacto directo con el sustrato y la mayoría de los que se unen con la coenzima incluyendo la altamente conservada R33, que ha sido referido como el principal factor de discriminación para el NADP^+ .³⁵

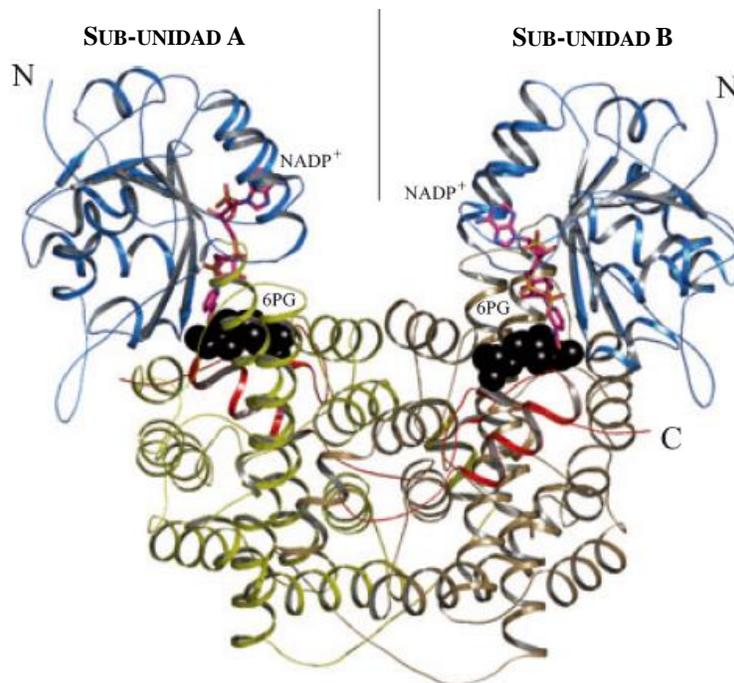


Fig. 1.7. Complejo del dímero de la enzima 6-PGDH de *L. lactis* con sustrato y NADP^+ . (Esferas negras para representar el sustrato en el centro catalítico; la coenzima se muestra en modelo de barras: C rosado, N azul, O naranja P amarillo) (Modificada de la ref. 31).

En este sentido, al comparar el sitio activo de la enzima en un complejo de Oa6-PGDH con un análogo del cofactor, el 8-bromoadenina dinucleótido fosfato (NBr⁸ADP⁺) y la forma apo de Tb6-PGDH, se observa que la presencia de la glicina central en la región de huella dactilar de unión a la coenzima en la enzima del parásito permite una mejor interacción con el NADP⁺, en comparación a la alanina de la enzima de oveja, probablemente porque la presencia de la glicina en la cavidad facilita el posicionamiento del cofactor en ella por razones de tipo estérico. Este factor estructural ha permitido explicar las altas afinidades encontradas para la enzima Tb6-PGDH, en comparación con la enzima de Oa6-PGDH, para diversos inhibidores (análogos de sustrato y coenzima).⁴⁰

- En relación a la enzima Lm6-PGDH, se ha reportado recientemente que es inestable y por tanto difícil de obtener sin que se desnaturalice, inclusive en medios acuosos a pH fisiológico,⁴¹ como ya se había encontrado también para la enzima 6-PGDH de *Trypanosoma cruzi*, Tc6-PGDH,⁴² razón por la cual no ha sido posible obtener sus estructuras cristalinas.
- Los valores de la constante de Michaelis k_m para la enzima Tb6-PGDH respecto al sustrato y a la coenzima (Tabla 1.1) concuerdan con la mayor sensibilidad encontrada para ella frente a algunos inhibidores, cuando se compara con la enzima de mamífero.⁴¹ De los datos de esta tabla se observa que el valor de k_m de *T. brucei* para 6PG y NADP⁺ es menor a cualquiera de los reportados para *O. aries*, *L. (L.) mexicana*, *T. cruzi* y *H. sapiens*. La enzima de *L. (L.) mexicana* muestra valores intermedios entre *T. brucei* y *T. cruzi* y menores a los de la enzima humana.
- La comparación de la secuencia de AA de Tb6-PGDH con la de la enzima de oveja resulta en un porcentaje de identidad bastante bajo 31,57% (Tabla 1.2). En este caso, y como ya se mencionó, se han podido adjudicar las diferencias en las afinidades de las enzimas de ambas especies hacia diferentes inhibidores, a cambios estructurales en el sitio de unión a la coenzima.

Tabla 1.1. Parámetros cinéticos de la enzima 6-PGDH entre diferentes especies.*

Organismo	6PG k_m (μM)	NADP ⁺ k_m (μM)
<i>T. brucei</i>	3,5	1,5
<i>L. (L.) mexicana</i>	6,9	5,2
<i>T. cruzi</i>	22	5,9
<i>O. aries</i>	16	7,0
<i>H. sapiens</i>	20	30

*Tomados de ref. 41.

Tabla 1.2. Identidad de secuencia de AA^{*} de la 6-PGDH en diferentes organismos[†].

	A	B	C	D	E	F
A <i>L. (L.) mexicana</i>	100					
B <i>T. brucei</i>	71,19	100				
C <i>T. cruzi</i>	71,40	78,29	100			
D <i>L. lactis</i>	36,44	35,54	35,89	100		
E <i>O. aries</i>	33,81	31,57	32,59	55,05	100	
F <i>H. sapiens</i>	33,20	31,77	34,55	54,43	94,41	100

* Los valores se expresan como porcentajes, basados en número de AA idénticos que comparten las secuencias. † Se comparan las secuencias de la enzima 6-PGDH de los siguientes organismos (código FASTA): A. *L. (L.) mexicana* (AAQ234); B. *T. brucei* (P31072); C. *T. cruzi* (AAQ63816.1); D. *L. lactis* (AAC12804.1); E. *O. aries* (P00349) y F. *H. sapiens* (P52209). (Adaptada de ref. 28).

- Los datos muestran que k_m para 6PG y NADP⁺ son significativamente menores para Lm6-PGDH cuando se compara con la enzima Hs6-PGDH, y también, aunque en menor proporción, respecto a Oa6-PGDH (Tabla 1.1). La enzima Lm6-PGDH también comparte bajos porcentajes de identidad de secuencia de AA con su contraparte en mamíferos: 33,81% con oveja y 33,20% con humana (Tabla 1.2). Estos resultados han permitido sugerir que un análisis detallado de sus estructuras podría racionalizar las diferencias en las constantes cinéticas observadas, posiblemente en base a la existencia de un factor de discriminación estructural entre la enzima Lm6-PGDH con la de humano,⁴¹ como ha sido encontrado para Tb6-PGDH. Por otra parte, al examinar los datos cinéticos para Lm6-PGDH se encuentra que tiene valores de k_m intermedios, para sustrato y coenzima, en relación a los encontrados para las enzimas de Tb6-PGDH y Tc6-PGDH. La enzima Lm6-PGDH comparte un alto porcentaje de identidad de secuencia de AA con Tb6-PGDH (71,19%) y Tc6-PGDH (71,40%).

- El modelo obtenido por homología para la enzima Lm6-PGDH ha permitido sustentar la hipótesis que relaciona las diferencias en el comportamiento cinético con diferencias estructurales de la enzima 6-PGDH, y es que todas las investigaciones apuntan a que detalles estructurales característicos de Tripanosomatideos, *L. (L.) Leishmania* y mamíferos inciden en la afinidad por inhibidores.
- En dicho modelo de Lm6-PGDH también se identifican los tres dominios presentes en las otras especies: el dominio I, el de la coenzima (residuos 1-178); el dominio II o hélice (residuos 179-441) y el dominio III o tallo (442-478), y cuando se compara con la estructura cristalina de Hs6-PGDH, se nota que la proteína Lm6-PGDH tiene un tallo más corto que el de Hs6-PGDH. Además, en la enzima humana el sitio de unión a la coenzima se encuentra ocluido y contiene siete aminoácidos diferentes en comparación a Lm6-PGDH (F31, N32, T34, Y35, T36 y K37) (Figura 1.8).⁴¹

La existencia de las diferencias descritas entre las estructuras de las enzimas 6-PGDH de *T. brucei*, *L. (L.) mexicana*, *T. cruzi* y la humana, pudiera ser explotada en el diseño racional de fármacos selectivos a la enzima del parásito. A partir del análisis exhaustivo de la estructura de la enzima a nivel molecular, específicamente de su sitio activo, se podrían utilizar los detalles estructurales no conservados entre especies para discriminar entre las cavidades de las enzimas del parásito y la humana, y de esa forma contribuir en el diseño de inhibidores con preferencia a la enzima del parásito.

Al mismo tiempo, la similitud encontrada entre la enzima de *Leishmania* y *Tripanosoma*, en cuanto a secuencia, estructura y bajo k_m por NADP^+ , sugiere que los inhibidores que sean ensayados con la enzima de *Leishmania* podrían también ser ensayados con *Tripanosoma* y, eventualmente, pudieran contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades como el mal de Chagas⁴³ y la enfermedad del sueño.⁴⁴

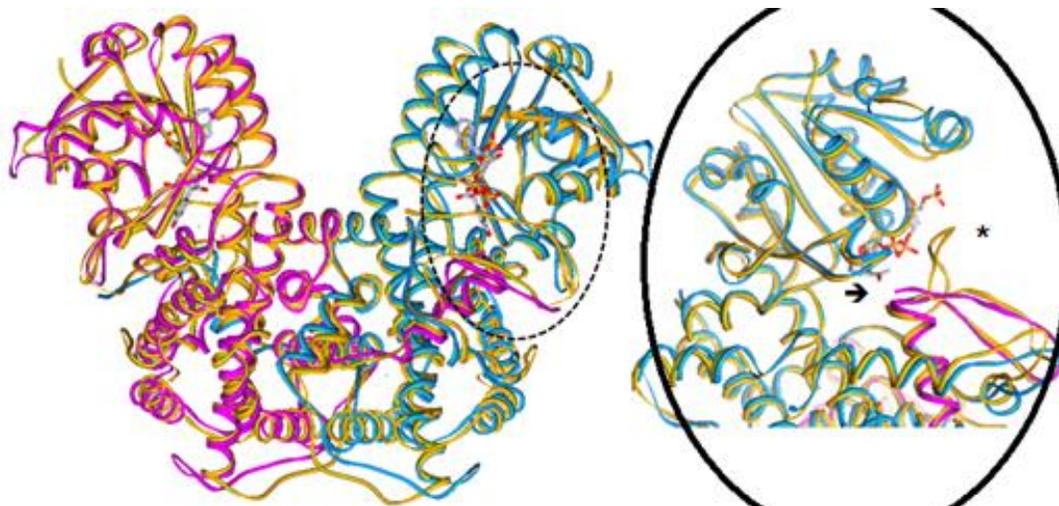


Fig. 1.8. Superposición de los dímeros de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH. Detalle del sitio de unión a la coenzima indicado por la flecha (NADPH en modelo de barras). El asterisco muestra la región con diferencias significativas entre ambas enzimas.⁴¹

1.2.3 Estabilidad cinética.

Diversos estudios cinéticos con la 6-PGDH han contribuido a la comprensión de la forma en que su estructura influye en la actividad enzimática. La 6-PGDH es un dímero cuya interfase comprende ambas sub-unidades y por tanto hay residuos de ambos monómeros. Además, se han relacionado las afinidades de la enzima por diferentes inhibidores con ciertos detalles estructurales de la misma, y también se ha encontrado que la estabilidad cinética de la enzima 6-PGDH, y por lo tanto su disponibilidad en solución para que la catálisis pueda ocurrir, es susceptible al mantenimiento de su estructura cuaternaria.

En este contexto, se llevaron a cabo ensayos cinéticos con la enzima de *S. cerevisiae*, Sc6-PGDH, y sus correspondientes enzimas truncadas (enzimas de Sc6-PGDH a las que se eliminaron 35, 39 y 53 residuos en el extremo C-terminal del dominio III o tallo), cuyos resultados han revelado que si el tallo se acorta la actividad enzimática desaparece.³⁴ A partir del análisis de la estructura cristalina del complejo de la Sc6-PGDH se sugirió que ese dominio funciona como una

“cubierta” en el sitio activo para controlar la unión del sustrato y la liberación del producto, de manera que es indispensable para la actividad de la 6-PGDH. Por esta razón al tallo se le ha adjudicado el rol de “brazo de unión”³⁴ que mantiene unidas ambas sub-unidades para formar el dímero.

El análisis de la estructura cristalina de Tb-6PGDH muestra que muchas de las interacciones que unen las sub-unidades que forman el dímero pueden ser de naturaleza electrostática (puentes salinos) y que tienen un papel especial en Tripanosomatideos.³⁰ En el tallo de cada monómero de *T. brucei*, cinco de sus residuos interactúan vía puente salino con residuos de la otra sub-unidad: dos de los cinco puentes salinos ocurren en el dominio de la coenzima (R459 → E134 y E477 → K139) y tres en el dominio hélice: (E463 → R259, R464 → D246 y D466 → H255) (Tabla 1.3).⁴¹

El hecho que ha suscitado interés respecto a estas interacciones son las diferencias observadas en el número de residuos que pueden formar puentes salinos en los tallos de las enzimas de *T. brucei*, *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*. Se ha intentado relacionar el número de puentes salinos presentes en la misma con su estabilidad cinética y la evidencia experimental más contundente para este argumento se obtuvo del estudio de la caracterización bioquímica y cinética de la enzima de *T. cruzi*.⁴² En ese trabajo se reportó que la enzima Tc6-PGDH era muy inestable para ser purificada y obtener su cristalización.

La inestabilidad observada la hizo objeto de comparación con Tb-6PGDH, donde se observó que en la secuencia de la enzima Tc6-PGDH se conserva un alto número de residuos en relación a la de *T. brucei* (71,29 % de identidad de secuencia) (Tabla 1.2), pero los cambios en dos de sus AA por otros que no son cargados (C259 y V246) resultan en la pérdida de los puentes identificados como 3 y 4 en la Tabla 1.3, por ello en la enzima Tc6-PGDH sólo tres de los puentes mencionados están presentes: R459 → E134, E477 → K139 y D466 → H255 (puentes 1, 2 y 5 respectivamente).

Tabla 1.3. AA involucrados en la formación de puentes salinos entre sub-unidades en la forma dimérica de la enzima 6-PGDH de *T. brucei*. Comparación con los residuos presentes en la secuencia de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*.

N° de puente	<i>T. brucei</i> ³⁰	<i>L. (L.) mexicana</i> ⁴¹	<i>T. cruzi</i> ⁴²
1	R459-E134	R459-E134	R459-E134
2	E477-K139	<u>A477</u> -K139* No puente	E477-K139
3	E463-R259	E463-R259	E463- <u>C259</u> * No puente
4	R464-D246	R464- E246	R464- <u>V246</u> * No puente
5	D466-H255	D466- K255	D466-H255

* Puente no observado en el modelo preliminar.

En negritas cambios en secuencia de AA respecto a Tb6-6GDH.

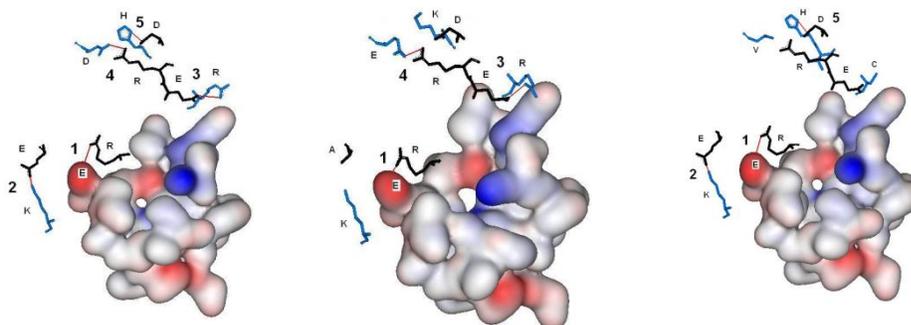
Residuo neutro subrayado.

Al restituir los puentes salinos faltantes en Tc6-PGDH con la técnica de mutagénesis sitio dirigida, se obtuvo una enzima doble mutante más estable, la cual fue utilizada para determinar parámetros cinéticos como k_m para sustrato y coenzima que se presentaron en la Tabla 1.1. Estos resultados sugieren que la inestabilidad de Tc6-PGDH es probablemente una consecuencia de las débiles interacciones entre monómeros en la interfase del dímero, dada la falta de los puentes indicados, lo que promovería su disociación con la consecuente pérdida de actividad enzimática. Por otra parte, y para extender el análisis a la enzima Lm6-PGDH que también es inestable y no pudo ser cristalizada, cuando se examina su secuencia de AA se encuentra un cambio que ocasiona la pérdida de un puente salino (el 2), respecto a los presentes en *T. brucei* (Tabla 1.3). Dicha ausencia podría incidir también en la inestabilidad cinética encontrada en la misma, como en el caso de *T. cruzi*.

Estas observaciones se han verificado a nivel estructural en el modelo obtenido por homología de *L. (L.) mexicana*, y es que cuando se revisan las distancias entre los residuos involucrados en la formación de estos puentes, se observa la falta de uno de los cinco puentes definidos en Tb6-PGDH (Figura 1.9), correspondiente a los residuos A477 → K139, y a partir de la larga distancia

encontrada entre los AA que forman el puente 5, donde se ha cambiado H por K, su ausencia también ha sido sugerida.⁴¹

En base al resultado experimental encontrado para la enzima Tc6-PGDH, y a las observaciones realizadas con modelo de Lm6-PGDH, se ha sugerido la hipótesis de que la ausencia de puentes salinos respecto a la enzima Tb6-PGDH y la inestabilidad cinética encontrada experimentalmente pudieran estar relacionadas, ya que la pérdida de interacciones entre las sub-unidades del dímero podría facilitar la disociación de la forma dimérica de dicha enzima, que es la forma activa.



N° de puente	<i>T. brucei</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>T. cruzi</i>
1	R459-E134	R459-E134 4,86/3,87	R459-E134 4,73/3,97
2	E477-K139	<u>A477</u> -K139* No puente	E477-K139 4,50/5,01
3	E463-R259	E463-R259 4,09/3,06	E463- <u>C259</u> * No puente
4	R464-D246	R464- <u>E246</u> 4,70/3,23	R464- <u>V246</u> * No puente
5	D466-H255	D466- <u>K255</u> * 6,73/4,53	D466-H255 3,67/3,23

Fig. 1.9. Sitio activo de la 6-PGDH de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. (L.) mexicana*. En color potencial electrostático: rojo negativo y azul positivo, se indican los AA involucrados en las interacciones de puente salino entre sub-unidades. Los números corresponden a las distancias de los mismos (sub-unidades AB y BA).⁴¹

1.3 Diseño racional de fármacos asistido por computadora (CADD).

El proceso de descubrimiento de un fármaco requiere de un esfuerzo interdisciplinario para diseñar compuestos efectivos y comercialmente viables. El objetivo del diseño racional es encontrar un compuesto que pueda interactuar con una proteína, o blanco específico, y modificar su actividad.^{43,44} Las proteínas que son blancos terapéuticos generalmente son aquellas que tienen funciones importantes en mantener las células vivas y los fármacos son compuestos de moléculas pequeñas que se unen a regiones específicas de la proteína y pueden activarla o desactivarla, en base a la piedra angular del reconocimiento molecular.

El diseño de fármacos asistido por computadoras (*Computer aided drug design*, CADD),^{45,46} incluye por ejemplo, métodos de *docking* o posicionamiento molecular⁴⁷ y el renombrado barrido virtual de librerías o *virtual screening*⁴⁸ con la finalidad de filtrar virtualmente una gran base de datos de compuestos para obtener los que muestren mejor interacción con el receptor. Actualmente cualquier proceso CADD incluye etapas de filtrado para los compuestos barridos de acuerdo a parámetros calculados por computadora (*in silico computer-based filters*)⁴⁹ y que están relacionados con propiedades farmacocinéticas deseables para un fármaco, como las propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad).⁵⁰ El concepto de *drug-likeness* se ha introducido para describir las características que necesita un compuesto para ser un fármaco exitoso, por ejemplo, buena solubilidad, permeabilidad intestinal, que no sea tóxico, entre otras. Claro que la predicción de cualquiera de estas propiedades por un modelo experimental o teórico no es simple, sin embargo la estimación de las mismas para la librería que se barre es una guía del perfil farmacocinético de un compuesto dado desde el inicio del proceso de diseño.

Las propiedades de compuestos tipo fármacos (*drug-like*) son propiedades fisicoquímicas que para su aplicación pueden agruparse en reglas empíricas. Un ejemplo bien conocido es la “Regla de los Cinco de Lipinski⁵¹” que establece que un compuesto probablemente no será buen candidato a fármaco (*non-druglike*) si

tiene más de cinco átomos donadores de puente de H, más de diez átomos aceptores de puente de H, masa molecular mayor a 500 g/mol y lipofilidad, medida en función del coeficiente de partición octanol-agua (LogP) mayor a 5. También existen otras propuestas como la “Regla de los Tres”, que selecciona compuestos con masa molecular promedio menor o igual a 300 g/mol, coeficiente de partición calculado clog P menor o igual a 3, número de donadores de puente de H menor o igual a 3, número de aceptores de puente de H menor o igual a 3 y número de enlaces rotables menor a 3.⁵² Recientemente, la “Regla 3/75” de Pfizer ha sido descrita y establece que compuestos con $\text{clogP} < 3$ y superficie polar topológica (TPSA) $> 75 \text{ \AA}^2$ tienen las mayores probabilidades de ser bien tolerados *in vivo*.⁵³ Se considera que los compuestos que no cumplen dos o más de esos criterios pueden tener problemas con la biodisponibilidad⁵⁴ y en general pocas probabilidades de convertirse en fármaco.

Una vez que se ha validado un blanco y, en base a este receptor, se ha preparado y barrido una librería por posicionamiento molecular (*docking* molecular), los compuestos obtenidos de esta manera son los llamados *hits* (candidatos a fármacos con actividad potencial) que podrán ser optimizados en base a filtros ADMET o del tipo estructural.⁵⁵ Todos estos pasos comprenden el descubrimiento de un líder o *lead* (candidato más probable) que luego podrán ser ensayados experimentalmente para determinar su actividad. Hoy en día todas las etapas del descubrimiento y optimización de un líder pueden ser realizadas en computadoras de forma *in silico*, proporcionando a la industria farmacéutica una metodología que ha resultado eficaz y que ha permitido ahorrar gran cantidad de tiempo y dinero.^{56,57}

1.3.1 Diseño racional de fármacos contra la leishmaniasis.

El proceso para desarrollar un nuevo fármaco es altamente costoso y debido a que la leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas, los recursos disponibles para la búsqueda de nuevos tratamientos son mucho más restringidos que aquellos asignados a enfermedades que afectan

al mundo desarrollado. En el descubrimiento, desarrollo y comercialización de un nuevo medicamento surgen problemas adicionales a las consideraciones netamente científicas, y es que muchas veces las compañías farmacéuticas se reservan las librerías químicas de compuestos que diseñan y que son probados, por lo que muchos investigadores no tienen acceso libre a esa información, que bien podría ser utilizada para no repetir búsquedas erradas o para proponer otros compuestos que mejoren a los ya conocidos y así expandir la visión del diseño de un nuevo fármaco, ahorrando tiempo, recursos y esfuerzo. También es una realidad el hecho de asegurar una patente de protección que es todo un tema comercial, ya que son costosas y muchas veces necesitan patrocinadores de la industria.^{58,59} Todo esto ha dado como resultado que muy pocos candidatos a fármacos hayan progresado con el paso de los años en el mundo de las enfermedades tropicales.

Ante la necesidad de renovar la farmacopea disponible contra *Leishmania*, resulta prometedora la identificación y validación de la 6-PGDH como parte de una aproximación racional para el desarrollo y descubrimiento de fármacos contra la leishmaniasis. La 6-PGDH se considera blanco selectivo porque su función enzimática resulta esencial para la viabilidad del parásito, y difiere lo suficiente de la del hospedador mamífero (<35% de identidad de secuencia de AA), para prevenir cualquier reactividad cruzada o interacción que pudiera resultar adversa. Para esta enfermedad el blanco para la quimioterapia es el estadio intracelular del parásito, el amastigote, que sobrevive y se divide en macrófagos causando la enfermedad.⁶ Los amastigotes residen dentro de una vacuola del macrófago la cual asemeja un lisosoma secundario con un pH de 4,5-5,0. Este medio ácido tiene implicaciones para las estrategias del amastigote en la adquisición de nutrientes y la homeostasis iónica, ellas involucran una variedad de transportadores que pudieran mediar la absorción del fármaco y su eflujo (permeando a través de tres membranas) y jugar un papel importante en determinar la susceptibilidad del parásito al compuesto. Además, el parásito *Leishmania* spp. difiere intrínsecamente en su sensibilidad a los fármacos, así

como también las formas visceral y cutánea de la infección imponen diferentes requerimientos fármaco-cinéticos de los candidatos a ser utilizados.

En este sentido y como primera aproximación al macro problema bioquímico que representa obtener un nuevo líder que sirva para desarrollar un medicamento, la contribución radica en generar esos primeros *hits* con las características estructurales, electrónicas y estéricas, que le confieran una interacción favorable con el receptor, y la más alta afinidad por la enzima, y que además cumpla con las mejores propiedades ADMET para un compuesto con alta probabilidad de mostrar actividad *in vitro*. Luego, y con pasos subsecuentes de optimización de las estructuras de esos *hits* pudiera llegar a obtenerse alguno que se considere óptimo para comenzar las pruebas a otro nivel, por ejemplo, como ensayos *in vivo* en modelos animales.

1.3.2 Inhibidores de la 6-PGDH.

En el diseño de nuevos inhibidores que puedan servir como fármacos anti Tripanosomatideos y también contra *Leishmania*, el abordaje más común ha sido el diseñar compuestos que imitaran al 6PG^{60,61} o a los intermediarios de alta energía (IAE) de la reacción: el 3-ceto-fosfogluconato y el 1,2-enodiol-fosfogluconato⁶² (Figura 1.10a). En este sentido los derivados hidroxámicos, análogos del 1,2-enodiol, mostraron ser inhibidores potentes y selectivos a la enzima del parásito Tb6-PGDH, con constantes de afinidad (K_i) en el intervalo nanomolar, siendo el ligando PEX el que destaca por ser el más potente y selectivo a la enzima del parásito *T. brucei* sobre la de mamífero Oa6-PGDH (casi 250 veces)⁶² (Figura 1.10b). Estructuralmente, los compuestos A, B y C, el PEX y sus análogos, son ácidos carboxílicos fosforilados derivados de aldosas, con pobre permeabilidad de membrana debido a su carga y polaridad que interactúan en el sitio activo de la 6PGDH descrito en este trabajo como una cavidad “polar”, adecuado para los grupos fosfato, hidroxil y carboxilato.

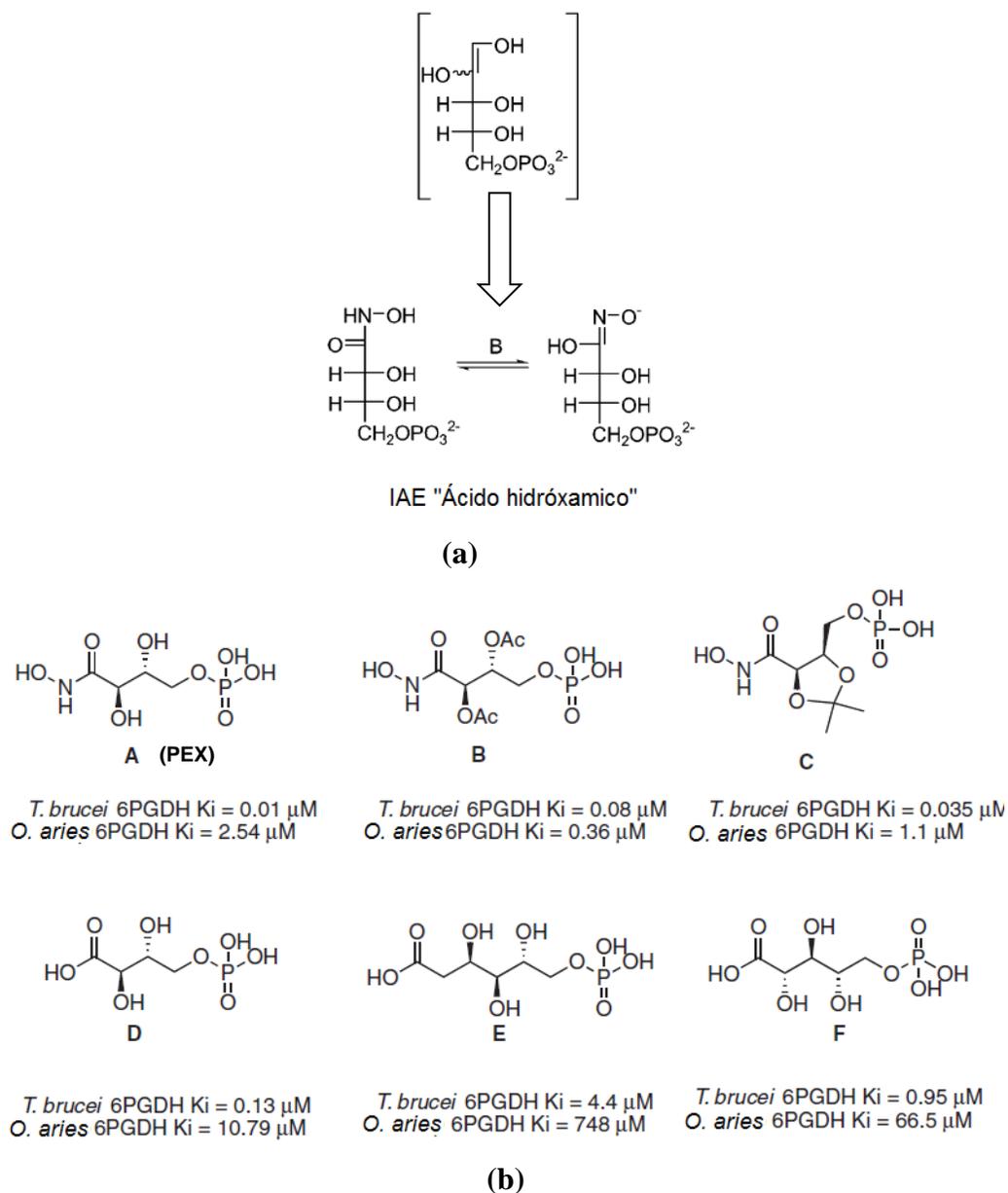


Fig. 1.10. Inhibidores selectivos de la Tb6-PGDH.
(a) Estructura del derivado de ácido hidróxamico, PEX, análogo al IAE del mecanismo propuesto para la reacción de la 6-PGDH.
(b) Inhibidores reportados para Tb6-PGDH y Oa6-PGDH.⁶²

Como estos inhibidores han sido desarrollados en referencia a una estructura polar como el IAE, también son polares, con pocas propiedades tipo fármaco (*drug-like*) y a pesar de su potencia y selectividad a la enzima del parásito, comparada con su contraparte mamífero, no tienen actividad tripanocida.⁶²

El barrido virtual de una librería privada para el receptor LI6-PGDH se realizó con el objetivo de mejorar las propiedades fisicoquímicas de los inhibidores conocidos, esto es, para hacerlos más parecidos a un fármaco, de menor polaridad y mejor permeabilidad celular.⁶³ La librería inicial contenía más de 64.000 compuestos y fue construida a partir de la búsqueda en diversas bases de datos de fragmentos que pudieran imitar las características de los grupos funcionales análogos a los del 6PG, pero de mayor pKa. El barrido virtual proporcionó siete compuestos con actividad para Tb6-PGDH (Figura 1.11) y mejores propiedades fisicoquímicas del tipo fármaco respecto a los inhibidores A,B,C (Figura 1.10), para la administración oral, con buenas eficiencias de ligando y valores de IC₅₀ en el intervalo micromolar.⁶³

La estructura de LI6-PGDH se *consideró* un buen modelo para el diseño de inhibidores con blanco a su contraparte en las especies de *Trypanosoma*, dada la conservación de los residuos encargados de unir al sustrato y al cofactor entre las enzimas Tb6-PGDH y LI6-PGDH, y también a que tiene cristalizado el complejo del dímero de la enzima con PEX, coenzima y producto Ru5P a buena resolución (2,6 Å).

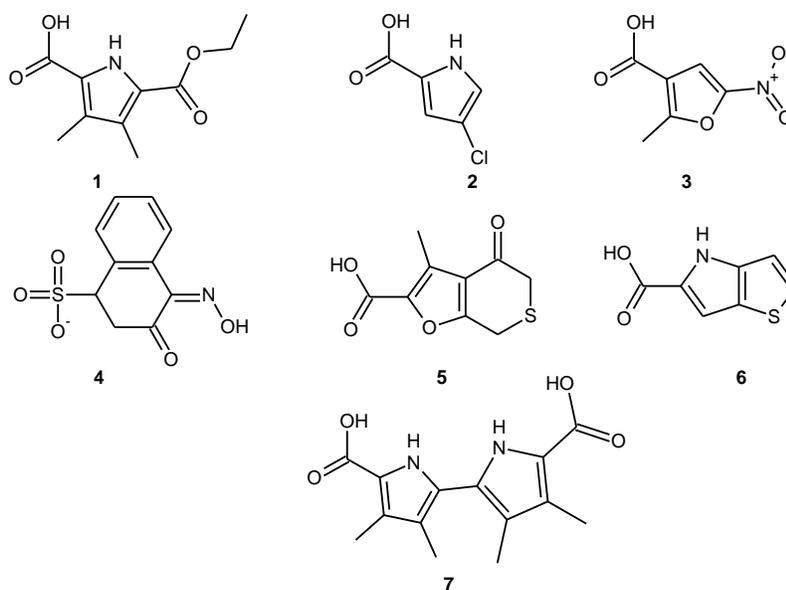


Fig. 1.11. Estructuras de nuevos inhibidores *in vitro* encontrados por barrido virtual de librerías para la enzima de Tb6-PGDH.⁶³

1.4 Modelado molecular de proteínas.

El modelaje molecular (MM) de proteínas se refiere al uso de modelos matemáticos para describir la estructura de estas macromoléculas y su dinámica, con el objetivo de aumentar la comprensión de su función biológica.⁶⁴ El MM también llamado modelado *in silico* se realiza en computadora y en los últimos treinta años se ha convertido en una herramienta muy útil para estudiar problemas de interés biológico, gracias al desarrollo de programas que permiten la predicción de modelos de proteínas, cuando las técnicas experimentales han fallado, y la simulación de sus procesos para entender sus mecanismos de acción molecular, en paralelo al desarrollo de nuevos y mejores equipos que permiten el modelado de sistemas de un gran número de partículas de manera eficiente.

El MM involucra diferentes metodologías con aplicación en el diseño racional de fármacos, como lo son la predicción de estructuras tridimensionales de diversos sistemas biológicos a nivel atómico (modelado estructural)⁶⁵ y la simulación de estos sistemas en el tiempo para comprender su estructura y dinámica (dinámica molecular, DM),⁶⁶ así como también el *docking* y barrido virtual de librerías para el estudio de las interacciones de un ligando o una librería de ellos en el sitio activo de una enzima.

1.4.1 Modelado por homología.

El análisis tridimensional de estructuras de proteínas está mostrando ser uno de los más provechosos métodos para realizar descubrimientos químicos, biológicos y médicos en los primeros años del siglo XXI, ya que proporcionan una comprensión esencial de muchas funcionalidades de sistemas moleculares de interés, que son relevantes para entender la causa y mejorar el tratamiento de diferentes enfermedades.

La caracterización estructural y/o funcional de una proteína es uno de los problemas más frecuentes en biología. Esta tarea ha incrementado la necesidad de obtener cada vez más estructuras bien sea mediante rayos-X o por RMN. En

ausencia de tales estructuras, la determinación estructural de proteínas empleando métodos *in silico* se ha convertido en una herramienta importante para muchos estudios. Se conoce que las estructuras tridimensionales de proteínas obtenidas por simulaciones de DM son comparables en calidad y confiabilidad a las obtenidas con resonancia magnética nuclear (RMN), y que en casos donde no ha sido posible cristalizar la proteína, con modelado molecular se ha podido compensar la falta de la misma.^{67,68}

El modelaje comparativo, también llamado modelaje por homología,⁶⁹ proporciona un modelo de estructura tridimensional (3D) de una proteína que está relacionado, al menos, con una estructura conocida de otra proteína de la misma familia. Los métodos comparativos pueden predecir, de forma apropiada, la estructura tridimensional de una proteína para la cual se conoce su secuencia de AA (blanco) a partir de una o varias proteínas relacionadas de estructura conocida o de referencia (plantilla). El proceso de predicción de la estructura requiere la identificación y asignación del plegamiento adecuado de la proteína de referencia, la alineación de las secuencias de la proteína blanco y la (s) referencia (s), la construcción del modelo tridimensional, a partir de una serie de restricciones espaciales que se encuentran en la estructura plantilla y que el modelo que se construye debe satisfacer,⁷⁰ utilizando para ello procedimientos de optimización geométrica, para finalmente validar el modelo obtenido.⁷¹

Las proteínas determinadas por métodos comparativos de modelaje molecular son clasificadas en tres categorías, según el nivel de precisión del modelo obtenido.^{72,73} La primera, considera aquellos modelos construidos en base a secuencias que comparten menos del 30% de identidad de secuencia de AA. Estos modelos tienen, con frecuencia, menos del 50% de sus átomos a unos 3,5 Å de su posición correcta esperada. Aun así, tienen el plegamiento correcto y pueden ser de utilidad para predecir de manera aproximada su función bioquímica. En la segunda, se encuentran aquellos modelos construidos en base a secuencias con porcentajes de identidad entre el 30 y 50%. En ellos, el 85% de los átomos se encuentra a una distancia menor a 3,5 Å de su posición correcta. Estos modelos

son de utilidad para el diseño racional de proteínas mutantes, el diseño de proteínas con estructuras compactas que le permitan una mejor cristalización, así como también, para diseñar proteínas con puentes disulfuro adicionales que le proporcionen mayor estabilidad. En la última categoría se encuentran aquellos modelos que han sido construidos a partir de patrones con los que comparte un alto porcentaje de identidad (> 50%). La precisión de estos modelos se aproxima bastante a la de aquellas estructuras que han sido determinadas por cristalografía de rayos-X con baja resolución (3 Å) o a las determinadas por RMN con mediana resolución. Estos modelos, y especialmente aquellos con un porcentaje de identidad mayor al 70%, son de gran utilidad en proyectos de diseño de nuevos fármacos, estudios de interacciones ligando-receptor y las interacciones de la proteína modelada con otras macromoléculas.⁷⁴

1.4.2 Dinámica molecular.

La simulación de biomoléculas es hoy en día una poderosa herramienta para ayudar a comprender la estructura y la dinámica de sistemas biológicos de interés, como proteínas y ácidos nucleicos, al detalle microscópico, literalmente a escalas donde el movimiento de átomos individuales puede ser registrado en el tiempo.⁷⁵ A continuación se describe de forma breve las bases teóricas que conforman la esencia de esta técnica computacional.

Una de las principales herramientas en el estudio teórico de moléculas biológicas es la DM, la cual calcula la evolución en el tiempo para todos los átomos de un sistema molecular. El fundamento de la DM es la integración numérica de la ecuación de la segunda ley de Newton que relaciona la masa y la aceleración de cada átomo con el gradiente de la energía potencial. Dado un potencial, o campo de fuerzas,⁷⁶ la velocidad de un átomo se puede calcular para un período dado de tiempo y los cambios en las coordenadas atómicas pueden ser determinados, recolectándolos en forma de su trayectoria.

Una simulación de DM típica incluye las siguientes etapas: preparación, calentamiento, equilibrio y producción.⁷⁷ En la etapa de preparación y minimización se obtiene la estructura molecular de menor energía con todas las coordenadas definidas para cada uno de sus átomos, se incluyen los iones y el solvente mediante condiciones periódicas de contorno (*PBC, Periodic Boundary Conditions*).⁷⁸ El sistema minimizado representa la molécula a una temperatura hipotética de “cero absoluto”.

El calentamiento se logra asignando las velocidades iniciales de acuerdo a una distribución de Boltzmann⁷⁹ apropiada para la temperatura deseada y con incrementos progresivos y consecutivos en las velocidades⁸⁰ o por acoplamiento a un baño térmico.⁸¹ El equilibrio del sistema en un ensamble NVT (partículas N, volumen V y temperatura T constantes)⁸² constituido por la proteína, el solvente y los iones necesarios para lograr la neutralidad eléctrica, se logra permitiendo que el mismo evolucione por un periodo de tiempo, mientras se integran las ecuaciones de movimiento hasta que la temperatura promedio, energía, y otras propiedades estadísticas del sistema alcancen el valor promedio en que la estructura permanezca estable a la temperatura deseada.^{83,84}

Finalmente en la producción, a partir de la estructura equilibrada se recoge la información de las posiciones atómicas en función del tiempo para cada átomo y se define así la trayectoria del sistema que podrá ser analizada para obtener información de interés.

En este trabajo se utilizarán métodos de modelaje comparativo para obtener los modelos estructurales de las enzimas que no poseen estructuras cristalinas disponibles, lo que permitirá aprovechar la visión dinámica de una corrida de DM con los modelos de Lm6-PGDH, Tc6-PGDH y sus correspondientes enzimas mutadas *in silico* para profundizar en la comprensión del comportamiento de la 6-PGDH y proponer alguna explicación a las diferencias encontradas en la cinética de su reacción enzimática.

1.4.3 *Docking* molecular.

Se llama *docking* molecular, anglicismo que se puede traducir como posicionamiento molecular, a un procedimiento de la química *in silico* utilizado para predecir la estructura de complejos receptor-ligando, donde generalmente el receptor es una proteína blanco y el ligando una molécula pequeña.⁸⁵ En particular el *docking* proteína-ligando ocupa un lugar muy especial en el campo del *docking* por sus aplicaciones en medicina y en el descubrimiento de nuevos medicamentos.⁸⁶

La meta del *docking* proteína-ligando es predecir el reconocimiento molecular de forma estructural y energética. En el aspecto estructural se quiere encontrar el modo de unión preferido de un ligando a una proteína de interés, para formar un complejo proteína-ligando estable; por la parte energética, se busca predecir la afinidad de la interacción mediante una función potencial que calcule la energía de interacción del complejo proteína-ligando. La forma en que se une un ligando a un determinado receptor depende de sus variables de estado, la posición y orientación en el espacio del receptor y de la conformación del ligando. Cada una de estas variables describe un grado de libertad en un espacio de búsqueda multidimensional. El procedimiento general de cualquier método de *docking* consiste en generar una pose (conformación del complejo proteína-ligando que tiene una posición y orientación determinada del ligando en el sitio activo), calcular su energía de interacción (EI) y compararla de acuerdo a esa puntuación, o *score*, con las demás poses generadas.

Todos los métodos de *docking* requieren una estrategia de búsqueda para explorar el espacio conformacional y una función de puntuación (o *scoring*) para calcular la EI de las diferentes poses obtenidas y con ellas clasificar los modos de unión de un ligando candidato, para seleccionar el más favorable. Un algoritmo de búsqueda riguroso debería elucidar exhaustivamente todos los modos posibles de unión del ligando al receptor. Se deberían explorar los seis grados de libertad traslacional y rotacional del ligando junto con los grados de libertad internos, tanto

del ligando como del receptor, sin embargo esto en la práctica es inviable debido al tamaño del espacio de búsqueda. Por lo tanto se realizan una serie de restricciones y aproximaciones al problema físico de la formación del complejo, a fin de reducir la dimensión del problema; con ello, el tamaño del espacio conformacional examinado es un compromiso entre la extensión de la búsqueda y su exactitud con el costo computacional. Así, los primeros estudios de *docking* utilizaban la aproximación de cuerpo rígido, fijando todos los grados de libertad internos del receptor;⁸⁷ para muchos casos esta aproximación tiene muchas limitaciones por lo que se han desarrollado otros algoritmos que tienen en cuenta la flexibilidad del ligando e incluso también, en algún grado, la del receptor.^{88,89} Respecto al método de búsqueda conformacional, los algoritmos se clasifican en dos grandes grupos: sistemáticos y estocásticos, entre los primeros se cuentan entre los sistemáticos el *leap frog*⁹⁰ y en el segundo grupo destacan los que se basan en el método Monte Carlo⁹¹ y los de algoritmo genético.⁹² Respecto al tipo de conformaciones del complejo, si se busca un mínimo local o global del sistema receptor-ligando, los algoritmos se clasifican en locales y globales. El *Lamarckian Genetic Algorithm* LGA⁹³ es un método de búsqueda híbrido local-global, que ha permitido no sólo encontrar conformaciones que corresponden a mínimos locales sino también globales del espacio conformacional de un determinado complejo receptor-ligando. En la actualidad, mucha de la investigación en métodos de *docking* apunta al muestreo del espacio conformacional, dada la importancia de obtener una correcta conformación del ligando para aumentar la probabilidad de encontrar un ajuste complementario con la conformación de la cavidad del receptor.⁹⁴

La función de puntuación o función *scoring*,⁹⁵ es el otro ingrediente básico del *docking* y corresponde al potencial matemático que representa la EI del complejo receptor-ligando en función de la conformación de este complejo. Idealmente la EI corresponde a la afinidad del ligando por un receptor dado, dentro de las aproximaciones al modelo de la interacción en base a potenciales. En general, las funciones de *scoring* desarrolladas en muchos programas de *docking* utilizados hoy en día incluyen contribuciones los términos de interacciones no

enlazantes y del solvente.⁹⁶ El proceso mediante el cual un ligando se une a su proteína receptora no es sencillo de describir cuantitativamente, ya que está influenciado por diversos factores entrópicos y entálpicos,⁹⁷ además de la movilidad, tanto del ligando como del receptor, el efecto de la proteína sobre la distribución de cargas del ligando, el efecto del posicionamiento del ligando en la conformación del sitio activo del receptor, las interacciones con moléculas del solvente, entre otros, por lo tanto la complejidad de la función de *scoring* también es un elemento que debe balancearse con el tiempo de cálculo a la hora de tratar un sistema.

Muchos estudios han mostrado que una combinación de estrategias han tenido excelentes resultados en la predicción del modo de unión de un ligando a un receptor dado. En conjunto con ensayos de *docking* se ha utilizado con éxito la DM para obtener la conformación inicial de la proteína,^{98,99} o conjuntos de conformaciones,¹⁰⁰ así como también la re-evaluación de EI considerando flexibilidad del ligando y de la proteína.^{101,102}

El *docking* es una aproximación que se ha aplicado con éxito en el campo científico en la resolución de problemas, como por ejemplo, en el descubrimiento de fármacos,¹⁰³ estudios estructura-actividad,¹⁰⁴ en la búsqueda y optimización de líderes con barrido virtual de librerías,^{105,106} para predecir modos de unión del ligando a la proteína en estudios de mutagénesis,¹⁰⁷ en el ajuste del sustrato y ligandos en estructuras obtenidas con cristalografía de rayos X con la densidad electrónica,¹⁰⁸ estudios de mecanismos de reacción,¹⁰⁹ etc. La conclusión a lo largo de los años respecto a todos estos elementos que influyen en el éxito del *docking* ha sido que para cada problema se debe ensayar el método que resulte más apropiado en relación a las combinaciones algoritmos de búsqueda y función *scoring* de las que se disponga.^{110,111}

1.4.4 Barrido virtual de librerías (*virtual screening*).

En las últimas dos décadas el barrido virtual de librerías ha jugado un papel preponderante en el descubrimiento de moléculas inhibidoras de proteínas que son blancos terapéuticos.¹¹²⁻¹¹⁸ En el área farmacéutica, es considerado la herramienta más importante del CADD que permite barrer grandes librerías de compuestos y reducirlos a un conjunto clave de compuestos, o *hits*, que se consideran candidatos a fármacos respecto a un blanco específico.¹¹⁹ Los métodos virtuales para el barrido de librerías permiten realizar de forma eficiente y en menor tiempo, ensayos que anteriormente sólo se realizaban con una metodología convencional *in vitro*, y que consumía gran cantidad de reactivos, dinero y tiempo, gracias a los avances en recursos computacionales y a las recopilaciones de grandes librerías de compuestos químicos hechas por las industrias química y farmacéutica, que han sido sintetizados y ensayados con el paso de los años y que pueden ser adquiridos.^{120,121}

Un barrido de librerías basado en el receptor (*receptor-based virtual screening*)¹²² consiste en el posicionamiento molecular automatizado de forma virtual de todos los ligandos de una base de datos, llamada librería o quimioteca, de forma individual y por separado, en el sitio activo de un receptor (proteína blanco). En esta aproximación, cuando se encuentra una conformación óptima para un ligando con una puntuación alta (baja EI) entre todas las obtenidas para el conjunto de compuestos de la librería, se dice que se ha identificado un *hit* potencial para fármaco. El objetivo de utilizar el *docking* como la etapa final de un barrido virtual es proporcionar una hipótesis estructural en tres dimensiones de cómo el ligando interactúa con la proteína blanco, a diferencia del objetivo del barrido virtual que es el de generar *hits* para un determinado receptor. La combinación de barrido virtual con *docking* recibe el nombre de *docking-virtual screening*,¹²³ para especificar la manera en que serán filtrados los compuestos de la librería para el receptor dado. El barrido virtual de librerías basado en el receptor requiere de la estructura cristalina o de un modelo tridimensional de la proteína blanco (receptor), a diferencia de los métodos basados en el ligando

(*ligand-based virtual screening*),¹²⁴ que necesitan de al menos una molécula con actividad conocida para establecer la búsqueda de compuestos análogos estructuralmente y con ellos construir la librería. Los métodos basados en el ligando son utilizados en ausencia de información de la proteína blanco. También existen métodos combinados, basados en el receptor y en el ligando, que pueden aplicarse cuando se dispone tanto de la estructura del receptor como de información de ligandos con actividad.

Un barrido virtual típico contiene diferentes etapas de filtrado secuencial, o en cascada, que conllevan a una reducción del número de candidatos a ser examinados experimentalmente, en base a propiedades ADMET y otros requerimientos,^{125,126} para posteriormente realizar los ensayos clínicos. Los resultados del barrido virtual son utilizados de manera iterativa para seleccionar, ensayar y diseñar nuevos compuestos como parte del proceso de optimización de líderes, en base por supuesto a su estructura y realizando cambios que mejoren su potencia, selectividad y/o parámetros farmacocinéticos.

1.5 Justificación del trabajo.

La 6-PGDH es una enzima clave de la rama oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato involucrada en la generación de ribulosa 5-fosfato y NADPH, el cual es la mayor fuente de poder reductor para procesos biosintéticos y también sirve para mantener el potencial redox necesario para la protección contra estrés oxidativo y para una variedad de reacciones reductivas biosintéticas, particularmente en la producción de lípidos. Las diferencias encontradas entre la 6-PGDH humana y aquella de organismos patógenos Kinetoplastidas como *T. brucei*, *Leishmania* sp. y *T. cruzi* hacen que esta enzima sea considerada un potencial blanco terapéutico apropiado. Los fármacos utilizados hoy en día en el tratamiento de enfermedades como leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño son ineficaces, en muchos casos su mecanismo de acción es prácticamente desconocido y también son tóxicos o costosos. Hay muchas personas que no responden al tratamiento y recientemente la resistencia del parásito a fármacos como el Glucantime ha incrementado. En general, la quimioterapia disponible está muy distante de ser un tratamiento eficiente. Por estas razones, se considera importante abordar este problema de salud que afecta a la población local con las nuevas tecnologías disponibles para el desarrollo y diseño racional de fármacos. Todo ello con la intención de mejorar la acción de los fármacos; en el sentido de renovar la variabilidad estructural de los compuestos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis, y que podrían repercutir también en el diseño de nuevos fármacos para otras enfermedades relacionadas con parásitos como el mal de Chagas, o la enfermedad del sueño.

1.6 Objetivos.

1.6.1 Objetivo General.

Modelado molecular de las enzimas, nativas y mutadas, de la 6-PGDH de *Leishmania (Leishmania) mexicana* y *Tripanosoma cruzi*, y tamizado virtual de una librería para la identificación de compuestos líderes contra la leishmaniasis.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar el protocolo de DM que será empleado en el modelado de las enzimas de interés en condiciones fisiológicas, utilizando como referencia la estructura cristalina de Tb6-PGDH.
2. Simular con DM, de acuerdo al protocolo establecido, las enzimas nativas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, y sus enzimas mutadas *in silico*.
3. Analizar las trayectorias de las corridas de producción para las enzimas, con monitoreo de las distancias de los pares iónicos entre ambas sub-unidades.
4. Caracterizar comparativamente los sitios activos en las enzimas Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.
5. Realizar el barrido virtual de la librería en las enzimas Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales.

2.1.1 Equipos y procesadores.

Para realizar los cálculos de este trabajo se utilizaron dos equipos: un computador personal con procesador AMD FX-6100 de seis núcleos 3,30 GHz, 1 Tb de disco duro, 8 Gb de memoria RAM y una estación de trabajo Thinkcenter ® de Lenovo con procesador INTEL® Xeón de cuatro núcleos 2,80 Ghz, 1 Tb de disco duro y 12 Gb de memoria RAM.

2.1.2 Programas de modelado molecular y visualizadores.

Se utilizaron los siguientes programas:

- DeepView/ Swiss-PdbViewer v4.0.1¹²⁷ para el alineamiento de secuencias de las estructuras de las enzimas 6-PGDH, junto a sus enzimas mutadas.
- Vega ZZ¹²⁸ como interfase gráfica para NAMD y tamizado molecular.
- NAMD v2.7¹²⁹ para realizar la minimización de energía y DM de todas las proteínas.
- VMD v1.9.1¹³⁰ (*Visualization Molecular Dynamics*) para ayudar a la visualización de estructuras, análisis de la estructura secundaria y los archivos de trayectoria.
- Biovia Discovery Studio Visualizer v4.5¹³¹ para la preparación de los ligandos de la librería para el tamizado virtual, para visualizar las estructuras del tamizado molecular (complejos enzima/ligando) y preparar las figuras.
- PyMOL v1.3¹³² para realizar las mutaciones *in silico* y visualizar las estructuras del tamizado molecular (complejos enzima/ligando).

- Autodock Vina¹³³ para los ensayos de *docking* molecular y el barrido virtual de la librería.
- Ligand explorer¹³⁴ para analizar los complejos enzima-ligando resultantes del barrido virtual.

2.1.3 Herramientas de bioinformática en línea.

Se utilizaron las siguientes herramientas:

- Servidor Swiss-model¹³⁵ para realizar el modelado por homología.
- ProCheck¹³⁶ para verificar las estructuras tridimensionales de las proteínas modeladas.
- ProsaWeb¹³⁷ para validar las estructuras modeladas de acuerdo a su plegamiento y energía.
- Castp¹³⁸ y FindSITE¹³⁹ para definir el sitio activo de una enzima.

2.2 Metodología Experimental.

2.2.1 Obtención de los modelos estructurales de las enzimas nativas de la 6-PGDH.

2.2.1.1 Identificación y selección de la enzima de referencia.

Hasta la fecha se encuentran depositadas veinticuatro (24) estructuras de la enzima 6-PGDH en el PDB pertenecientes a distintos organismos, todas obtenidas mediante cristalografía de rayos-X. En este grupo se encuentran cinco estructuras de la enzima homóloga de *O. aries* en complejo con sustrato, coenzima e inhibidores (códigos PDB: 1PGN, 1PGO, 1PGP, 1PGQ y 2PGD), tres de la enzima de *H. sapiens*: una de ellas con la coenzima NADPH (2JKV), una forma apo (4GWG) y una con una molécula de ácido 3-fosfoglicérico como ligando (4GWK); otras catorce estructuras corresponden a la enzima de bacterias: cuatro de *L. lactis* (2IYO, 2IYP, 2IZ0 y 2IZ1), tres de *E. coli* (2ZYA, 2ZYD y 3FWN), dos de

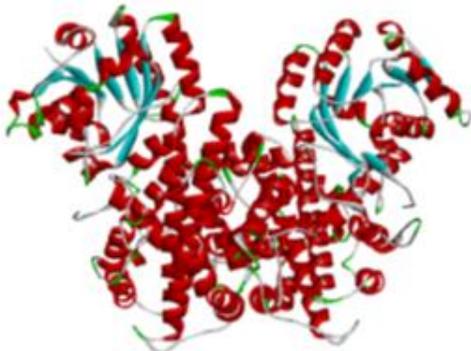
G.stearotherophilus (2W8Z y 2W90), y una para *G. metallireducens* (3PEF), *S. cerevisiae* (2P4Q), *Corynebacterium glutamicum* (3DFU), *K. pneumoniae* (2ZYG) y *Dyadobacter fermentans* (4GBJ) y por último sólo una proteína homóloga correspondiente a parásito, la del *T. brucei* (1PGJ).

En base a la alta identidad de secuencia de Tb6-PGDH con Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, además tomando en cuenta que *T. brucei* se trata de un organismo parásito relacionado con *Leishmania* y del que se dispone su estructura cristalina en forma apo de la enzima a buena resolución (2,8 Å) (Tabla 2.1), se seleccionó la estructura Tb6-PGDH como estructura de plantilla o “*template*” para el modelado molecular por homología de las enzimas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, que son las proteínas a modelar o “*target*”, tal y como se ha reportado previamente.⁴¹

2.2.1.2 Modelado por homología de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.

Las enzimas 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi* no tienen estructura cristalina reportada en el PDB, principalmente debido a problemas de inestabilidad encontrados al momento de ensayar con la estructura nativa. A fines del estudio de DM que se realizó en este trabajo, fue necesario primero obtener las estructuras tridimensionales para estas enzimas por homología a Tb6-PGDH de acuerdo a la metodología ya descrita.⁴¹

Tabla 2.1. Características de la estructura cristalina de la enzima plantilla Tb6-PGDH.

Nombre	6-PGDH	
Organismo	<i>T. brucei</i>	
PDB ID	1PGJ	
Cadenas	Dos: A y B	
Masa estructural	104568,23 Da	
Método experimental	Rayos X	
Resolución	2,8 Å	
R-value	0,186	
R-free	0,273	
Otros componentes	Solvente H ₂ O, SO ₄ ⁻²	

En este sentido, se utilizaron las secuencias de aminoácidos correspondientes para las enzimas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH en formato FASTA obtenidas del Banco de Datos de Secuencias Genéticas, GenBank,¹⁴⁰ bajo los códigos AAQ92344 y AAQ63816.1, respectivamente. Para realizar el modelado por homología de una proteína blanco o “target” se alinea su secuencia con la de la enzima de plantilla o “template” en base a la correlación de sus AA, establecida de acuerdo a métodos matriciales con el programa CLUSTAL.¹⁴¹ Una vez realizado el alineamiento de ambas secuencias y en base al plegamiento presente en la estructura de referencia, se toma en cuenta sus características geométricas y estereoquímicas para generar el modelo de la secuencia blanco. Como la enzima 6-PGDH es un homo-dímero, antes de ensamblar su estructura cuaternaria correctamente se modelaron por homología ambas sub-unidades por separado. Para ello se utilizó el programa Deep View/SwissPdb Viewer¹²⁷ con el cual se alinearon todos los residuos de ambas sub-unidades (la de referencia y la que se quiere modelar) y se generó el modelo 3D de una sub-unidad (cadena A). De manera análoga, se realizó el modelado de la estructura 3D de la segunda sub-unidad del dímero de la enzima 6-PGDH (cadena B). Ambos modelos, la sub-unidad A y la B, se combinaron utilizando la herramienta “merge” de Deep View/SwissPdbViewer y la matriz de transformación de la celda unitaria de la estructura cristalina de la enzima de referencia (contenida en el archivo PDB), según la cual se aplican automáticamente las operaciones matemáticas necesarias para ensamblar el dímero a partir de las dos sub-unidades individuales. De esta manera se obtuvo el dímero de la enzima 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y también el de *T. cruzi* para su posterior refinamiento con métodos de DM.

2.2.1.3 Validación de los modelos obtenidos.

Los modelos obtenidos para la enzima 6-PGDH se cargaron en el modo automático del servidor Swiss-Model¹³⁵ para verificar el alineamiento con la secuencia de referencia y la completitud de sus AA. También como parte de la validación se realizó la revisión geométrica de los mismos con el gráfico

Ramachandran y el análisis de ProCheck¹³⁶ y la validación energética de ProsaWeb.¹³⁷

2.2.2 Dinámica molecular de las enzimas 6-PGDH.

2.2.2.1 Preparación de las estructuras.

Además de modelar las enzimas de interés Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, para esta investigación se realizó a fines comparativos la DM de Tb6-PGDH por considerar su estructura cristalina como referencia. Todas las estructuras iniciales de la enzima 6-PGDH para las diferentes especies fueron preparadas para la DM de la siguiente manera: se añadieron los átomos de hidrógeno a las cadenas laterales de los residuos de la proteína (de acuerdo con los estados de protonación correspondientes a un pH fisiológico, pH = 7) y los átomos de oxígeno de los extremos C-terminal (tipo OXT) a cada sub-unidad del dímero, para después verificar la quiralidad de todos los AA de la proteína. Posteriormente y para relajar la conformación inicial y disminuir los contactos entre átomos que aumenten la repulsión estérica se minimizó la energía de cada estructura en dos etapas. Primero se realizó la minimización de los átomos de H agregados al modelo con 5 ps (5000 fs), manteniendo el resto de la proteína fija. Luego, se llevó a cabo otra minimización geométrica de 10 ps para relajar las cadenas laterales, con los átomos pesados del esqueleto fijos (C, N, O). En todas las minimizaciones el potencial viene dado por CHARMM¹⁴² y fueron realizadas con el algoritmo de gradiente conjugado hasta que el *rms* (*root mean square*, raíz cuadrada media) del gradiente fuera menor que $0,01 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-1}$,¹⁴³ un tiempo de integración de 1 fs, una distancia de corte o “*cutoff*” de 12 Å para las interacciones no enlazantes, distancia para activar la función de corte “*switching function*” de 10 Å y una distancia para inclusión de pares en el conteo de interacciones no enlazantes “*pair list distance*” igual a 14 Å.

Para asegurar la neutralidad eléctrica, se calculó el potencial de la estructura minimizada con CHARMM, se asignaron las cargas Gastgeiger¹⁴⁴ y se añadieron los iones necesarios para neutralizar la carga total de la proteína.¹⁴⁵ Entonces se

procedió a solvatar la proteína con moléculas de agua de forma explícita utilizando PBC. En este paso se añadió una caja de agua TIP3P,¹⁴⁶ de lados a , b , c , cuyo tamaño asegurara que la proteína estuviera inmersa de forma completa en el agua. Luego, el sistema definido por la enzima 6-PGDH, los iones y el solvente se minimizó utilizando PBC y el algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME)¹⁴⁷ para el cálculo de interacciones electrostáticas. La minimización se realizó en dos etapas sucesivas de la siguiente manera: primero se relajaron las tensiones entre moléculas en el agua recién añadida, con 10 ps de gradiente conjugado, manteniendo fijos los iones y la proteína, y luego, se minimizaron las cadenas laterales, el agua y los iones, con 20 ps de gradiente conjugado, manteniendo fijos los átomos pesados del esqueleto de la proteína.

El procedimiento utilizado para preparar cada uno de los sistemas para realizar la DM comprendió la revisión inicial y minimización, neutralización y solvatación (Figura 2.1). Asimismo, las simulaciones de DM para las enzimas 6-PGDH comprendieron cuatro etapas generales que se describen a continuación: calentamiento, liberación de restricciones o pre-equilibrio, equilibrio y producción.

2.2.2.2 Calentamiento.

Para asignar una distribución de velocidades a todos los átomos del sistema de forma tal que éste se encuentre a la temperatura de simulación (300 K), el mismo se calentó desde 0 K hasta 300 K con una corrida de 90 ps (90.000 fs) a una tasa de 0,1 K cada 30 fs, con re-escalamiento de las velocidades y un tiempo de integración de las ecuaciones de Newton de 1 fs de acuerdo al algoritmo Verlet.¹⁴⁸

El cálculo de las velocidades iniciales de cada átomo se realizó de acuerdo a la ecuación de Boltzmann. Las interacciones electrostáticas se calcularon con el algoritmo PME cada cuatro pasos y las interacciones no enlazantes de van der Waals cada dos pasos, con ciclos de 20 pasos para totalizar la energía del sistema; los valores de las distancias de corte y de la función interruptor se

mantuvieron tal y como se hizo para la minimización de energía en la preparación de la proteína (Sección 2.2.2.1).

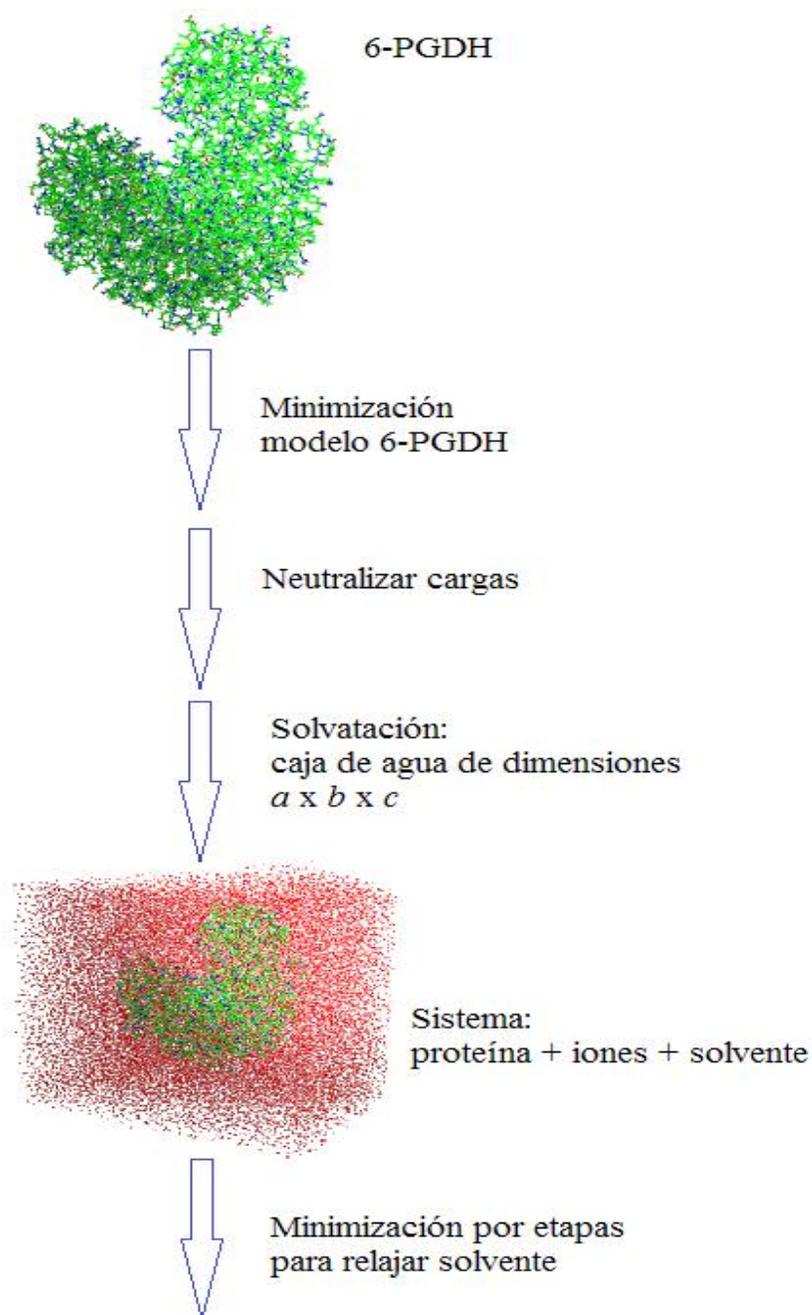


Fig. 2.1. Preparación de la proteína para realizar la simulación utilizando condiciones periódicas de contorno (celda con dimensiones $a \times b \times c$) y agua como solvente.

2.2.2.3 Pre-equilibrio con liberación de restricciones.

Una vez que el sistema se encuentra a la temperatura deseada se requiere de la liberación progresiva de la constante de fuerza aplicada a los átomos pesados del esqueleto de la proteína que se mantuvieron fijos en las etapas anteriores, en una etapa llamada de “pre-equilibrio”. En este caso se utilizó el factor de escalamiento para ir disminuyendo la restricción y así equilibrar el sistema a 300 K conservando el plegamiento natural de la proteína. Se realizaron once corridas de DM consecutivas de 100 ps cada una (identificadas como corrida I, II, III, ..., XI), para un total de 1.100 ps (1,1 ns) de pre-equilibrio, con disminución del factor de escalamiento desde 0,9 a 0,015, respectivamente, para ir desde un valor de constante de fuerza de $90 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ (corrida I) hasta uno de $1,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ (corrida XI), que corresponde al mínimo valor necesario para evitar distorsiones de la proteína y pérdida de estructura secundaria en las simulaciones posteriores.

2.2.2.4 Equilibrio.

Al sistema de la proteína neutralizada con la caja de agua se realizaron 500 ps de DM para equilibrar el sistema a la temperatura de 300 K y la mínima restricción de $1,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$.

2.2.2.5 Producción.

A partir del sistema equilibrado a 300 K se realizó la DM de producción para recolectar las configuraciones del mismo en forma de trayectoria que servirán para el análisis de las coordenadas y velocidades de sus átomos. Durante esta etapa de registro se guardó una configuración cada 1 ps (1.000 fs), para un total de 5000 configuraciones durante un tiempo total de simulación de 5 ns (5.000.000 fs).

2.2.2.6 Validación de los modelos obtenidos.

Al finalizar la etapa de pre-equilibrio, equilibrio y producción de la DM se evaluó la calidad de la estructura de la enzima 6-PGDH resultante con las

herramientas de ProCheck¹³⁶ y el servidor ProsaWeb,¹³⁷ como ya se ha descrito para la validación de los modelos en la Sección 2.2.1.3. En el sistema equilibrado para cada enzima, se verificó que la densidad de la caja de agua del sistema simulado correspondiera a la densidad del solvente a la temperatura deseada (aprox. 1 g/mL).¹⁴⁹ En la Tabla 2.2 se resumen las condiciones utilizadas en la preparación y DM de cada uno de los sistemas simulados correspondientes a las enzimas nativas de la 6-PGDH bajo estudio.

2.2.3 Análisis de trayectoria y puentes salinos.

En la 6-PGDH se encuentran cinco pares iónicos en la región C-terminal de cada sub-unidad que contribuyen al mantenimiento de su estructura cuaternaria. Como la enzima es un homo-dímero, estas interacciones pueden ocurrir entre los residuos de la cadena A con los de la B, y viceversa. A efectos de la descripción estructural, y para el análisis posterior, se nombran los puentes **AB** para referirse a aquellos que se forman en un lado del dímero, y **BA** para denotar los que se forman del otro. En lo sucesivo, se realizará la discusión de las geometrías de puentes salinos según la nomenclatura para tipos de átomos en AA recomendada para estructuras obtenidas con RMN por la I.U.P.A.C.¹⁵⁰ (Figura 2.2).

Tabla 2.2. Sistemas simulados para enzimas nativas de la 6-PGDH.

Enzima	Tb6-PGDH	Lm6-PGDH	Tc6-PGDH
Fuente	PDB (1PGJ)	Modelada por homología	Modelada por homología
Temperatura (K)	300	300	300
Nº átomos totales en la simulación	102.315	99.415	105.231
Nº de moléculas de solvente	29.223	29.404	34.934
iones	24 Cl ⁻	12 Na ⁺	24 Cl ⁻
Masa total (u.m.a)	630.855	613.915	648.279
Carga total (e)	0	0	0
Tamaño de la caja (Å ³)	108 x 111 x 85	108 x 106 x 83	114 x 109 x 82
Densidad (g/mL)	1,02	1,08	1,03
Tiempo de pre-equilibrio (ns)	1,1	1,1	1,1
Tiempo de equilibrio (ns)	0,5	0,5	0,5
Tiempo de producción (ns)	5	5	5
<i>k</i> (kcal·mol ⁻¹ ·Å ⁻¹)	1,5	1,5	1,5

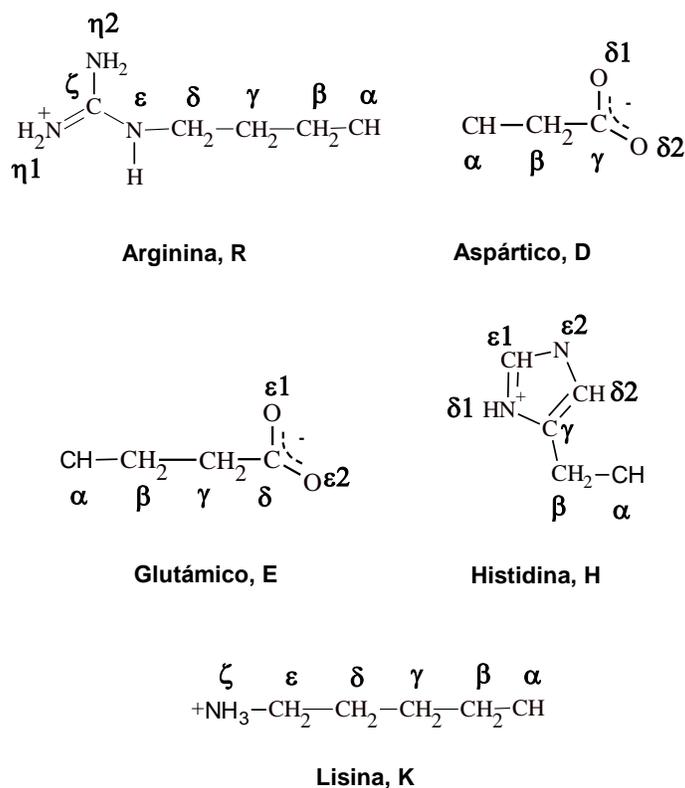


Fig. 2.2. Nomenclatura de los átomos en los residuos involucrados en los puentes de interés en la enzima 6-PGDH.¹⁵⁰

2.2.4 Clasificación de los pares iónicos.

En el análisis de trayectoria de las corridas de producción de la DM de cada enzima se adoptará la definición de Nussinov y colaboradores,¹⁵¹ de acuerdo a la cual los pares iónicos se clasifican dependiendo de la distancia a la que ocurren como: puente salino, par N-O o par iónico de largo alcance. Para estudiar las interacciones entre residuos cargados es útil definir la geometría del par con la ayuda del concepto de centroide (r). Como su nombre lo indica el centroide es la distancia entre los centros geométricos de los aminoácidos cargados positiva y negativamente que forman el par (Figura 2.3). En el análisis de trayectoria de acuerdo al tipo de residuo, se definieron los centroides de cada AA tomando en cuenta los átomos C γ , O δ 1 y O δ 2 para D, C δ , O ϵ 1 y O ϵ 2 para E, N ϵ , C ζ , N η 1, N η 2 en R, C γ , N δ 1, C δ 2, C ϵ 1 y N ϵ 2 en H y N ζ para K.

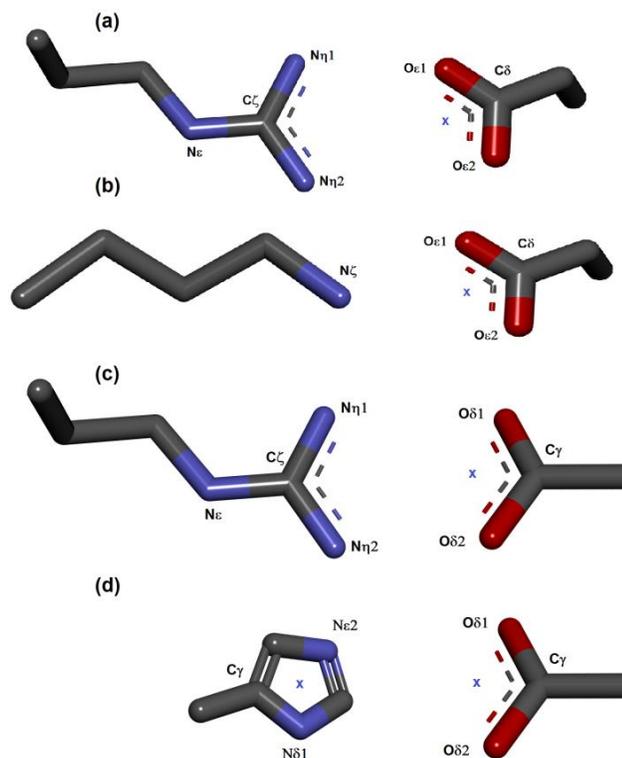


Fig. 2.3. Centroides para los grupos cargados en las cadenas laterales de los AA involucrados en los pares iónicos entre sub-unidades bajo estudio de la 6-PGDH (a) R-E (b) K-E (c) R-D y (d) H-D (La “x” azul muestra la posición del centroide cuando no coincide con un átomo)

Dependiendo de la orientación relativa entre los grupos cargados de los AA de un par iónico se pueden encontrar tres tipos de interacción de acuerdo a Nussinov¹⁵¹ (Figura 2.4). Al examinar los pares iónicos de interés, si la distancia r entre los centroides de ambos grupos cargados resultó menor o igual a 4 Å, de manera que los grupos cargados de las cadenas laterales tienen la mejor orientación geométrica entre sí la interacción se clasificó como puente salino¹⁵² (Figura 2.4a). Si la distancia entre centroides fue mayor a 4 Å, pero al menos un par de átomos de N y O de las cadenas laterales se encontraba a una distancia de 4 Å, la interacción fue clasificada como par N-O (Figura 2.4b). Cuando la distancia entre centroides fue mayor a 4 Å y no se encontró algún par N-O a esa distancia, la interacción se clasificó entonces como interacción de largo alcance (Figura 2.4c).

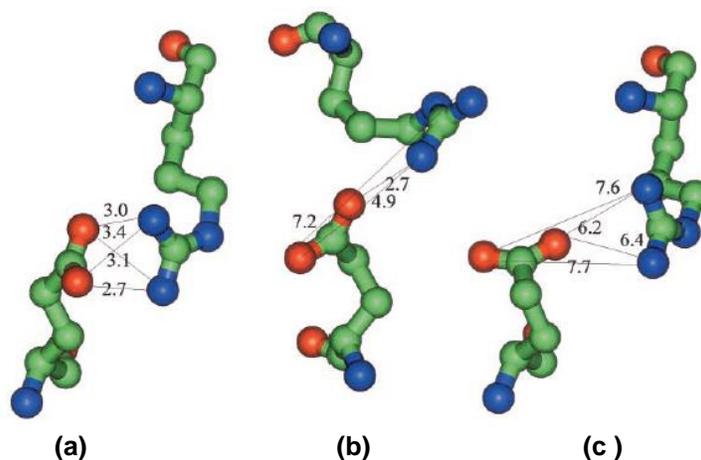


Fig. 2.4. Tipos de interacciones entre pares iónicos presentes en proteínas.¹⁵¹ (a) Puente salino (b) Par N-O (c) Par iónico de largo alcance (C verde, N azul, O rojo).

2.2.5 Enzimas mutadas Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH.

A objeto de restituir los puentes salinos que no están presentes en Lm6-PGDH y Tc6-PGDH (respecto a Tb6-PGDH) se realizaron mutaciones *in silico* en las estructuras de menor energía resultantes de la DM de cada una de ellas.

Los cambios puntuales de residuos en cada estructura se llevaron a cabo mediante el programa PyMOL.¹³² En la enzima mutada de *L. (L.) mexicana*, Lm*6-PGDH, se realizó la mutación ⁴⁷⁷A→⁴⁷⁷E para restituir el puente salino (par 2) que está presente en Tb-PGDH, y en la enzima doble mutada de *T. cruzi*, Tc**6-PGDH, se mutaron dos residuos: ²⁵⁹C→²⁵⁹R y ²⁴⁶V→²⁴⁶D, para restituir los pares iónicos 3 y 4, que son puentes salinos en la enzima de *T. brucei* (Tabla 2.3).

Los modelos de las proteínas mutadas fueron preparados para la DM, validados y simulados de acuerdo al procedimiento ya descrito (Sección 2.2.2), con extensión del tiempo de equilibrio en 1 ns respecto a las enzimas nativas, para una corrida de producción de 5 ns. En resumen, la Tabla 2.4 muestra las condiciones utilizadas en la preparación y DM de cada uno de los sistemas correspondientes a las enzimas mutadas. Finalmente para el análisis, el comportamiento en la simulación de DM de los pares iónicos bajo estudio en las enzimas mutadas fue comparado con el de sus correspondientes enzimas nativas.

Tabla 2.3. Pares iónicos inter sub-unidades presentes en las enzimas nativas y mutadas de Tb6-PGDH, Lm6-PGDH, Tc6-PGDH.

Par iónico	Tb6-PGDH	Lm6-PGDH	Tc6-PGDH	Lm*6-PGDH	Tc**6-PGDH
1	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134
2	E477-K139	–	E477-K139	E477-K139 [#]	E477-K139
3	E463-R259	E463-R259	–	E463-R259	E463-R259 [#]
4	R464-D246	R464-E246	–	R464-E246	R464-D246 [#]
5	D466-H255	D466-K255	D466-H255	D466-K255	D466-H255

– No hay par iónico.

[#] Par iónico restituido por mutagénesis *in silico*.

Tabla 2.4. Sistemas simulados para enzimas mutadas de la 6-PGDH.

Enzima	Lm*6-PGDH	Tc**6-PGDH
Fuente	Mutación <i>in silico</i>	Mutación <i>in silico</i>
Residuos mutados	⁴⁷⁷ A→ ⁴⁷⁷ E	²⁵⁹ C→ ²⁵⁹ R ²⁴⁶ V→ ²⁴⁶ D
Temperatura (K)	300	300
Nº átomos totales en la simulación	102.202	106.620
Nº de moléculas de solvente	29.212	30.618
iones	14 Na ⁺	24 Cl ⁻
Masa total (u.m.a)	630.740	656.650
Carga total (e)	0	0
Tamaño de la caja (Å ³)	109 x 112 x 83	113 x 109 x 82
Densidad (g/mL)	1,03	1,07
Tiempo de pre-equilibrio (ns)	1,1	1,1
Tiempo de equilibrio (ns)	1,5	1,5
Tiempo de producción (ns)	5	5
<i>k</i> (kcal·mol ⁻¹ ·Å ⁻¹)	1,5	1,5

2.2.6 Identificación y caracterización de la cavidad de sitio activo.

Las estructuras de mínima energía encontradas durante los 5 ns de la dinámica de producción para las enzimas de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH, fueron cargadas en el servidor en línea de Castp (*Computed Atlas of Surface Topography of Proteins*)¹³⁸ y FINDSITE,¹³⁹ para ubicar la cavidad correspondiente al sitio activo de la 6-PGDH de cada especie y compararlas, identificando cada una por sus aminoácidos característicos, implicados en la unión del sustrato y cofactor, a fines del diseño racional de fármacos.

2.2.7 Ensayos de posicionamiento molecular (*Docking*).

2.2.7.1 Preparación del receptor Lm6-PGDH.

La estructura de menor energía resultante de la DM de Lm6-PGDH se superpuso con las estructuras cristalinas de Ll6-PGDH y Oa6-PGDH (códigos de acceso en PDB: 2IZ0 y 1PGP, respectivamente) para posicionar en su sitio activo las moléculas de la coenzima y el sustrato, ya que la enzima de *L. (L.) mexicana* no se encuentra cristalizada, ni en su forma apo ni con ligandos. El cofactor NADP⁺ forma parte del sitio activo y posee un N como sal de piridina (tipo de átomo no incluido en los campos de fuerza CHARMM),¹⁴² por ello fue necesario minimizar su estructura por separado asignando cargas de acuerdo a la aproximación semi-empírica PM3 implementada en MOPAC6.0,¹⁵³ para luego incorporarlas a la estructura del cofactor en Lm6-PGDH. Esta estructura de Lm6-PGDH con una molécula de NADP⁺ en una de sus cavidades fue minimizada en etapas como se ha descrito para la preparación de estructuras en la Sección 2.2.2.2 de Materiales y Métodos, y fue utilizada para un *docking* del 6PG en su sitio activo. Para realizar la búsqueda conformacional del ligando, con Autodock Tools¹⁵⁴ se definió una rejilla cúbica o caja de 1 Å de resolución en el centro de la cavidad que comprende el sitio activo de la proteína de tamaño 18 Å x 16 Å x 16 Å, asegurando que todos los residuos clave reportados para la 6-PGDH se encontraran dentro de la caja. A la estructura del receptor obtenida se le añadieron las cargas Gasteiger¹⁴⁴ (sin incluir al cofactor), se definieron los tipos de átomo de acuerdo al campo de fuerzas AutoDockVina,¹³³ se le removieron los H apolares y finalmente se guardó la estructura del receptor en un archivo pdbqt para el *docking*.

2.2.7.2 Preparación del ligando 6PG.

La molécula de ligando 6PG fue minimizada en presencia del receptor Lm6-PGDH y del cofactor, luego se removieron todos los átomos de la proteína y cofactor, se asignaron las cargas Gasteiger¹⁴⁴ al ligando, se definió el potencial de

acuerdo al campo de fuerzas AutodockVina¹³³, se removieron los H apolares, y se guardó la estructura en formato pdbqt.

2.2.7.3 Posicionamiento del 6PG en el sitio activo de Lm6-PGDH (*docking*).

Se realizó un *docking* a partir de las estructuras .pdbqt del receptor Lm6-PGDH y del ligando, buscando 10 conformaciones del mismo con variación de sus enlaces flexibles en el sitio activo definido por la caja. AutodockVina¹³³ utiliza algoritmo genético para hallar la conformación, o pose, del ligando en el sitio activo del receptor y una función de puntuación basada en el campo de fuerzas Autodock para calcular las EI de las poses.¹⁵⁵

2.2.7.4 DM del complejo Lm6-PGDH/6PG.

La estructura del complejo de Lm6-PGDH y 6PG de menor EI correspondiente a la pose 1 del *docking* anterior, se preparó de acuerdo a los procedimientos ya descritos en la Sección 2.2.2, para llevar a cabo una corrida de DM de 1 ns de producción a 300 K utilizando PBC. La estructura de menor energía resultante para la trayectoria de la DM fue seleccionada para los ensayos posteriores de barrido virtual.

2.2.7.5 Obtención de la estructura del receptor de Hs6-PGDH.

Se preparó la estructura del receptor de la enzima Hs6-PGDH de acuerdo a la metodología ya descrita en la sección anterior para la enzima Lm6-PGDH. En este caso la enzima humana si se encuentra cristalizada y depositada en el PDB (código de acceso: 2JKV) junto a una molécula de cofactor NADP⁺, sin sustrato. Dicha estructura se preparó para las simulaciones de la forma usual, agregando H a pH fisiológico y relajando los átomos añadidos progresivamente, luego se minimizó y se asignaron cargas a la proteína y al cofactor (MOPAC6.0 PM3) por separado. A partir de esta estructura el sustrato fue reposicionado en su sitio activo con una etapa de *docking* y un espacio de búsqueda definido por la caja de

18 Å x 24 Å x 16Å centrada en el sitio activo. A partir de la estructura del complejo Hs6-PGDH/6PG resultante para la pose 1 (de menor EI) se realizó una DM de 1 ns a 300 K, cuya conformación de menor energía fue seleccionada como estructura del receptor para el barrido virtual de la librería.

2.2.8 Construcción de la librería de compuestos a ensayar.

En base a los inhibidores encontrados para Tb6-PGDH con más del 50% de inhibición a 50 µM (Figura 1.12) se realizó una búsqueda en las bases de datos ZINC¹⁵⁶ y Malaria Box¹⁵⁷ para encontrar compuestos con índice de similitud de Tanimoto¹⁵⁸ igual o mayor a 0,7. Las estructuras en 3D resultantes de la búsqueda fueron descargadas en formato sdf de las páginas web de origen. Se revisaron las estructuras de cada compuesto y su estado de ionización a pH fisiológico. De los resultados obtenidos en las diferentes bases de datos se eliminaron los compuestos repetidos y se guardaron en un único archivo sdf con 780 compuestos en total, empleando para ello el programa Biovia Discovery Studio Visualizer.¹³¹ Antes de iniciar el barrido virtual cada compuesto de la librería fue preparado automáticamente como ya ha sido descrito en la preparación de un ligando (Sección 2.2.7.2.1).

2.2.9 Barrido virtual de la librería de ligandos.

El barrido virtual en base al receptor se realizó de forma automatizada con el script *virtual screening* implementado en VegaZZ¹²⁸ para AutodockVina,¹³³ de acuerdo al posicionamiento molecular de cada uno de los compuestos de la librería en el sitio activo de la enzima 6-PGDH de las especies *L. (L.) mexicana* y *H. sapiens* por separado, un total de 20 veces cada enzima y con una búsqueda de 10 conformaciones por ligando. Los compuestos de la librería fueron ordenados de acuerdo a la puntuación, o *score*, de cada uno de los complejos ligando-receptor hallados, calculada como EI.

2.2.9.1 Análisis de las poses y energías de interacción de los ligandos.

Los veinte ligandos posicionados con menor energía y mayor frecuencia en los ensayos de barrido virtual para la enzima de Lm6-PGDH, que no se encontraban en los primeros ligandos obtenidos para el barrido virtual de Hs6-PGDH, se seleccionaron como los compuestos *hits* para examinar sus interacciones en los complejos con Biovia Discovery Studio Visualizer¹³¹ y Pymol.¹³²

2.2.10 Optimización de los complejos enzima-ligando.

Las primeras poses de los tres hits obtenidos en complejo con Lm6-PGDH y Hs6-PGDH fueron optimizadas con una DM para el complejo enzima-ligando. Cada estructura fue preparada, neutralizada y solvatada como se describió en la Sección 2.2.2 y se corrió una dinámica de producción de 1 ns a 300 K utilizando PBC.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Modelado molecular de la enzima 6-PGDH.

3.1.1 Obtención de los modelos estructurales de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.

3.1.1.1 Introducción.

La disponibilidad de recursos computacionales y herramientas bioinformáticas permite ahora modelar estructuras que antiguamente resultaban inaccesibles para estudios detallados a nivel molecular. Es el caso de la proteína 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y de *T. cruzi*; en estas especies la enzima se conserva respecto a su estructura cuaternaria, los residuos catalíticos y además cumple la misma función en el catabolismo de la glucosa. Sin embargo, también en ellas es una característica particular su labilidad, entendida como la pérdida de actividad enzimática cuando se ha intentado ensayar la enzima nativa, lo que ha imposibilitado su aislamiento y caracterización. Debido a ello, para realizar las simulaciones de DM fue viable obtener los modelos 3D de las estructuras de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH mediante el uso de métodos *in silico* de modelado comparativo.

El modelado comparativo, también llamado modelado por homología, nos permite obtener un modelo de la estructura tridimensional de una proteína que está relacionada, al menos, con una estructura conocida experimentalmente. Para la 6-PGDH el análisis de las estructuras cristalinas de la enzima de *O. aries*,²⁹ *T. brucei*,³⁰ y *L. lactis*,³¹ ha permitido establecer que la forma activa de la enzima es un homo-dímero, cuyos monómeros se encuentran unidos al enlazar el tallo de una sub-unidad a la otra. En base a los estudios ya realizados con estructuras cristalográficas y al alto porcentaje de identidad de secuencia de AA encontrado al comparar la secuencia de la enzima de *T. brucei* con *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi* se procedió a generar un modelo para éstas últimas, el cual fue validado y refinado.

3.1.1.2 Modelado por homología de la estructura de la enzima 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*.

Las estructuras de la proteína 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi* fueron obtenidas mediante modelado por homología en referencia a la enzima de *T.*

brucei siguiendo la metodología ya reportada,⁴¹ en base a los altos % de identidad de secuencia de AA encontrados: 71,19% para Lm6-PGDH y 78,29% en el caso de Tc6-PGDH. La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos para la validación de ambos modelos de acuerdo a los valores reportados. La comparación del modelo generado para *L. (L.) mexicana* respecto a la estructura de referencia de Tb6-PGDH, mostró un RMSD de 0,07 Å para los 478 átomos de C α del esqueleto del monómero, lo cual refleja la buena concordancia entre ambas estructuras, ya que es mínima la desviación del modelo obtenido respecto al patrón, dentro del intervalo de RMSD de 1,0 y 1,5 Å aceptado para estructuras modeladas por homología. Phi y Psi son los ángulos de torsión de todos los residuos de la 6-PGDH. El alto valor del %Phi/Psi se corresponde a un alto número de residuos con combinaciones de ángulos Phi-Psi en regiones favorables. Los valores obtenidos para el modelo de *T. cruzi* también se encuentran con bajo RMSD y Z-score típico de estructuras nativas, de acuerdo a lo esperado para un modelo generado en base a una plantilla con tan alto porcentaje de identidad de secuencias de AA. El alineamiento de secuencias, el gráfico Ramachandran y la validación de Prosa-Web para los modelos generados de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH se presentan en el Apéndice A.

Tabla 3.1. Modelado por homología de las enzimas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH respecto a Tb6-PGDH.

	<i>T. brucei</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>T. cruzi</i>
Código PDB	1PGJ	-	-
Nº residuos p/cadena	478	478	476
Nº residuos del dímero	956	956	952
% ID secuencia	100 %	71,19%	78,29%
RMSD Át. C α (Å)	–	0,07* (0,08 474 C α át.) [‡]	0,05 (0,05 474 C α át.) [‡]
Z-score (por cadena)	-10,1 (A) / -10,11 (B)	- 9,89 (A) / -9,90 (B)	- 10,15 (A) / -10,24 (B)
% Phi/Psi [§]	91,1	90,6 (92) [‡]	90,6 (92) [‡]

* Respecto a Tb6-PGDH (código 1PGJ)

[‡] (Valor para el modelo reportado)⁴¹

3.1.1.3 Discusión.

Los modelos estructurales para las enzimas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH que fueron utilizados en esta investigación fueron generados utilizando modelado por homología en base a la metodología ya reportada;⁴¹ los mismos presentan valores bajos de RMSD respecto al patrón, 0,07 y 0,05 Å respectivamente, gráficos de Ramachandran con alto porcentaje de residuos en las regiones más favorables (más del 90%) y Z-scores acordes a los reportados para el plegamiento de estructuras cristalinas. Todos los parámetros geométricos y energéticos determinados permitieron validar nuestros modelos para ser utilizados en las simulaciones de DM, que permitirán su refinamiento a nivel molecular en medio acuoso a 300K y su uso posterior para las mutaciones *in silico*.

3.1.2 Dinámica molecular de las enzimas nativas y mutadas de la 6-PGDH de *T. brucei*, *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*.

3.1.2.1 Introducción.

Los modelos generados por homología para las estructuras de la enzima 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi* no corresponden a estructuras cristalinas o elucidadas por RMN y, por tanto, pueden ser refinados estructuralmente con métodos de simulación de proteínas. En esta investigación la DM permitió además comprender a nivel molecular la naturaleza de los diferentes pares iónicos que ayudan a mantener la estructura dimérica de la enzima. Durante el tiempo de la simulación, y en base a nuestros objetivos, la descripción del sistema de acuerdo a la mecánica molecular en el entorno simulado y a la temperatura deseada constituye una representación teórica apropiada de la macromolécula para un sistema de esta magnitud.

Antes de simular la enzima Lm6-PGDH con DM fue necesario utilizar la estructura cristalina de *T. brucei* para establecer las condiciones y los parámetros de la simulación requeridos por los programas disponibles (VegaZZ¹²⁸ y NAMD¹²⁹). Esta corrida sirvió de DM “patrón” o de calibración para definir la metodología a

utilizar con las enzimas de interés. El análisis de trayectoria de las simulaciones de DM permitió obtener información de la evolución en el tiempo de las distancias entre pares iónicos en la estructura de la 6-PGDH para Kinetoplastidas. Asimismo, a partir de las estructuras de mínima energía resultantes de la DM para Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, fue posible realizar las mutaciones *in silico* de los residuos en sus respectivas secuencias de AA con la finalidad de restituir los puentes faltantes en ellas (en comparación a la enzima Tb6-PGDH).

3.1.2.2 Preparación de las estructuras de las enzimas 6-PGDH para la dinámica molecular.

3.1.2.2.1 Minimización de energía.

Antes de cualquier DM es necesario minimizar la energía del sistema a objeto de encontrar una estructura con geometría óptima, es decir, aquella donde los átomos no se encuentren ubicados entre sí de forma tal que la repulsión estérica sea desfavorable. En primer lugar para minimizar la estructura de Tb6-PGDH, se utilizó el algoritmo de gradiente conjugado implementado en NAMD¹²⁹ y una restricción de los átomos pesados del esqueleto de la proteína aplicada como constante de fuerza k en el archivo PDB (columna B). Es práctica común al simular proteínas fijar los átomos pesados de su esqueleto en lo que se conoce como una minimización con átomos fijos, o aplicar una constante de fuerza a los átomos para restringir su movimiento a una posición de referencia en la llamada minimización con restricción y así relajar los átomos de las cadenas laterales manteniendo la estructura secundaria. En la minimización de la estructura se encontró que utilizando valores de k menores a $100 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ no se conservan los elementos de la estructura secundaria típicos del plegamiento de la estructura cristalina de Tb6-PGDH que deben ser preservados para iniciar la DM (Tabla 3.2). Con un valor de k igual a $150 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ el número de residuos que forma cada elemento de estructura secundaria no cambia respecto a la estructura cristalina, al disminuir k hasta un valor de $50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$, el número de residuos que forman α -hélices disminuye de 540 a 513, y se pierden 20 residuos que forman láminas β ,

por lo que $100 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ fue el valor seleccionado para restringir inicialmente el esqueleto de la proteína Tb6-PGDH antes de la solvatación y el calentamiento. Una vez definido el valor de k que se utilizaría, se realizaron 5 ps de optimización geométrica con el algoritmo de gradiente conjugado, para buscar sobre la superficie de energía potencial una estructura que corresponda a un mínimo de energía respecto a todos los grados de libertad del sistema. A partir de esta estructura minimizada se realizó la preparación del mismo para la DM.

3.1.2.2.2 Protocolo de simulaciones.

A partir de las estructuras de mínima energía de las proteínas de interés Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, y sus correspondientes enzimas mutadas, se realizó la DM en las etapas ya definidas, cada una de ellas con el fin de obtener el sistema a la temperatura deseada y en el entorno más representativo de las condiciones fisiológicas que permitiera extraer información válida a partir de las trayectorias resultantes de la simulación.

Al sistema de la proteína ya preparada se aumentó la velocidad cinética de todos los átomos de forma tal que se obtuviera una distribución de Boltzmann a 300 K, con los átomos pesados del esqueleto restringidos para evitar distorsiones innecesarias en el calentamiento. Después, y en una etapa de pre-equilibrio, se liberaron progresivamente las restricciones, hasta llegar al mínimo valor de constante de fuerza que sería utilizado para evitar la pérdida de la estructura secundaria de la enzima. Un valor de constante de fuerza k igual a $1,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$ corresponde a una restricción mínima para la simulación ya que es equivalente a 0,1 veces la fuerza del enlace de la molécula de H_2 . Posteriormente, en la etapa de equilibrio a 300 K se realizó una DM a temperatura constante durante 0,5 ns con el valor de k mínimo y finalmente, en la etapa de producción se recolectaron los datos de todos los átomos del sistema de cada una de las configuraciones en forma de trayectorias que servirían para monitorear las distancias de los pares iónicos de interés.

Tabla 3.2. Elementos de estructura secundaria de Tb6-PGDH en la minimización con restricciones de Tb6-PGDH.

Elementos de estructura secundaria	k (kcal·mol ⁻¹ ·Å ⁻²)			Átomos fijos
	50	100	150	
α-hélices	512	535	535	535
3.10 hélices	43	21	21	21
Láminas β	60	82	82	82
Lazo	176	165	165	165
Vuelta	143	132	132	132

La validación de la DM se realizó en función a la energía total del sistema, el RMSD de los átomos pesados del esqueleto de la proteína, la temperatura y la conservación del plegamiento de la misma. En todas las simulaciones de la 6-PGDH de enzimas nativas y mutadas la energía total del sistema se conserva y no se observa pérdida alguna o anomalía a la temperatura de 300 K, el RMSD de los átomos del esqueleto de la proteína tiende a un valor aceptable que es menor a 0,45 Å para todas las enzimas (Figura 3.1).

3.1.2.2.3 Validación de las estructuras de la enzima 6-PGDH obtenidas con DM.

Los modelos de las proteínas nativas y mutadas también fueron evaluados, al finalizar cada etapa de la dinámica, de acuerdo a la calidad del mismo en relación a su geometría y plegamiento (Tabla 3.3).

Para el análisis de las enzimas simuladas se consideraron los siguientes parámetros: el RMSD (desviación respecto a la estructura cristalina utilizada como referencia), el plegamiento de la proteína (revisión energética en base al Z-score), la estructura secundaria (número de residuos para cada tipo de elemento) y la geometría (%Phi/Psi del gráfico de Ramachandran) para la verificación de los modelos.

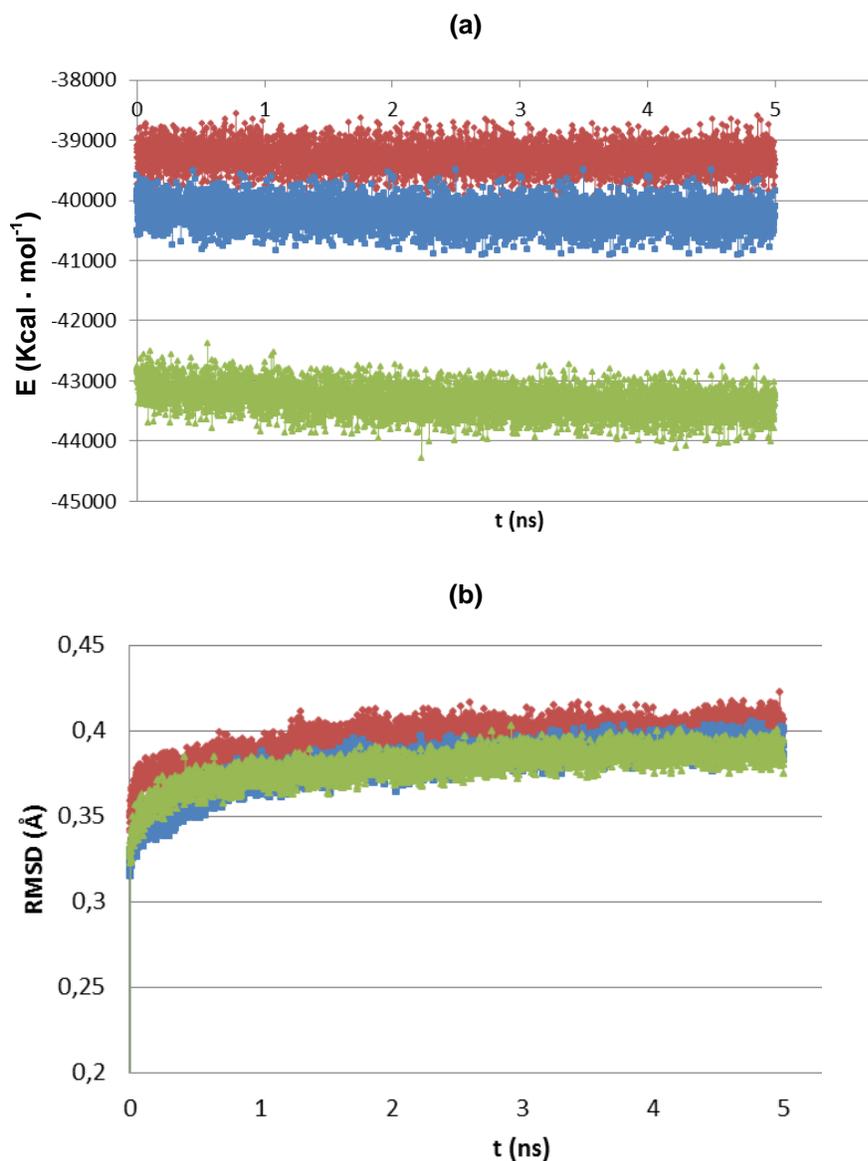


Fig. 3.1. Validación de las trayectorias de DM para las estructuras de enzimas nativas de la 6-PGDH. Energía total (a) y RMSD (b) en función del tiempo, *T. brucei* (azul), *L. (L.) mexicana* (rojo) y *T. cruzi* (verde).

En general, los datos de la Tabla 3.3 muestran que en el transcurso de las simulaciones las estructuras exhiben poca o ninguna desviación en cada uno de los parámetros analizados respecto a la estructura cristalina en el caso de Tb6-PGDH y a la estructura inicial de mínima energía para Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, lo que sugiere su conservación en el tiempo. Por ejemplo, para la estructura de

referencia Tb6-PGDH el RMSD siempre es menor a 0,2 Å, con alto porcentaje de residuos en la región más favorable del gráfico Ramachandran (91,8% para la dinámica XI correspondiente a la última liberación, con menor constante de fuerza). Por otro lado, el Z-score para la estructura modelada durante todas las etapas se encuentra en un intervalo de -10,15 a -10,31, y en muy buena concordancia con el de su forma cristalina (-10,11), ya que su valor negativo corresponde a un plegamiento natural acorde con estructuras nativas. Se conserva también el número de residuos que forma cada elemento de estructura secundaria presente en la estructura cristalina (534 residuos en α -hélices, 24 formando 3.10 hélices, 82 en láminas β , 164 giros y 128 vueltas).

La conservación del plegamiento en un modelo se aprecia mejor en un gráfico como el de la Figura 3.2, donde cada elemento de estructura secundaria de Tb6-PGDH se indica por un color en función del tiempo en la corrida de producción de la DM. Las bandas horizontales de cada color, sin cambios a medida que transcurre el tiempo, reflejan la preservación del plegamiento de la estructura nativa.

Los modelos estructurales de Lm6-PGDH, Tc6-PGDH y sus respectivas enzimas mutadas también conservan el plegamiento y elementos de estructura secundaria durante toda la simulación y los datos para la validación de sus trayectorias de DM se presentan en el Apéndice B.

Tabla 3.3. Validación de los modelos de las enzimas nativas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas durante las etapas de DM.

	Calent.	Equilibrio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Prod.
k	100	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5	1,5	1,5
RMSD*	^a 0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,10	0,20	0,22	0,22
	^b 0,09	0,12	0,13	0,13	0,14	0,16	0,19	0,23	0,28	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
	^c 0,03	0,12	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,24	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Z-score	^a -10,25	-10,15	-10,2	-10,14	-10,21	-10,24	-10,26	-10,28	-10,27	-10,11	-10,13	-10,01	-10,01	-10,01
	^b -10,03	-10,10	-10,11	-9,95	-10,05	-9,93	-10	-10,13	-10,13	-10,15	-10,15	-10,15	-10,15	-10,15
	^c -10,27	-9,75	-10,21	-10,17	-10,14	-10,28	-10,21	-10,13	-10,24	-10,20	-10,12	-10,05	-10,05	-10,05
%Phi/Psi	^a 90,2	90,8	91,1	90,5	90,5	90,5	90,4	89,8	90,6	90,0	91,2	91,8	91,8	91,8
	^b 89,0	90,0	89,0	88,4	88,1	89,5	89,3	89,7	90,1	89,7	89,9	89,7	89,7	89,7
	^c 90,4	86,9	90,1	90,1	89,5	89,8	90,1	89,5	89,8	90,7	89,8	89,4	89,4	89,4
Elementos de estructura secundaria														
α- hélices	^a 535	536	534	535	537	535	534	537	536	539	541	539	539	539
	^b 536	538	536	538	539	535	536	533	538	537	538	538	538	538
	^c 528	528	540	540	540	541	540	541	539	542	539	537	537	537
3.10 hélices	^a 21	21	21	21	24	21	24	24	21	21	21	24	24	24
	^b 27	27	27	27	24	25	24	27	22	25	24	24	24	24
	^c 22	22	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Láminas β	^a 82	82	82	78	81	82	82	82	78	82	82	82	82	82
	^b 82	88	82	78	82	82	82	74	74	77	78	78	78	78
	^c 74	74	74	78	82	78	78	78	78	82	78	70	70	70
Lazo	^a 166	166	167	169	168	167	165	164	167	165	161	164	164	164
	^b 165	167	161	167	166	167	166	178	169	173	168	168	168	168
	^c 187	187	176	173	171	170	173	173	172	171	177	179	179	179
Vueltas	^a 132	133	134	134	130	133	128	130	133	132	132	128	128	128
	^b 127	126	131	125	126	127	130	122	129	124	128	128	128	128
	^c 129	129	122	123	122	124	123	122	122	125	120	127	127	127

* Para los átomos del esqueleto de la proteína respecto a la primera estructura de la DM

^a Tb6-PGDH

^b Lm6-PGDH

^c Tc6-PGDH

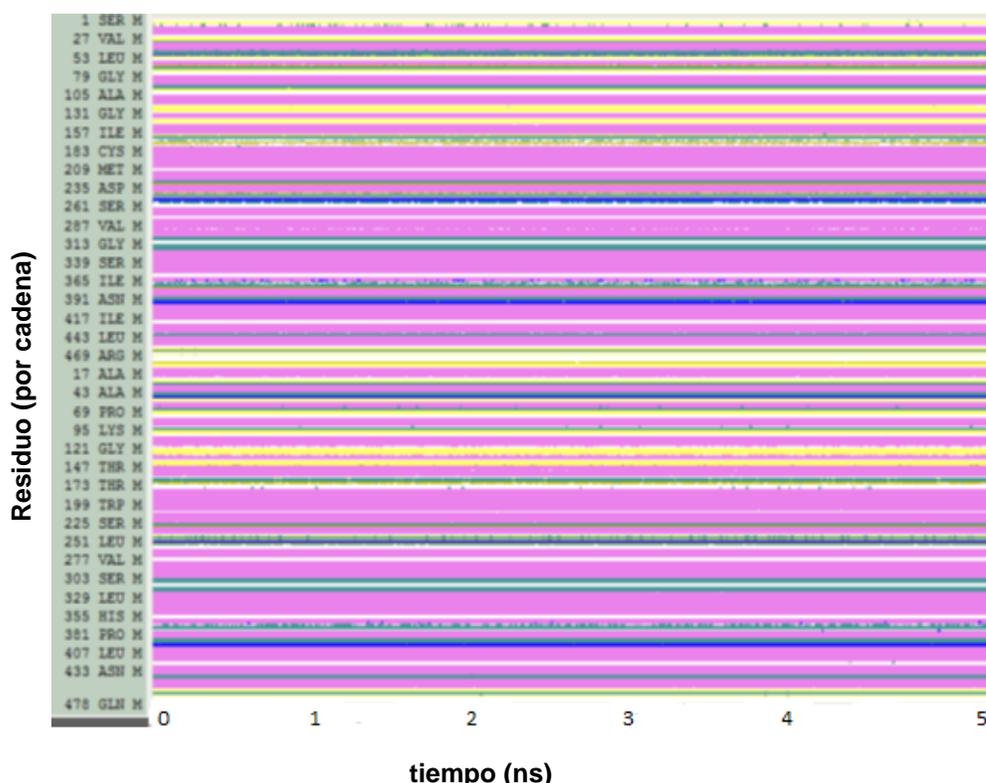


Fig. 3.2. Evolución de la estructura secundaria de Tb6-PGDH en el tiempo de simulación. (Color por elemento: morado: α -hélice, azul: 3.10 hélice, amarillo: lámina β , verde: vuelta, blanco: lazo). Imagen generada con VMD.¹³⁰

3.1.2.2.4 Discusión.

La estructura cristalina de Tb6-PGDH utilizada como referencia para la DM permitió establecer la metodología que fue aplicada en las simulaciones de las enzimas de interés. La validación de los modelos estructurales resultantes de todas las enzimas nativas y mutadas permitió comprobar que las condiciones de la simulación fueron apropiadas, en relación a la estabilidad de las estructuras que produjo la DM dado que los parámetros geométricos y energéticos obtenidos muestran concordancia con los esperados para buen modelo estructural, por lo tanto las estructuras de la 6-PGDH obtenidas son apropiados para su uso en modelado molecular, de acuerdo a la validez de las trayectorias generadas en base a la DM y las conclusiones que se puedan generar a partir de ellas, al igual que su aplicación para el diseño racional de fármacos.

3.2 Pares iónicos inter sub-unidades en la 6-PGDH de Kinetoplastidas.

3.2.1 Introducción.

El análisis de la estructura tridimensional de la enzima Tb-6PGDH ha mostrado que muchas de las interacciones que mantienen unidas ambas sub-unidades del dímero pueden ser de naturaleza electrostática (puentes salinos). Este hecho ha sido muy importante la hora de discutir las propiedades y estructura de la enzima ya que su forma activa es el dímero y, además, porque se ha observado una diferencia en el número de residuos que pueden formar puentes salinos en los tallos de las sub-unidades que conforman las enzimas de *T. brucei*,³⁰ *L. (L.) mexicana*⁴¹ y *T. cruzi*,⁴² lo que también ha sido relacionado con la inestabilidad cinética de estas últimas.

En esta investigación la trayectoria resultante de la DM permitió profundizar en la visión estructural y en la dinámica del comportamiento de cada una de las enzimas modeladas (nativas y mutadas), ya que sirvió para la caracterización de cada par iónico en base a su geometría y a su evolución en el tiempo. El modelo tridimensional obtenido para Lm6-PGDH se utilizó también para estudiar la influencia que tiene la ubicación de cada una de las interacciones identificadas en el sitio activo de la misma.

3.2.2 Ubicación de los pares iónicos en la 6-PGDH de Kinetoplastidas.

La dimerización de la estructura de la 6-PGDH involucra la interacción de pares iónicos de la región C-terminal, o tallo, de cada sub-unidad que forman puentes salinos. En Tb6-PGDH se han identificado cinco puentes entre sub-unidades, dos de ellos en el dominio de la coenzima, R459-E134 (puente 1) y E477-K139 (puente 2), y tres en el dominio hélice, E463-R259 (puente 3), R464-D246 (puente 4) y D466-H255 (puente 5) (Figura 3.3a). En la secuencia de Lm6-PGDH ocurre un cambio en la secuencia que reemplaza un AA con cadena lateral negativa en *T. brucei* por uno neutro, E477 por A477, lo cual genera la pérdida de un par iónico (2), por tanto, en esta proteína sólo están presentes cuatro de los cinco pares (1, 3, 4 y 5). En esta enzima, el residuo D246 del par 4 en Tb6-PGDH

es reemplazado por E246 y en el par 5 la H255 de Tb6-PGDH es reemplazada por K255 (Figura 3.3b). La enzima Tc6-PGDH mantiene tres de los cinco puentes presentes en Tb6-PGDH. El puente 1 entre R459 y E134, el puente 2 formado por E477 y K139 y el puente 5 entre D466 y H255. Los cambios de R259 y D246 de la secuencia de *T. brucei* por aminoácidos que no son cargados en la enzima de *T. cruzi*, C259 y V246, respectivamente, conllevan a la pérdida de los puentes 3 y 4, ambos en el dominio hélice (Figura 3.3c).

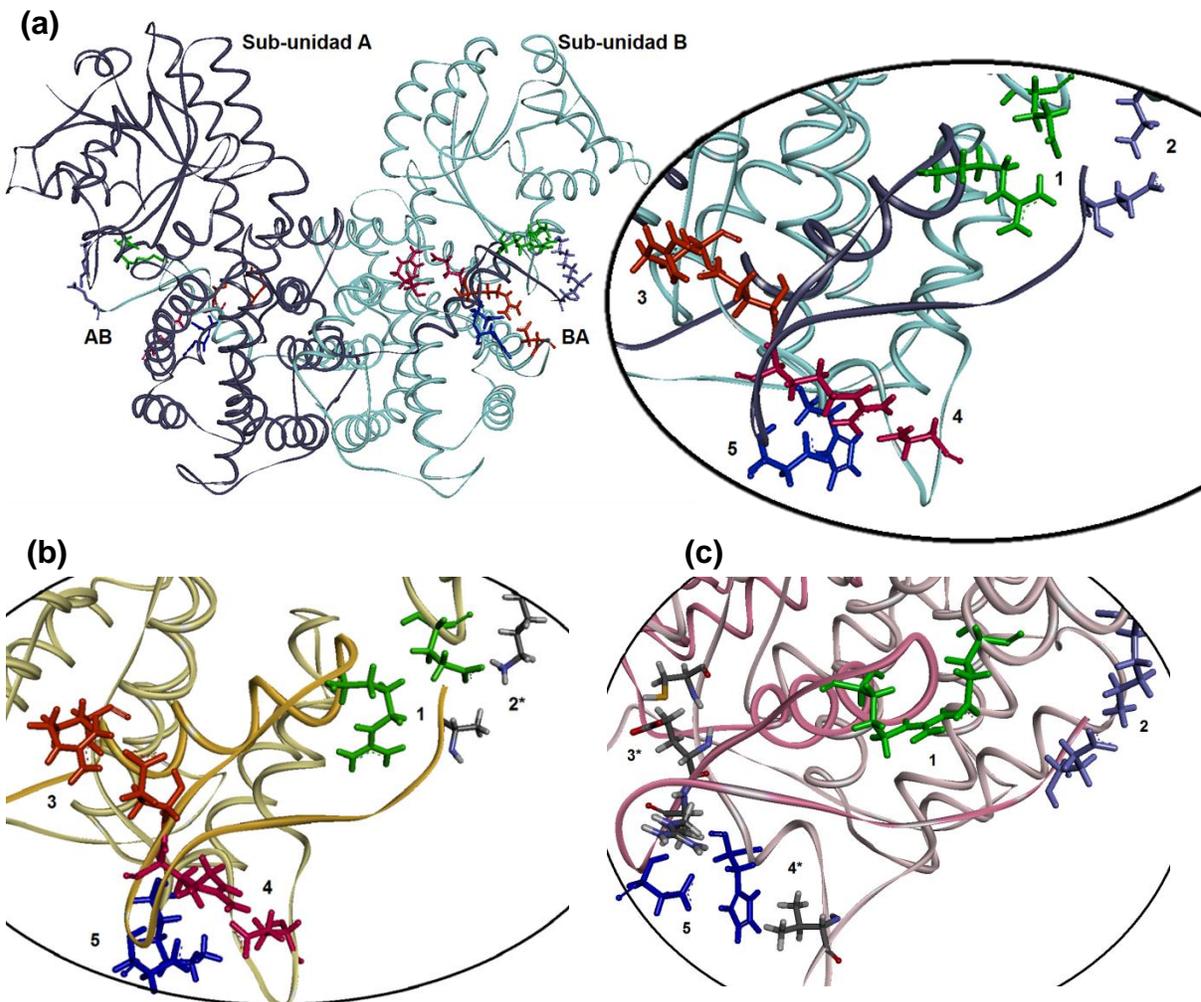


Fig. 3.3. Dímero de la 6-PGDH en distintos Kinetoplastidas. Detalle en el sitio activo para (a) *T. brucei* (b) *L. (L.) mexicana* (c) *T. cruzi* (pares iónicos entre sub-unidades: 1 verde, 2 lila, 3 naranja, 4 fucsia y 5 azul, *ausente)

A continuación se discuten los resultados obtenidos respecto al comportamiento de cada uno de los pares iónicos bajo estudio en las corridas de DM para las cinco enzimas simuladas: las tres enzimas nativas Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH y las dos mutadas, Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH, y luego, se analiza cómo la ubicación de los mismos en la estructura 3D de la 6-PGDH es un factor estructural que podría influir en la estabilidad cinética de la misma.

3.2.3 Análisis de las trayectorias de DM para las enzimas 6-PGDH de Kinetoplastidas.

Los pares iónicos se clasificaron de acuerdo a su geometría según el criterio definido por Nussinov y colaboradores,¹⁵¹ aquellas conformaciones donde la distancia entre centroides r se encontraba a 4 Å se consideraron puentes salinos, aquellas cuyo r fue mayor a 4 Å pero contaban al menos con un par de átomos de N y O a esa distancia se consideraron par N-O, y aquellas en las que r y todas las distancias N-O se hallaban a más de 4 Å se clasificaron como par iónico de largo alcance.

El análisis de las trayectorias incluyó la cuantificación de cada uno de estos tipos de interacciones para cada par iónico presente en las enzimas nativas y en las mutadas. Para ello, se calculó el porcentaje de ocurrencia que se definió como la relación entre el número de conformaciones encontradas como puente salino, par N-O o par de largo alcance y el número de total de conformaciones muestreadas durante la simulación (5.000 conformaciones). Este cálculo se realizó para cada enzima nativa y mutada a ambos lados del dímero (AB y BA) (Tabla 3.4).

Además, a fin de obtener un perfil del comportamiento de cada uno de los pares iónicos los valores obtenidos de r fueron graficados en función del tiempo para cada una de las enzimas nativas Tb6-PGDH, Lm6-PGDH, Tc6-PGDH y sus

respectivas enzimas mutadas Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH de cada lado del homodímero: AB (Figura 3.4) y BA (Figura 3.5).

Tabla 3.4. Frecuencia de los tipos de pares iónicos[§] de acuerdo a su geometría en la trayectoria de DM para las enzimas nativas y mutadas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas.

N° de par	%ocurrencia [‡]				
	<i>T. brucei</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Lm*6-PGDH</i>	<i>Tc**6-PGDH</i>
1	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134	R459-E134
a	93,72 / 92,1	99,98 / 100	6,56 / 99,86	71,95 / 0	99,95 / 99,7
b	6,28 / 7,9	0,02 / 0	93,44 / 0,14	27,5 / 100	0,05 / 0,3
c	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0,55 / 0	0 / 0
2	E477-K139	A477-K139*	E477-K139	E477-K139	E477-K139
a	99,74 / 99,46	*	100 / 99,32	100 / 98,9	100 / 100
b	0,26 / 0,54	*	0 / 0,68	0 / 1,1	0 / 0
c	0 / 0	*	0 / 0	0 / 0	0 / 0
3	E463-R259	E463-R259	E463-C259*	E463-R259	E463-R259
a	99,68 / 98,74	2,56 / 19,92	*	30,3 / 97	7,5 / 100
b	0,32 / 1,26	97,28 / 79,50	*	69,7 / 3	92,5 / 0
c	0 / 0	0,16 / 0	*	0 / 0	0 / 0
4	R464-D246	R464-E246	R464-V246*	R464-E246	R464-D246
a	100 / 99,96	71,36 / 0	*	4,95 / 62,25	57,1 / 98
b	0 / 0,04	28,6 / 0	*	83,1 / 37,75	42,9 / 2
c	0 / 0	0,04 / 100	*	11,95 / 0	0 / 0
5	D466-H255	D466-K255	D466-H255	D466-K255	D466-H255
a	18,3 / 21,3	99,96 / 100	13,86 / 71,8	100 / 100	33,35 / 85,55
b	81,7 / 78,7	0,04 / 0	86,12 / 28,2	0 / 0	66,6 / 14,45
c	0 / 0	0 / 0	0,02 / 0	0 / 0	0,05 / 0

[‡] Calculado para 5.000 conformaciones recolectadas durante 5 ns de DM de producción.

[§] Tipo de interacción del par iónico ^apuente salino, ^bpar N-O y ^cpar iónico de largo alcance.

*No hay par iónico.

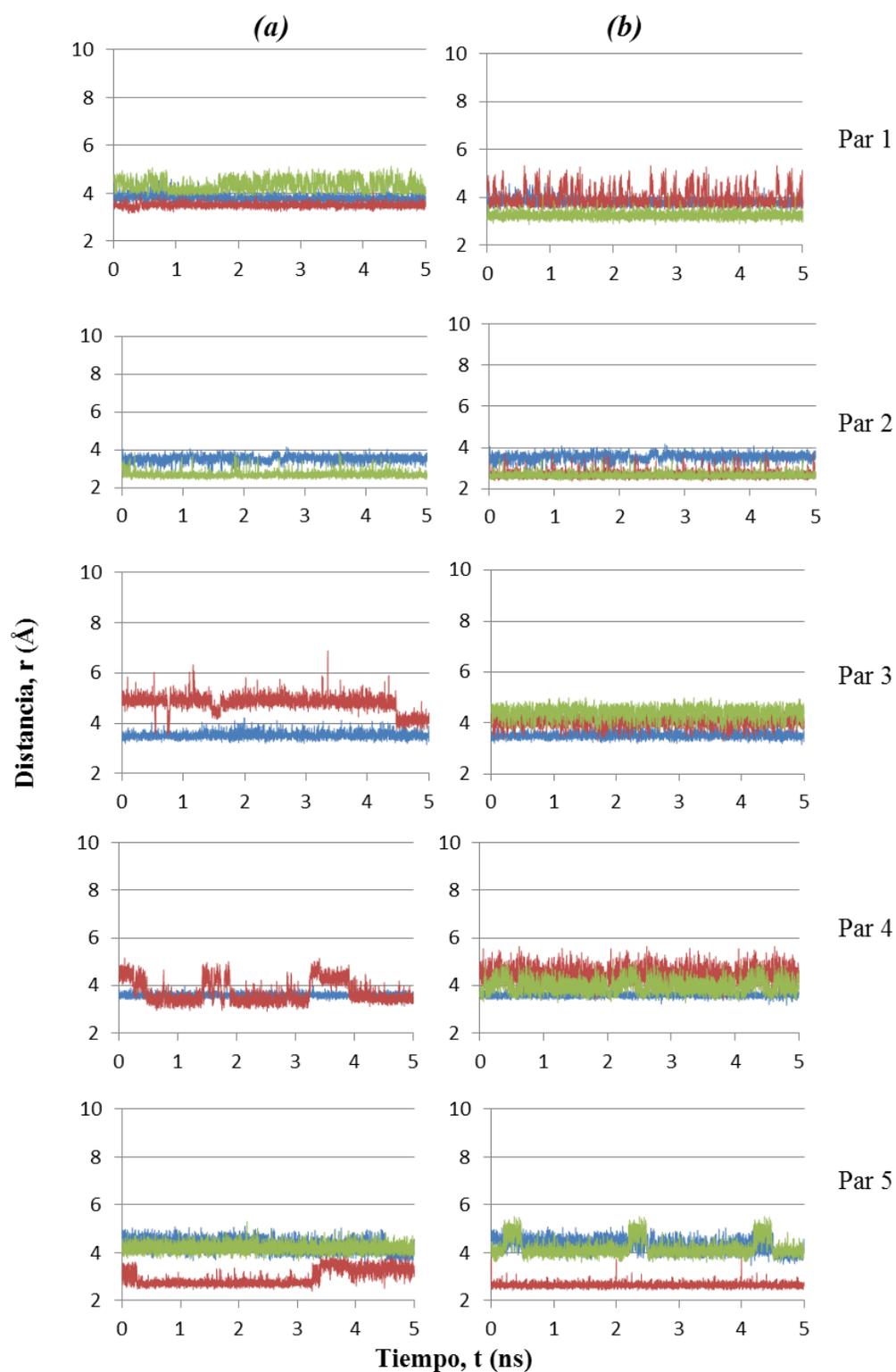


Fig. 3.4. Distancia entre centroides (r) en función del tiempo para los pares iónicos presentes en las enzimas (a) nativas y (b) mutadas (del lado AB del homo-dímero). Tb6-PGDH (azul), Lm6-PGDH (rojo) y Tc6-PGDH (verde).

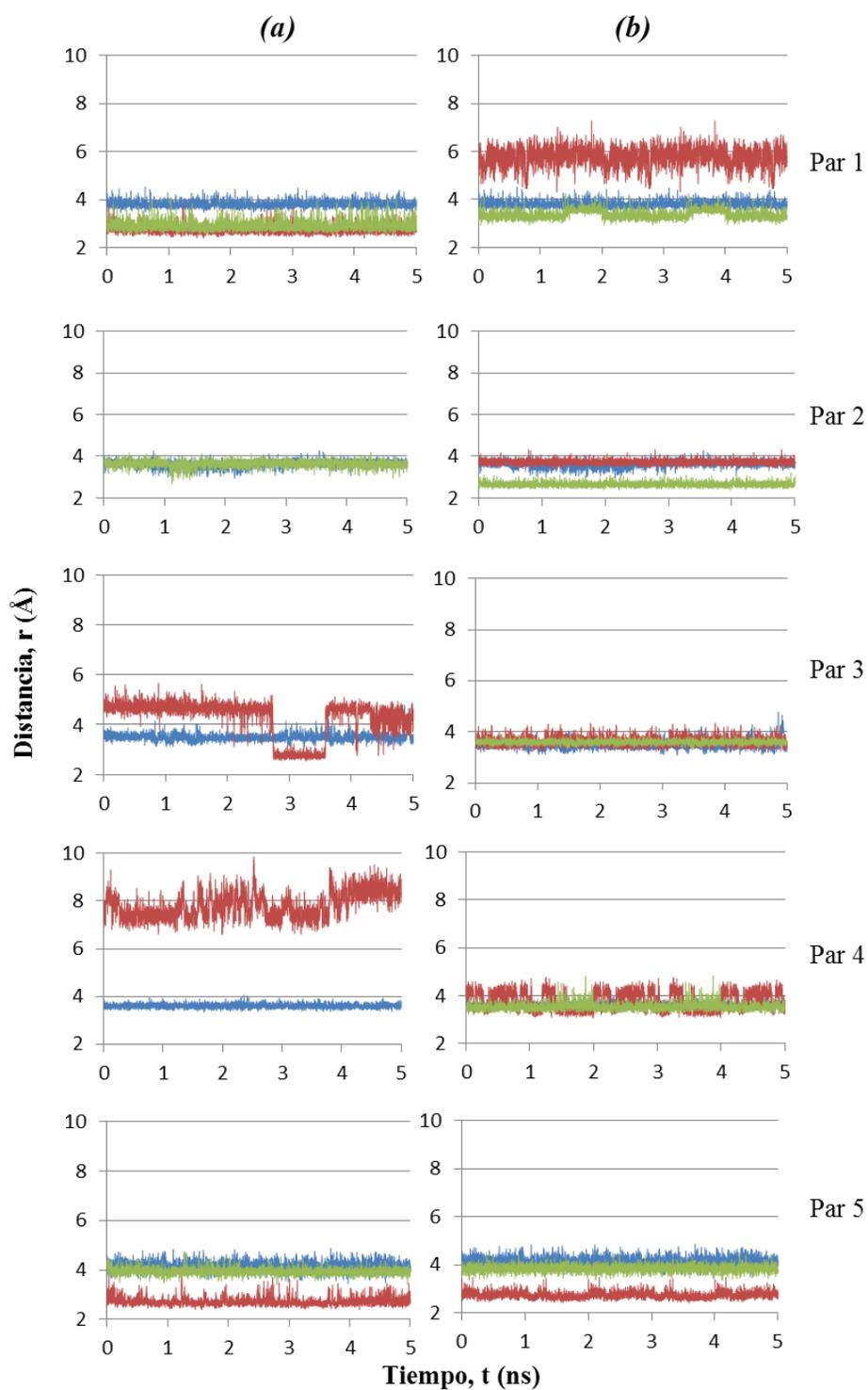


Fig. 3.5. Distancia entre centroides (r) en función del tiempo para los pares iónicos presentes en las enzimas (a) nativas y (b) mutadas (del lado BA del homo-dímero). Tb6-PGDH (azul), Lm6-PGDH (rojo) y Tc6-PGDH (verde).

3.2.4 Enzimas nativas.

3.2.4.1 Par iónico 1.

Este par iónico está constituido por los residuos R459 y E134 en las tres enzimas Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH donde interactúan los átomos O ϵ 1 y O ϵ 2 de E134 con los átomos N η y N ϵ de la cadena lateral de R459. La Tabla 3.4 muestra que más del 92% de las conformaciones en Tb6-PGDH y prácticamente el 100% de las conformaciones en Lm6-PGDH forman puentes salinos a ambos lados del dímero. En ambos casos, a medida que transcurre el tiempo, la distancia r tiende a 3,5 Å en *L. (L.) mexicana* y a 4 Å en *T. brucei*, confirmando que en ellas este par se comporta como un “puente salino” en el sentido formal del término (Figuras 3.4a y 3.5a). En la enzima Tc6-PGDH hay ligeras diferencias entre sí a ambos lados del dímero, lo que refleja la asimetría del movimiento de ambas subunidades en la dinámica de la estructura dimérica. Al igual que en sus homólogas, en Tc6-PGDH del lado BA se mantiene la predominancia del puente salino con más del 98 % de las conformaciones a una distancia de aproximadamente 3 Å (Figura 3.5a), mientras que en el lado AB es mayoría el número de conformaciones con interacción del tipo par N-O (93%), a una distancia que se mantiene alrededor de 4,5 Å, un valor cercano a la distancia óptima de puente salino (Figura 3.4a).

3.2.4.2 Par iónico 2.

El par iónico conformado por los residuos E477 y K139 sólo está presente en las enzimas Tb6-PGDH y Tc6-PGDH, donde la interacción ocurre entre los átomos de O del carboxilato de E477 (O ϵ 1 y O ϵ 2) con el átomo N ζ de K139. En la secuencia de aminoácidos de Lm6-PGDH el cambio de un residuo de cadena lateral positiva K139 por uno neutro A139, respecto a la secuencia de Tb6-PGDH, excluye la interacción tipo par iónico.

En la enzima 6-PGDH de *T. brucei* y en *T. cruzi*, para ambos lados del dímero (AB y BA), prácticamente la totalidad de las conformaciones (más del 99%)

están interactuando vía puente salino (Tabla 3.4). En estas estructuras en referencia al par iónico 2 la variación de r en función del tiempo es similar, con valores promedio de 3 y 3,5 Å respectivamente, y por debajo de 4 Å (Figuras 3.4a y 3.5a).

3.2.4.3 Par iónico 3.

El par iónico 3 está conformado por los residuos R259 y E463 y se encuentra en Tb6-PGDH y Lm6-PGDH. En la interacción intervienen los átomos O ϵ 1 y O ϵ 2 de E463 y N η 1 y N η 2 de R259. En la enzima Tc6-PGDH este par no se encuentra porque en su secuencia de AA hay un cambio del residuo cargado R259 por uno neutro C259.

De acuerdo con el perfil de la interacción del par iónico 3 para Tb6-PGDH y Lm6-PGDH, se observa que en la estructura de Tb6-PGDH predomina la interacción puente salino (más de 98% de ocurrencia) (Tabla 3.4), a ambos lados del dímero, AB y BA (Figuras 3.4a y 3.5a). En esta enzima la distancia entre centroides r del par 3 tiende a 3,5 Å en toda la simulación.

Por otro lado para Lm6-PGDH, en referencia a los valores de la Tabla 3.4 tiene 97% y 79% de las conformaciones monitoreadas interactuando como un par N-O a ambos lados del dímero, respectivamente. En esta enzima la distancia entre átomos de N y O de las cadenas laterales de sus AA oscila alrededor de 5 Å y además se observan fluctuaciones en este valor, a ambos lados del dímero, que inciden en el porcentaje calculado y sugieren el hecho de que la interacción entre el par de aminoácidos E463-R459 no se mantiene estable a una distancia óptima durante el tiempo simulado (como en el caso de Tb6-PGDH). Son esas variaciones en la distancia de interacción el tipo de fluctuaciones que pueden incidir en la dinámica de la enzima en la interfase de su estructura 3D donde se precisa de uniones fuertes que ayuden a mantener unidas ambas sub-unidades del dímero, ya que no es de esperar una fuerte atracción entre residuos que tienden a separarse.

3.2.4.4 Par iónico 4.

En Tb6-PGDH este par iónico lo conforman los residuos R464 y D246 que interactúan con los átomos de O del carboxilato O δ 1 y O δ 2 de D246 y los átomos N η 1 y N η 2 de R464. En Lm6-PGDH el par consiste de R464 y E246 donde el carboxilato del grupo ácido interactúa en este caso a través de los átomos O ϵ 1 y O ϵ 2. En la enzima Tc6-PGDH este par no existe porque en su secuencia de AA de enzima hay un cambio del residuo cargado E246 por V246 neutra.

Para Tb6-PGDH, durante el transcurso de la simulación el 99% de las conformaciones se encuentran formando puentes salinos tanto del lado AB como BA (Tabla 3.4), a una distancia de interacción óptima de 3,5 Å (Figuras 3.4a y 3.5a). Por otro lado, los resultados para Lm6-PGDH muestran que la interacción predominante es de largo alcance, ya que ocurre a mayores distancias, con un valor promedio de r mayor a 5,3 Å. Los valores de los porcentajes de ocurrencia calculados reflejan que entre las sub-unidades AB la formación de puentes salinos es de 71%, con la población de conformeros restante distribuida de la siguiente manera: 28% formando puentes N-O y alrededor de 1% con par iónico de largo alcance (Figura 3.4a), mientras que entre sub-unidades BA, el par 4 en Lm6-PGDH es 100% de largo alcance, a una distancia de separación promedio de 8 Å (Figura 3.5a). De lo anterior se puede decir que en Lm6-PGDH el par iónico 4 contrasta con lo observado para Tb6-PGDH. Este resultado sugiere que las diferencias halladas en el comportamiento de los residuos del par iónico 4 para las enzimas de Tb6-PGDH y Lm6-PGDH puede ser reflejo de diferencias en la naturaleza del mismo, más allá de la sustitución de un residuo E por D, la interacción en Lm6-PGDH tiene mayores fluctuaciones en el tiempo y ocurre a mayor distancia, lo que debe incidir de forma directa en la fortaleza de la misma, haciendo más lábil la unión entre ambas sub-unidades en referencia al lugar en el espacio donde se ubica este par iónico.

3.2.4.5 Par iónico 5.

Este par iónico lo constituyen los residuos D464 y H255 en Tb6-PGDH y Tc6-PGDH, los cuales interactúan mediante la carga positiva del anillo de imidazol de H255 y los átomos O δ 1 y O δ 2 del grupo ácido de D464. En Lm6-PGDH este par consiste de la interacción de la cadena lateral ácida de D464 y el N de K255.

En Lm6-PGDH casi el 100 % de las conformaciones forman puente salino a ambos lados del dímero (Tabla 3.4), a una distancia promedio de 3 Å (Figuras 3.4a y 3.5a). En Tb6-PGDH y Tc6-PGDH el par corresponde a D466 y H255 donde predomina la interacción de tipo par N-O, con 78 y 85% de las conformaciones, respectivamente, a una distancia un poco mayor que en el caso de Lm6-PGDH, pero que se mantiene entre 4 y 4,5 Å sin fluctuaciones significativas en el tiempo, dando como resultado una interacción del tipo par N-O que ocurre de forma sostenida entre los AA de este par.

De las combinaciones de residuos en los pares iónicos que se estudiaron, el par del tipo D-H presente en Tb6-PGDH y Tc6-PGDH, es el único que involucra un residuo de histidina. Respecto a la alta contribución de conformaciones de tipo par N-O en el par iónico 5 en Tb6-PGDH y Tc6-PGDH, respecto a Lm6-PGDH, hay una diferencia estructural que vale la pena destacar. En las enzimas con H255 la carga positiva del imidazol se encuentra deslocalizada en el anillo, mientras que en Lm6-PGDH la carga positiva la constituye el átomo de N ζ de K255, lo cual también puede suponer la variabilidad de las distancias medidas como r en las conformaciones de la trayectoria resultante de la simulación en las enzimas que involucran el residuo H, donde el centroide corresponde al centro geométrico del anillo de cinco miembros y no al átomo con la carga positiva, ya que efectivamente es un par N-O el responsable de la interacción a escala atómica y la distancia medida corresponde a la separación entre estos heteroátomos. Este hecho justificaría la mayoría de conformaciones formando par N-O de acuerdo al análisis realizado aplicando el modelo del centroide de Nussinov.¹⁵¹

En las tres enzimas nativas, Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH, la interacción del par iónico 5 está presente y se pudo caracterizar con predominio de un par N-O permanente durante la DM para Tb6-PGDH y Tc6-PGDH (con H como residuo positivo del par), y como un puente salino en el estricto sentido geométrico para Lm6-PGDH (con K255 como AA de carga positiva). Sin embargo, a efectos de la discusión posterior, los resultados en este par no suponen una diferencia entre las tres enzimas modeladas ya que en todas está presente y además es el más alejado al sitio activo en la estructura 3D de todas ellas.

3.2.5 Enzimas mutadas.

Para restituir los pares iónicos faltantes en las enzimas nativas de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*, respecto a los presentes en *T. brucei*, se realizó la mutación *in silico* $^{477}\text{A}\rightarrow^{477}\text{E}$ en Lm6-PGDH para restituir el par iónico 2 y las mutaciones $^{259}\text{C}\rightarrow^{259}\text{R}$ y $^{246}\text{V}\rightarrow^{246}\text{D}$ en Tc6-PGDH para restituir los pares iónicos 3 y 4, respectivamente, y así estudiar su efecto en el comportamiento de las mismas. Las enzimas mutadas *in silico* Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH fueron preparadas y simuladas de acuerdo a los procedimientos ya descritos para DM (Sección 2.2.2) con el fin de obtener una trayectoria de 5 ns de DM de producción para recolectar 5.000 conformaciones de ella, tal y como se obtuvo para las enzimas nativas.

3.2.5.1 Par iónico 1.

El perfil de esta interacción muestra que en el dímero de Lm*6-PGDH del lado AB la interacción es de tipo “puente salino” (alrededor de 4 Å) (Figura 3.4b); del lado BA, durante toda la simulación y de forma consistente se observa a 5,5 Å aproximadamente (Figura 3.5b). En términos de porcentaje, para Lm*6-PGDH el par iónico se caracteriza con más del 70% de las conformaciones formando puente salino del lado AB y 100% de las mismas como par N-O del lado BA (Tabla 3.4).

En Tc**6-PGDH la interacción del par iónico 1 ocurre a una distancia de 3,5 Å, menor que en el caso de su enzima nativa y sin las fluctuaciones observadas

en esta última (Figuras 3.4b y 3.5b). En esta enzima mutada el referido par se clasifica como puente salino a ambos lados del dímero durante todo el tiempo simulado, en más del 99 % de las conformaciones analizadas (Tabla 3.4).

3.2.5.2 Par iónico 2.

Para Lm6-PGDH en la enzima nativa no hay par iónico 2 entre los residuos A477 y K139. En su correspondiente enzima mutada Lm*6-PGDH, los resultados muestran que el par 2 se restituye y se comporta como una interacción de puente salino en prácticamente el 100% de las conformaciones durante los 5 ns de simulación (Tabla 3.4). Además, al examinar la distancia entre sus AA a cada lado del dímero se observa una diferencia en la misma estructura: con tendencia a 3 Å del lado AB y un poco mayor a 4 Å en el lado BA (Figuras 3.4b y 3.5b), pero siempre a distancia de puente salino lo que corresponde a la mejor geometría entre los residuos del par en todas las conformaciones. Este resultado valida la restitución del par iónico por efecto de la mutación *in silico* ⁴⁷⁷A→⁴⁷⁷E.

En la enzima nativa Tc6-PGDH, el par iónico 2 está presente como puente salino formal sin fluctuaciones; para Tc**6-PGDH la interacción también es un puente salino formal con una distancia promedio r de 1 Å menos que en la nativa en el 100% de las conformaciones, a ambos lados del dímero y durante toda la DM (Figuras 3.4b y 3.5b).

3.2.5.3 Par iónico 3.

En la enzima nativa de Lm6-PGDH el par iónico 3 está presente y se comporta más como una interacción de largo alcance que como puente salino, por las mayores distancias a las que ocurre y las significativas variaciones en ellas a lo largo del tiempo. En la enzima mutada Lm*6-PGDH del lado AB del dímero, la interacción entre residuos E463 y R259 del par iónico 3 se comporta como puente salino (30,3%) y par N-O (69,7%) durante el tiempo de DM simulado (Tabla 3.4), a una distancia r alrededor de 4,3 Å (Figura 3.4b). Del lado BA, se encuentra

predominio de la interacción vía puente salino (97%) a una distancia de interacción de 4 Å con el resto de las conformaciones formando par N-O (3%) (Figura 3.5b). En la enzima mutada la interacción entre los residuos involucrados ocurre a 4 Å sin fluctuaciones significativas, en comparación con los 5,5 Å de la enzima nativa y a la mayor variabilidad encontrada en ella, donde no hay par iónico 2. En base a estos resultados, como en Lm*6-PGDH la interacción entre los AA involucrados en el par iónico 3 ocurre a menor distancia, es de esperar que la interacción sea más fuerte (la atracción entre dos cargas opuestas obedece a una fuerza descrita por la Ley de Coulomb). Además el hecho de que el valor de 4 Å se mantiene prácticamente constante durante el tiempo simulado, sin fluctuaciones alrededor de él, es una evidencia a favor de su buena constitución en términos geométricos y su incidencia en la estabilidad del mismo.

En la enzima nativa Tc6-PGDH no está presente el par iónico 3; en la enzima mutada Tc**6-PGDH el par iónico 3 se restituye y sus residuos E463 y R259 se encuentran en la mayoría de las conformaciones formando puente salino (92,5%) y el resto como par N-O (7,5%) (Tabla 3.4), a una distancia r alrededor de 4,5 Å, el lado AB del dímero (Figura 3.4b). Del lado BA, la totalidad de las conformaciones interactúa vía puente salino (100%) a una distancia menor a 4 Å en promedio (aprox. 3,7 Å) (Figura 3.5b). Es importante señalar en este punto que en el perfil de esta interacción, a ambos lados del dímero, se observan pocas fluctuaciones alrededor de las distancias señaladas, reflejo de los altos porcentajes en las interacciones más favorecidas geoméricamente, puentes salinos y par N-O, y evidencia de la restitución de la interacción como efecto de las mutaciones *in silico* $^{259}\text{C} \rightarrow ^{259}\text{R}$ y $^{246}\text{V} \rightarrow ^{246}\text{D}$.

3.2.5.4 Par iónico 4.

En el dímero de la enzima nativa Lm6-PGDH el par iónico 4 formado por R464 y E246, está presente y fue caracterizado como par N-O, con marcadas fluctuaciones en la distancia a la que ocurre (entre 4–5 Å) y como par de largo

alcance con una distancia promedio de más de 8 Å, del lado AB y BA respectivamente. En la enzima mutada Lm*6-PGDH se favorecen las interacciones más cercanas del tipo par N-O y puente salino (Tabla 3.4). Del lado AB del dímero, casi 5% de las conformaciones forman puente salino, 83% par N-O y 13% par de largo alcance, a una distancia promedio alrededor de 4,5 Å sin fluctuaciones significativas en torno a este valor durante toda la simulación (Figura 3.4b). Del lado BA, la mayoría de las conformaciones forman puente salino 62% y el resto par N-O 38%, a una distancia alrededor de 4 Å en prácticamente todo el tiempo simulado (Figura 3.5b).

Para la enzima mutada Lm*6-PGDH en este par iónico, al igual que se encontró para el par iónico 3, los altos porcentajes de las interacciones más favorecidas geométricamente, puentes salinos y par N-O, así como las menores distancias encontradas respecto a la enzima nativa, permiten sugerir mayor estabilidad para esta interacción en la enzima Lm*6-PGDH donde fue restituido el par iónico 2.

En la enzima nativa Tc6-PGDH no hay par iónico 4; en la enzima mutada Tc**6-PGDH del lado AB, hay predominio de la interacción de tipo puente salino (57%) y una contribución importante de las conformaciones tipo par N-O (43%) y del lado BA, la mayoría de las conformaciones se encuentran como puentes salinos (98%) y las restantes par N-O (2%), a una distancia alrededor de 4 Å a ambos lados del dímero. Estos datos confirman la restitución de la interacción del par iónico 4 en Tc**6-PGDH como resultado de las mutaciones.

3.2.5.5 Par iónico 5.

En la enzima mutada Tc**6-PGDH el par iónico 5 está conformado por los residuos D466 y H255. A ambos lados del dímero se halla con mayoría de conformaciones de tipo puente salino y par N-O, tal y como se había encontrado en su enzima nativa (Tabla 3.4), en ambos casos interactuando a una distancia r promedio de 4,5 Å (Figuras 3.4b y 3.5b).

En Lm*6-PGDH la interacción ocurre entre D466 y K255, y se caracteriza también como un puente salino en 100% de las conformaciones a ambos lados del dímero (Tabla 3.4), una distancia de 3 Å sin fluctuaciones significativas (Figuras 3.4b y 3.5b).

Al no observarse diferencias significativas en el comportamiento de este par entre enzimas nativas y mutadas, y como está presente en todas las enzimas bajo estudio, se puede afirmar que tiene poca influencia en las diferencias observadas para el comportamiento de las enzimas de Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.

3.2.6 Naturaleza de los pares iónicos inter sub-unidades en la estructura de la 6-PGDH.

El análisis de las trayectorias de la DM de cada enzima nativa y sus respectivas enzimas mutadas han permitido estudiar la naturaleza de los pares iónicos inter sub-unidades en la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*.

Los resultados muestran que en estas enzimas los pares iónicos presentes no son todos puentes salinos estrictos, en el sentido de que durante el tiempo simulado la distancia entre residuos es mayor a la distancia de puente salino típica (4 Å) y se observan fluctuaciones en ella que sugieren un debilitamiento de la interacción. Los pares iónicos 1 y 5 están presentes en las tres enzimas y para ellos se observó menor variabilidad de la distancia en el tiempo, un alto porcentaje de conformaciones formando puentes salinos y una menor influencia de los pares ausentes en su comportamiento, en contraste con lo obtenido para los pares iónicos 2, 3 y 4, los mismos que en Lm6-PGDH y Tc6-PGDH se caracterizaron por ser interacciones que no corresponden a un puente salino formal, dado su comportamiento más variable y cambios en la geometría óptima entre residuos.

A manera de resumen, se realizó la comparación del porcentaje de ocurrencia de cada tipo de interacción (puente salino, par N-O y par de largo alcance) para los tres pares iónicos que se han revelado con mayor importancia

(2, 3 y 4) entre enzimas nativas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH y sus correspondientes enzimas mutadas (Figura 3.6).

En Lm6-PGDH la interacción del par iónico 2 está ausente y los resultados arrojaron que los pares iónicos 3 y 4 de esta misma enzima tienen muy pocas conformaciones en puentes salinos, y existen como interacciones a mayor distancia, bien sea como par N-O o interacción de largo alcance. En Tc6-PGDH no hay pares iónicos 3 y 4. La mutación *in silico* $^{477}\text{E} \rightarrow ^{139}\text{K}$ en la enzima Lm*6-PGDH restituye la interacción como puente salino (100% de las conformaciones a ambos lados del dímero) y los pares iónicos 3 y 4 también se ven afectados. En la enzima mutada, dichos pares presentan mayor porcentaje de conformaciones en puente salino y par N-O por tanto la distancia a la que ambos ocurren ahora es menor, lo que hace suponer una interacción más fuerte, además de que disminuyen las fluctuaciones en la distancia r entre centroides de los residuos que forman el par, lo que se refleja como mayor estabilidad en los valores de r respecto al tiempo. Este hecho se ha señalado como una diferencia importante entre las estructuras de Tb6-PGDH y Lm6-PGDH.

Los resultados de la DM muestran que los cambios *in silico* por los AA cargados en los pares iónicos faltantes (3 y 4) de la enzima mutada Tc**6-PGDH restituyen la atracción electrostática, con interacciones caracterizadas con alto porcentaje de conformaciones como puente salino y par N-O, a 4 Å o menos de distancia, y es de esperar que con mayor fuerza (Figura 3.6). También se observó que las mutaciones no ejercen mayor influencia en el comportamiento de los otros pares iónicos presentes (1 y 5) en comparación a su enzima nativa.

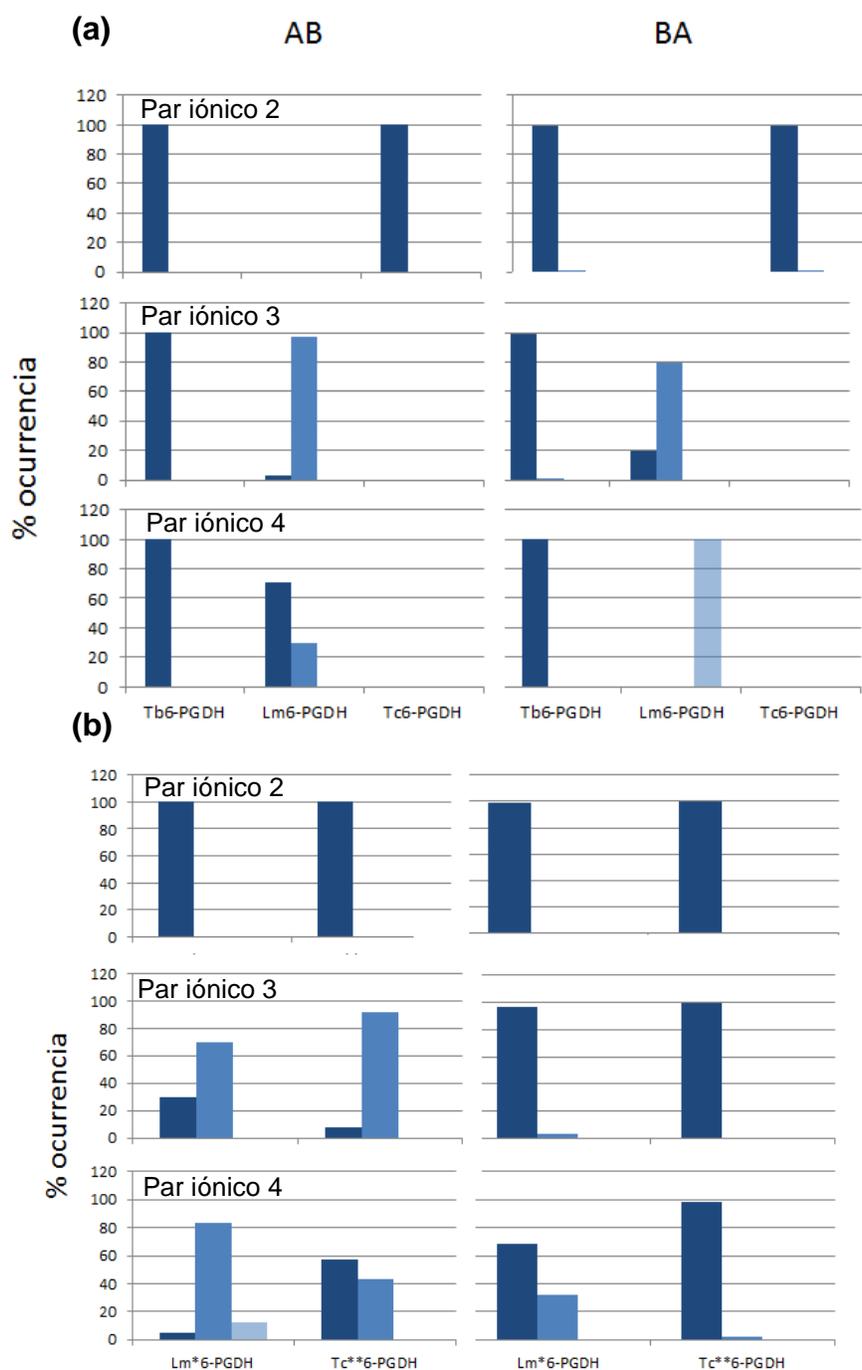


Fig. 3.6. Porcentaje de ocurrencia de interacciones de tipo puente salino, par N-O y par de largo alcance en los pares iónicos (2, 3 y 4) en enzimas 6-PGDH (a) nativas y (b) mutadas.

Experimentalmente, la inestabilidad cinética de Tc6-PGDH ha sido justificada en base a la ausencia de estas interacciones ya que la enzima doblemente mutada por la técnica de mutagénesis sitio-dirigida recuperó la

estabilidad.⁴² En este trabajo, el modelado molecular ha permitido aportar evidencia estructural para explicar esta inestabilidad observada mediante la caracterización de los pares iónicos presentes en Tc6-PGDH y su enzima mutada *in silico*. A escala atómica las interacciones en la enzima nativa tienen lugar a mayor distancia que un puente salino estricto y con alta variabilidad de sus valores en el tiempo, lo que se traduce en inestabilidad en las uniones que se encargan de enlazar ambas sub-unidades del dímero.

3.2.7 Discusión.

La dimerización es esencial para la actividad enzimática de la 6-PGDH y por ser un homo-dímero en su estructura se encuentran dos cavidades de sitio activo donde se lleva a cabo la reacción de forma independiente, de acuerdo al mecanismo aceptado.³² Se conoce que cada cavidad de la enzima consiste de residuos de AA de ambas sub-unidades, y aunque su sitio activo se conserva entre especies, particularmente en referencia a los residuos clave que anclan al sustrato, los que se unen al cofactor, y a los que actúan de base y ácido general, experimentalmente existe una gran diferencia entre las enzimas de distintos Kinetoplastidas desde el punto de vista de la actividad enzimática.⁴¹

La estructura de Tb6-PGDH es estable, se ha cristalizado y ha permitido realizar los estudios cinéticos correspondientes; además, presenta los cinco puentes salinos a los que se han adjudicado el papel de mantener unidas ambas sub-unidades del dímero. Los dos pares iónicos que forman puentes salinos en el dominio de la coenzima están formados por los AA R459-E134 (puente 1) y E477-K139 (puente 2), y a los tres pares del dominio hélice los conforman E463-R259 (puente 3), R464-D246 (puente 4) y D466-K255 (puente 5). Por otro lado, Tc6-PGDH y Lm6-PGDH no se han cristalizado y son inestables, hecho que ha limitado los ensayos cinéticos de las mismas, pero ambas existen y son funcionales, de forma tal que el interés en modelar dichas enzimas radica en comprender los factores estructurales que inciden en el comportamiento cinético y

su efecto en la afinidad de la 6-PGDH de estas especies por el sustrato natural. Por estas razones la DM ha sido una técnica muy útil para el modelado de las enzimas nativas Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH y sus enzimas mutadas, en tanto que permitió profundizar la comprensión de la catálisis a nivel estructural.

La estructura cristalina de Tb6-PGDH se encuentra depositada en el PDB en su forma apo (código 1PGJ) y como ella no dispone de sus ligandos naturales se realizó la superposición con la estructura del complejo de Oa6-PGDH y 6PG (código 1PGP) y con la del complejo de Ll6-PGDH que tiene el cofactor NADP⁺ y el inhibidor PEX (código 2IZ0), para ubicar así en la estructura tridimensional la posición de los cinco puentes de interés respecto al sitio activo. Además se realizó la superposición de las estructuras cristalinas que tienen ligandos con los modelos obtenidos para Lm6-PGDH y Tc6-PGDH verificando así la similitud en el plegamiento y ubicación del sitio activo en Kinetoplastidas (Figura 3.7a). En esta figura se observa además en el detalle como la cavidad del sitio activo yace en una interfase conformada por residuos de ambas sub-unidades (región centrada en la molécula de 6PG que se muestra como Superficie Accesible al Solvente, SAS).¹⁵⁹

Todos los pares iónicos estudiados inter sub-unidades son superficiales,¹⁶⁰ es decir, los residuos que los conforman están expuestos en la superficie de la enzima (Figura 3.8a). El par iónico 1 (R459-E134) está presente en todas las enzimas estudiadas, nativas y mutadas, y es un par que se encuentra al exterior de la cavidad justo al nivel donde se posiciona el sustrato. El par iónico 2 es el que se halla más al exterior de la estructura y se ubica justo en la entrada del sitio activo, frente a la región que comparten sustrato y coenzima (Figura 3.8b), también se observa que los pares 1 y 2 unen el extremo C-terminal de una sub-unidad con la otra. Los otros tres pares iónicos, 3, 4 y 5 forman las uniones entre ambas sub-unidades en gran parte de la interfase dimérica donde yace el sustrato. A efectos de la comparación el par iónico 5 está presente en todas las enzimas y es el más distante del sitio activo.

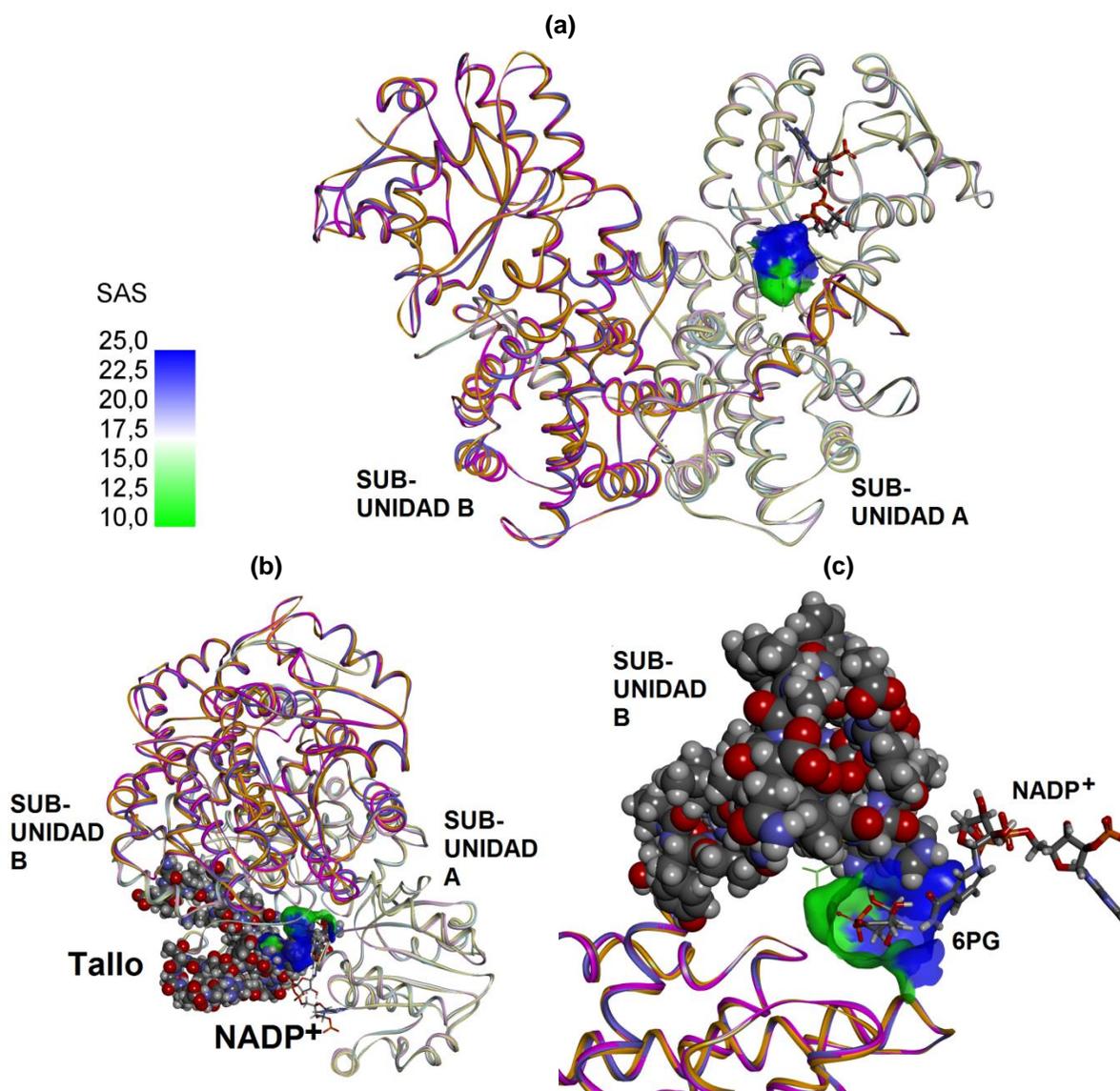


Fig. 3.7. Superposición de la 6-PGDH de Kinetoplastidas con la superficie accesible al solvente SAS, en Å², de la cavidad del sitio activo (a) Ubicación relativa de la cavidad del sustrato y la posición del cofactor (b) Vista lateral con los residuos del tallo en representación de esferas (c) Vista de la sub-unidad B que muestra el tallo como "cubierta" de la cavidad. Representación de lazo: *T. brucei* azul, *L. (L.) mexicana* amarillo y *T. cruzi* rosa (Sub-unidad B lazo claro)

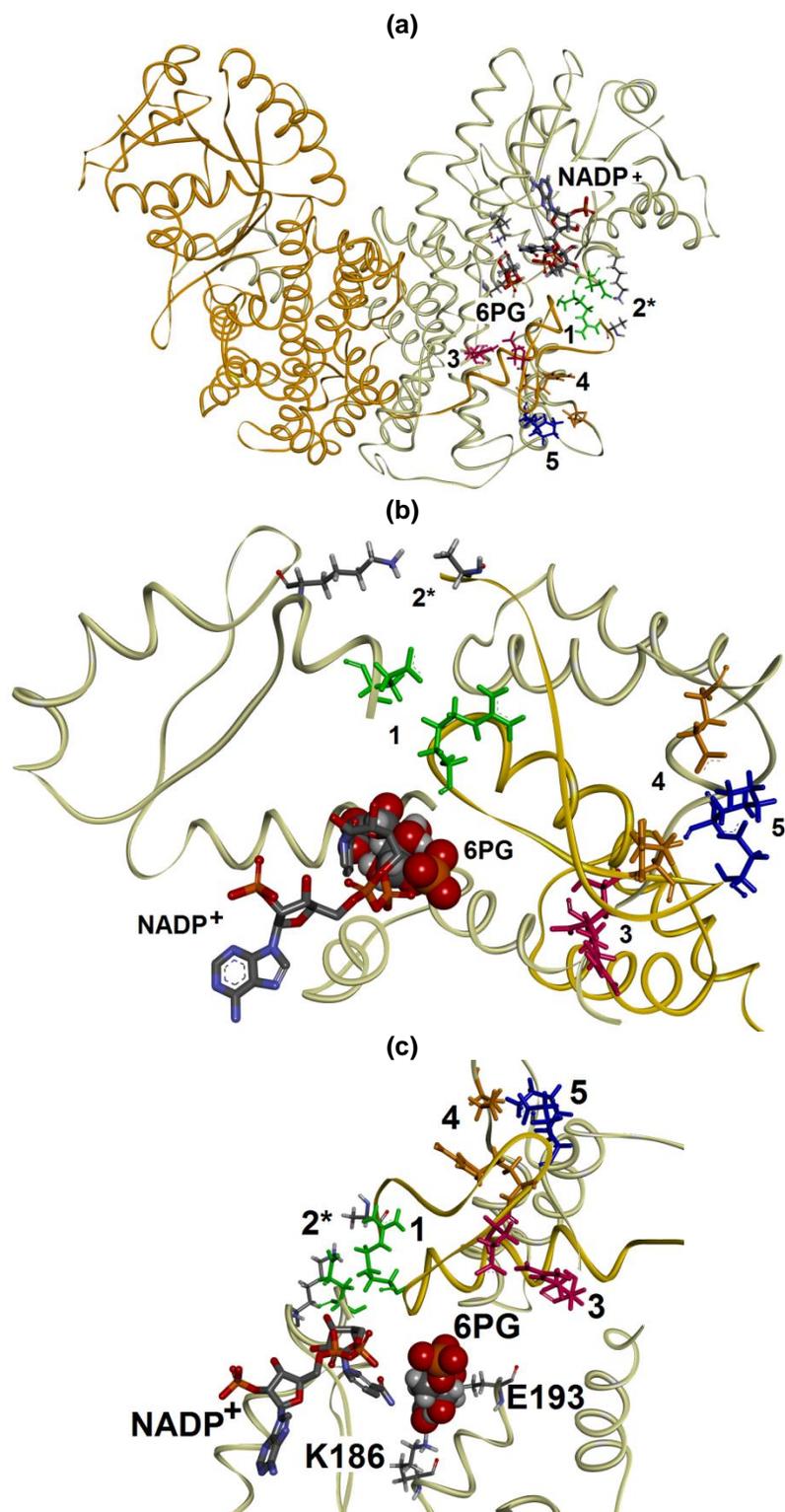


Fig. 3.8. Estructura de Lm6-PGDH con sus pares iónicos inter sub-unidades respecto al sitio activo (1, verde, 2* ausente 3, fucsia, 4, naranja, 5 azul) Sub-unidad A lazo amarillo, Sub-unidad B mostaza.

Los modelos 3D obtenidos y los resultados de las trayectorias de DM para los cinco puentes salinos se han interpretado a la luz del mecanismo de reacción aceptado, para intentar racionalizar la inestabilidad cinética de las mismas en base a la ubicación relativa de cada par iónico en la estructura de Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.

El análisis de la trayectoria de la enzima nativa de *L. (L.) mexicana* reveló que en su estructura los pares iónicos 3 y 4 no son puentes salinos y están mejor descritos como par N-O a largo alcance, a ambos lados del dímero. La comparación de Lm6-PGDH con Tb6-PGDH como enzima de referencia, y que posee todos los pares iónicos como puentes salinos, hizo suponer que la ausencia del par iónico 2 tiene un efecto en los pares 3 y 4.

En todas las enzimas 6-PGDH modeladas los residuos que conforman los pares iónicos 3 y 4 son consecutivos entre sí en la secuencia de AA y muy cercanos a los del par 2. En la estructura 3D los pares 3 y 4 conforman uniones en la interfase de ambas sub-unidades del dímero, por ello la pérdida del par 2 en Lm6-PGDH pudiera promover la separación entre las mismas, y es que si se pierde la fuerza de atracción que une el extremo terminal, o tallo, de una sub-unidad con la otra, la apertura en este punto puede reflejarse también en los residuos de los pares 3 y 4, aumentando las distancias a las que sus residuos interactúan y por lo tanto formando interacciones más débiles.

En la enzima mutada Lm*6-PGDH, cuando se restituye el par iónico 2 por mutación *in silico* $^{477}\text{A} \rightarrow ^{477}\text{E}$, no sólo se recupera la atracción electrostática entre E477 y K139 de tipo puente salino sino también se acorta la distancia entre los AA que forman los pares iónicos 3 y 4. Si las interacciones ocurren a menor distancia se espera que tengan mayor fuerza y contribuyan favorablemente a mantener unidas ambas sub-unidades del dímero. Como la constitución del dímero depende de ambas sub-unidades y no de una sola, es razonable pensar que las diferencias estructurales que originan variabilidad en las interacciones a ambos lados del dímero (respecto a distancia y geometría) van a afectar la conformación de la

cavidad del sitio activo y que este hecho tiene incidencia en la afinidad de la 6-PGDH al sustrato.

En la enzima mutada de *T. cruzi* donde se restituyen los pares iónicos 3 y 4, por las mutaciones *in silico* $^{259}\text{C}\rightarrow^{259}\text{R}$ y $^{246}\text{V}\rightarrow^{246}\text{D}$, respectivamente, se recupera la interacción de tipo puente salino. Experimentalmente, cuando se realizaron las mutaciones por mutagénesis sitio dirigida⁴² se recuperó la actividad enzimática, resultado que permitió confirmar el papel de estas interacciones en la estabilidad cinética de la misma.

Los resultados obtenidos para la Lm6-PGDH y su enzima mutada en el contexto de su estructura 3D revelan la importancia del par iónico 2. Este par demuestra ser esencial como fuerza de unión entre sub-unidades del dímero probablemente por ubicarse frente a la cavidad del sitio activo donde la reacción catalítica se lleva a cabo y también por su efecto en los pares iónicos 3 y 4, que constituyen el asiento del sitio activo (Figura 3.8b), y que además son las interacciones que han sido validadas experimentalmente como responsables de la inestabilidad cinética de Tc6-PGDH. En el dímero de Lm6-PGDH, si ambas sub-unidades tienden a separarse cerca del sitio activo porque no hay unión terminal que lo sujete y cierre la cavidad donde ocurre la reacción (par 2) (Figura 3.8c) es de esperar que también se vean afectadas las uniones de la interfase entre ambas que ayudan a sostener el sitio activo (pares 3 y 4) y por tanto que la enzima pierda afinidad por el 6PG y en consecuencia su actividad enzimática, ya que por el debilitamiento de las interacciones entre estos pares iónicos se haría más lábil la cavidad donde se encuentra posicionado el 6PG junto al cofactor para que ocurra la oxido-reducción.

En Tc6-PGDH al no contar con una buena interacción entre los pares iónicos 3 y 4, la enzima es inestable aunque exista la unión del par 2. Este resultado se encuentra en concordancia con el razonamiento anterior que adjudica a las interacciones 3 y 4 el rol de unión que favorece la constitución del sitio activo.

De acuerdo a los estudios mecanísticos, para que ocurra la oxidación del 6PG en la cavidad de Lm6-PGDH hay requerimientos estéricos significativos, ya que la orientación relativa entre sustrato y NADP⁺ debe ser tal que queden bien posicionados frente a los residuos que actúan como ácido y base general, y se necesita además, la cercanía con los grupos hidroxilo del 6PG y el anillo de Nicotinamida (Nam) del NADP⁺ (Figura 3.8c). En esta reacción la coenzima conforma con el sustrato el sitio catalítico y es imprescindible que ambas moléculas ocupen sus posiciones para que tenga lugar la transferencia del hidruro entre ellas. En la Figura 3.8c también se observa que K186 y E193 quedan orientados al sustrato y se encuentran al interior de la cavidad (opuestos a la superficie que contiene el par 2). En el mecanismo propuesto es la base quien promueve la transferencia del hidruro al desprotonar el hidroxilo del 6PG que se oxida. Además, los residuos de la sub-unidad B R454, F457, H460 y R464 forman una parte del sitio activo y también intervienen en la reacción, bien sea para conformar la cavidad mediante interacciones con otros residuos, como F457 y R459 (que además forma el par iónico 1), o por participación directa, como los residuos R454 y H460 que contribuyen a anclar al sustrato a la cavidad por interacciones con el grupo fosfato.

Para la enzima 6-PGDH de *S. cerevisiae* se realizaron los experimentos con enzimas truncadas, a las que se les eliminaba el tallo, las mismas seguían formando dímeros en solución pero perdían toda la actividad enzimática, este resultado permitió concluir que el tallo actúa como una “cubierta” sobre la cavidad de unión del sustrato para controlar la unión del 6PG y la liberación de producto, de forma que es indispensable para la actividad de la 6-PGDH, pero no es esencial para la dimerización,³⁴ al menos en esta especie. Este antecedente interpretado a la luz de los resultados obtenidos sugiere que la dimerización se debe en parte a la mayor superficie de contacto entre los dominios hélice de cada sub-unidad, y la pérdida del tallo implica disminución de la superficie de contacto. Respecto a la actividad de la enzima, el tallo tiene un papel fundamental, por tanto las interacciones entre sub-unidades que mantienen unido el tallo de una sub-

unidad con el dominio hélice de la otra, cobran particular importancia en base al mecanismo de reacción. Si bien todos los pares iónicos estudiados involucran residuos que pertenecen al tallo de un monómero de la 6-PGDH (residuos 442-478), es la interacción del par 2 en la superficie de la enzima frente al sitio activo la que puede actuar como una “cerradura” o “cierre” al sitio activo por ser la unión terminal de una sub-unidad con la otra (Figura 3.7b-c). En esta figura se observa que el tallo de la sub-unidad B cubre al sitio activo donde se encuentra el sustrato y el cofactor, actuando como “cubierta” o “tapa” a la cavidad en tanto que la unión representada por el par iónico 2 actuaría como el “cierre” de esa cubierta.

La importancia de estas interacciones en la enzima 6-PGDH radica en su ubicación relativa en el sitio activo y al hecho de que su cavidad yace en la interfase entre sub-unidades, por tanto se precisa de uniones a corta distancia y fuertes para mantenerlas unidas y que los residuos del tallo de la sub-unidad que se inserta en el dominio de la coenzima puedan cumplir con anclar el sustrato por interacciones específicas con el fosfato. De acuerdo a lo anterior, si las interacciones mencionadas no están presentes o son más débiles la cavidad del sitio activo se hace más lábil y el dímero puede ser más permeable a la entrada del solvente y a la separación de sus sub-unidades porque la unión entre ambas se dificulta a mayor distancia y, en consecuencia, es menor su fortaleza.

El análisis estructural en base a los resultados de las trayectorias de DM ha permitido aclarar que no es el número de puentes el que tiene un efecto en la estabilidad enzimática, sino su posición relativa en la estructura lo vendría a elucidar su rol en el comportamiento cinético. En resumen, al tallo de la 6-PGDH se le ha adjudicado el papel “cubierta” del sitio activo,³⁴ y el par iónico 2 vendría a ser la cerradura o “cierre” de la cubierta, encargado de unir ambas sub-unidades para cerrar la cavidad de la enzima y así conformar el lugar en el espacio donde ocurrirá la reacción. Los pares iónicos 3 y 4 son importantes en la estructura porque su presencia ayuda a sostener el sitio que sostiene a sustrato y cofactor, y por tanto su pérdida o labilidad en la 6-PGDH se puede relacionar con una pérdida

de la actividad de la enzima. Asimismo se entiende que la falta del par iónico 2, como interacción de puente salino, tenga incidencia en el resto por su cercanía en el espacio en la estructura 3D. Los pares iónicos 1 y 5 están presentes en todas las enzimas estudiadas y no parecen ser determinantes en la catálisis.

Es importante destacar que las interacciones electrostáticas entre sub-unidades son características de Tripanosomatideos y *L. (L.) mexicana*, en otras especies, por ejemplo en la 6-PGDH de bacteria *L. lactis*, con los AA presentes en el tallo serían posibles sólo tres de los cinco puentes, en la enzima humana sólo uno y en la enzima de oveja ningún puente salino (Tabla 3.5). Todas estas enzimas, cristalizadas y estables cinéticamente, tienen un tallo o extremo C-terminal rico en residuos neutros, donde se ha propuesto que las interacciones que mantienen unidas ambas sub-unidades del dímero no son de naturaleza electrostática sino hidrofóbica, con tallos más largos que ayudarían a la conformación del sitio activo.

La existencia de las interacciones electrostáticas entre residuos de ambas sub-unidades y su naturaleza son específicas de Kinetoplastidas, lo que también diferencia la 6-PGDH en estos parásitos en comparación a su contraparte humana, lo que promueve el avance en esta dirección con aplicaciones de la enzima como blanco terapéutico selectivo.

Tabla 3.5. Residuos del extremo C-terminal de la enzima 6-PGDH en diferentes especies, comparados con la formación de puentes salinos en Tb6-PGDH.

Enzima	Par 1		Par 2		Par 3		Par 4		Par 5	
	134	459	477	139	463	259	246	464	466	255
<i>T. brucei</i>	E	R	E	K	E	R	D	R	D	H
<i>L. (L.) mexicana</i>	E	R	A	K	E	R	E	R	D	K
<i>T. cruzi</i>	E	R	E	K	E	C	V	R	D	H
<i>L. lactis</i>	E	A	T	L	E	K	D	R	D	K
<i>O. aries</i>	E	A	T	Y	E	S	A	L	A	K
<i>H. sapiens</i>	E	A	T	Y	E	S	T	L	A	K

En negritas residuos neutros.

3.3 Barrido virtual de librerías en base al receptor de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.

3.3.1 Introducción.

Tal y como ya se ha descrito, la quimioterapia contra la leishmaniasis presenta dos grandes problemas: la toxicidad de los compuestos utilizados junto a sus efectos secundarios y la aparición de resistencias por parte del parásito, debido a ello es imperativo el desarrollo de nuevos fármacos. La validación de la PPP y las enzimas que contiene como blanco terapéutico en *Leishmania* y *Trypanosoma* ha motivado la búsqueda de inhibidores de la 6-PGDH para comenzar el proceso de desarrollo de un inhibidor que pudiera servir como líder potencial para un medicamento.

En esta investigación el modelado molecular *in silico* ha permitido obtener una estructura 3D refinada y validada para la enzima Lm6-PGDH, que además se utilizó en el barrido virtual de una librería de compuestos contra la estructura del receptor para seleccionar los mejores candidatos a fármacos. A falta de una estructura cristalina para la enzima del parásito *L. (L.) mexicana*, no son muchos los inhibidores que se conocen, que hayan sido ensayados experimentalmente o a partir de modelos. La librería de compuestos se construyó en base a inhibidores encontrados para Tb6-PGDH, enzima con la que Lm6-PGDH comparte alto porcentaje de identidad de secuencia de AA y plegamiento. Además, se ha realizado el barrido virtual para la contraparte humana de la enzima, ya que se han señalado suficientes diferencias estructurales entre Lm6-PGDH y Hs6-PGDH en su sitio activo, que permitirían ampliar el uso de la 6-PGDH no sólo como blanco terapéutico sino también como blanco selectivo para la leishmaniasis.

3.3.2 Preparación de las estructuras de los receptores Lm6-PGDH y Hs6-PGDH para el barrido virtual.

Hasta la fecha la estructura de la enzima de Lm6-PGDH no se encuentra cristalizada, en su forma apo o con ligandos, y como ha sido apuntado desde el inicio, uno de los principales objetivos al realizar su modelado molecular era obtener un modelo por homología refinado estructuralmente que permitiera

estudiar el comportamiento de los pares iónicos con DM. Asimismo, la enzima humana, Hs6-PGDH, si se encuentra co-cristalizada junto al cofactor NADP⁺ aunque no con el sustrato de la reacción, 6PG.

Para utilizar las estructuras de las enzimas como receptor hay que considerar que la aproximación de *docking* con receptor rígido y ligando flexible implementada en AutodockVina¹³³ no realiza el muestreo del espacio conformacional de los residuos del sitio activo de la enzima. La flexibilidad de los AA que lo conforman es crucial para predecir correctamente la forma en que un ligando se une a una proteína y, en consecuencia, las propiedades termodinámicas y cinéticas del complejo. En este sentido, para realizar el barrido virtual fue necesario obtener la mejor estructura posible de los receptores en presencia de sus ligandos naturales, ya que ella es factor determinante para el éxito del filtrado por posicionamiento molecular, por esta razón se realizó la DM de cada enzima a ensayar con el sustrato y el cofactor en presencia de solvente a 300 K.

Las estructuras de mínima energía obtenidas para la enzima del parásito y la humana con DM muestran una conformación plausible del 6PG, esto es, en ellas la molécula del sustrato se ubica dentro de la cavidad y su orientación está en concordancia con lo reportado previamente para otras especies. Las estructuras así obtenidas para los complejos Lm6-PGDH/6PG y Hs6-PGDH/6PG fueron minimizadas y, previa remoción de la molécula del sustrato, se utilizaron como estructura de partida del receptor para los ensayos posteriores de barrido virtual.

3.3.3 Comparación de las estructuras de los complejos de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH con 6PG.

3.3.3.1 Hs6-PGDH y Oa6-PGDH.

La estructura de mínima energía del complejo Hs6-PGDH/6PG obtenida con DM se superpuso a la estructura cristalina de su contraparte en mamífero Oa6-PGDH (1PGP), con la que comparte un alto porcentaje de identidad de secuencia

de AA (91,4%) (Figura 3.9). La estructura de la enzima de oveja dispone de una sub-unidad con la molécula de sustrato, a efectos de esta comparación, el dímero fue ensamblado a partir de su monómero y la molécula de NADP⁺ proveniente de Hs6-PGDH. La cavidad del sitio activo de Hs6-PGDH cuenta con la orientación adecuada de los residuos que participan directamente de la reacción, tales como K187 y E191, la base y el ácido general respectivamente, hacia los que se orienta el grupo carboxilato del 6PG, así como también aquellos que son determinantes para que la molécula de sustrato adopte la conformación adecuada H187, Y192, K261, T263 de una sub-unidad y R447 y R453 de la otra. Estos últimos conforman la llamada región positiva de la cavidad orientados al grupo fosfato del 6PG y que tienen el papel de anclarlo mientras ocurre la catálisis, tal y como ha sido reportado de los estudios mecanísticos con Oa6-PGDH y otras especies.^{30,31,32,35,39.}

Nuestros resultados muestran que la simulación permitió obtener un modelo apropiado por primera vez para el complejo de Hs6-PGDH/6-PG, que al ser comparada con la estructura cristalina de la enzima de oveja se observa alto grado de concordancia para la conformación del 6PG en ambas estructuras (RMSD 0,87 Å).

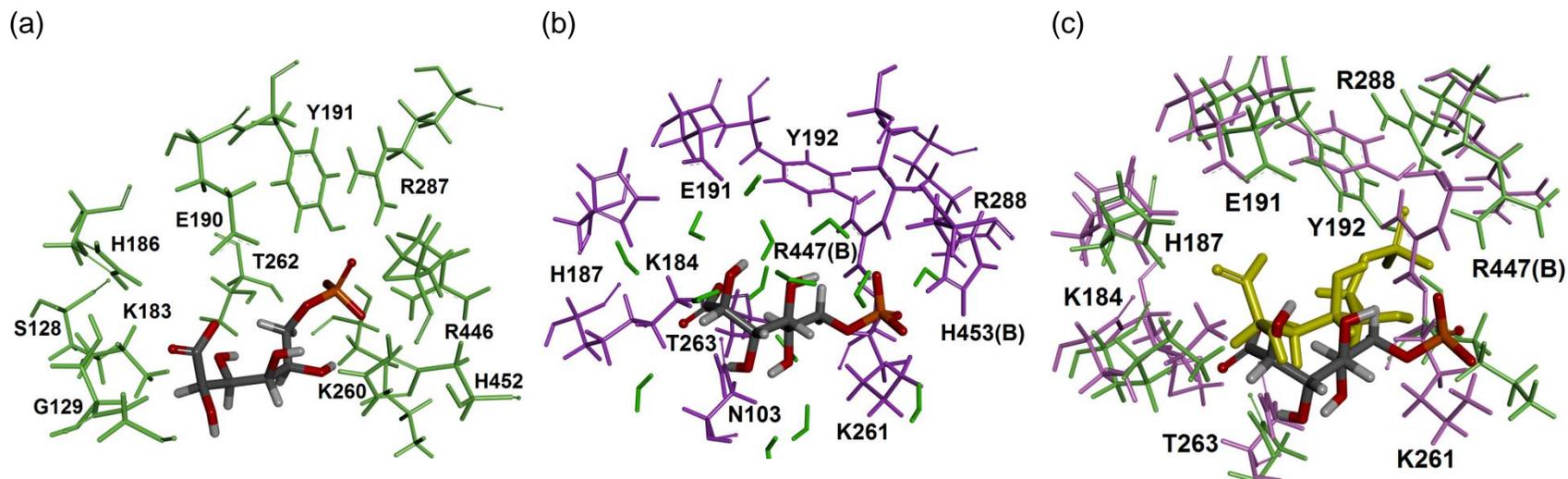


Fig. 3.9. Comparación de los complejos enzima/sustrato de Oa6-PGDH y Hs6-PGDH.

(a) Estructura cristalina de Oa6-PGDH con 6PG (modelo de barras C gris N azul O rojo H blanco) (b) Complejo de Hs6-PGDH obtenido por DM (moléculas de agua color verde) (c) Superposición estructuras Oa6-PGDH/Hs6-PGDH (modelo de barras amarillas conformación de Oa6-PGDH)

3.3.3.2 Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.

Las estructuras de los complejos Lm6-PGDH/6PG y Hs6-PGDH/6PG resultantes de la DM se compararon exhaustivamente en la región donde se ubican sustrato y cofactor (Figura 3.10). En ellas se reproducen las principales interacciones entre el 6PG y los residuos clave, que han sido identificados anteriormente también para las estructuras cristalinas de otras especies como por ejemplo Oa6-PGDH y Li6-PGDH.

La conformación del 6PG se describe con el grupo fosfato dispuesto hacia el bolsillo positivo de la misma que tiene los residuos que cumplen el papel de anclar el sustrato a la cavidad de Lm6-PGDH: Y194, K263, R290, H454(B), R459(B)¹⁶¹ y H460(B) para orientarlo mediante puentes de H con los grupos OH de C4 y C5 de la molécula de 6PG; mientras que el grupo carboxilato se posiciona hacia los residuos que actúan como ácido y base general en la catálisis (E193 y K186, respectivamente).

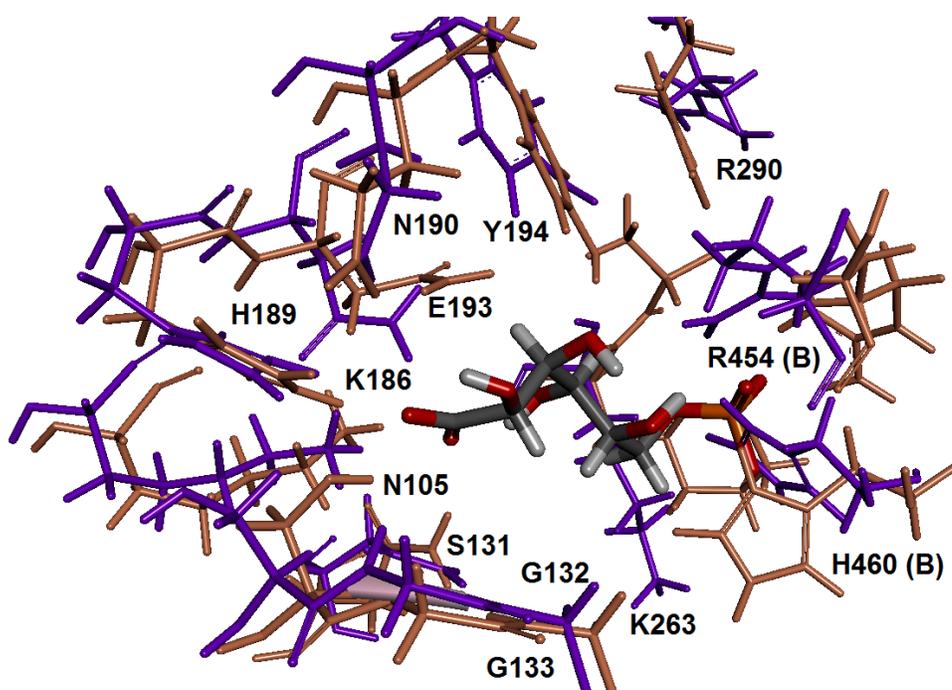


Fig. 3.10. Comparación complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH. Superposición de las estructuras de mínima energía resultantes de la DM.

Si bien el sitio activo de la 6-PGDH es conservado entre especies en relación a residuos clave tales como ácido y base general, los de unión al sustrato, al cofactor y al sitio catalítico, también se encuentran diferencias a destacar entre la enzima del parásito y la humana (Figura 3.11). Por ejemplo, en la región de huella dactilar de unión al cofactor ${}^7\text{GxxGxxG}^{12}$ donde la G central de la secuencia de AA de la enzima del parásito es reemplazada por A en la humana; también en esta misma región el residuo K139 reemplazado por Y en *O. aries* y *H. sapiens*. El sitio catalítico rico en residuos no conservados así como también el tallo más corto de Lm6-PGDH respecto a la enzima en mamíferos. A nivel estructural, para los modelos obtenidos para los complejos con 6PG en lo que respecta a la unión del cofactor a la cavidad se observa la interacción característica discriminante de NADP^+ de tipo pi-pi entre la cadena lateral de R33 y el anillo de adenina,³⁵ sin embargo también se encontró que la molécula de cofactor adopta una conformación ligeramente diferente en los complejos de ambas enzimas.

Sitio de unión al cofactor

	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Lmexicana	G	I	I	G	L	G	V	M	G	A	N	L	A	L	N	I	A	E	N	G
Oaries	A	L	-	-	-	A	-	-	-	Q	-	-	I	-	-	M	N	D	H	G
Hsapiens	A	L	-	-	-	A	-	-	-	Q	-	-	I	-	-	M	N	D	H	G

Sitio de unión al sustrato

	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Lmexicana	S	G	G	E	E	G	A	R	K	G
Oaries	-	-	-	-	D	-	-	-	Y	G
Hsapiens	-	-	-	-	D	-	-	-	Y	G

Sitio catalítico

	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189
Lmexicana	G	K	G	G	A	G	S	C	V	K	M	Y	H	N
Oaries	V	G	D	D	G	A	G	H	F	V	K	M	V	H
Hsapiens	V	G	D	E	G	A	G	H	F	V	K	M	V	H

Tallo

	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483
Lmexicana	A	L	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oaries	T	G	H	G	G	S	V	S	S	S	S	Y	N	A
Hsapiens	T	G	H	G	G	T	V	S	S	S	S	Y	N	A

Fig. 3.11. Residuos de importancia para la catálisis de la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y mamíferos (en rojo residuos no conservados).

El volumen de la cavidad del sitio activo medido por triangulación con Castp¹³⁸ en la enzima humana (1904 Å³) es mayor en comparación a su contraparte en parásito (1226 Å³) (Figura 3.12a). En la estructura de mínima energía resultante de la DM para Hs6-PGDH el fragmento de Nam de la molécula de cofactor presenta una conformación diferente respecto a Lm6-PGDH; se halla desplazado ligeramente hacia el exterior de la cavidad y ello afecta directamente el volumen de la misma (Figura 3.12b).

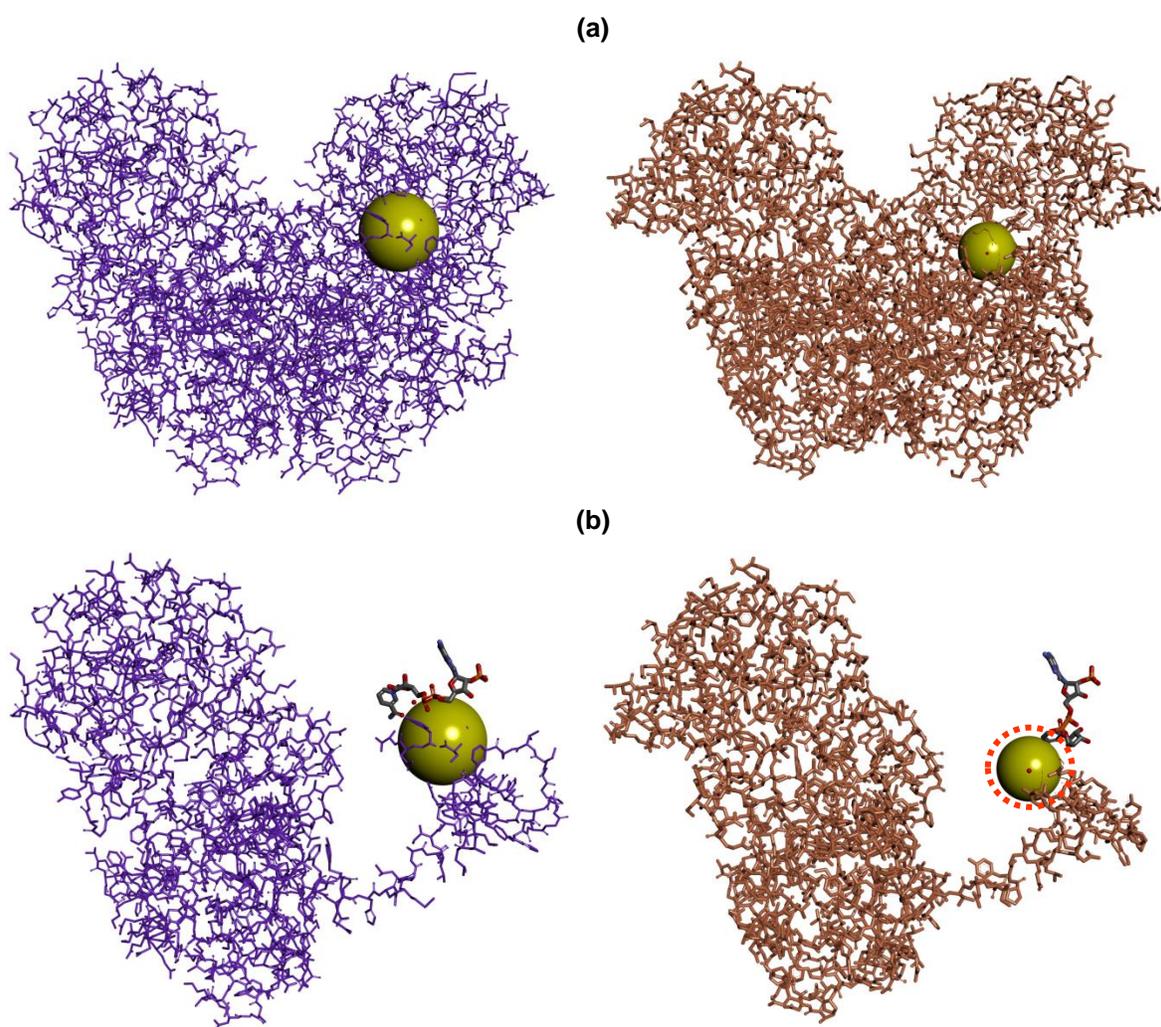


Fig. 3.12. (a) Volumen de la cavidad del sitio activo en los complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH (esfera amarilla) (b) Sub-unidad B de la 6-PGDH respecto a la ubicación del sitio activo (NAD⁺ en barras)

Hay tres factores estructurales que pudieran incidir en las diferencias encontradas para la conformación que adopta la molécula de la coenzima en Lm6-PGDH respecto a Hs6-PGDH (Figura 3.13a). En primer lugar, el cambio en el residuo K76 de la enzima humana que es reemplazado por N78 en la enzima del parásito. La larga cadena lateral del residuo K76 adopta una conformación tal que penetra la cavidad e interactúa directamente con el grupo fosfato del cofactor. En la estructura de la enzima humana este residuo pudiera colaborar en el desplazamiento del NADP^+ en la cavidad. En la enzima del parásito el residuo N78 con una cadena lateral mucho más corta no alcanza a penetrar en ella.

El otro cambio ocurre en la región de la huella dactilar del cofactor, en mamíferos la secuencia es **GxAxxG** mientras que en *L. (L.) mexicana* y *Trypanosoma* es **GxGxxG**.³⁰ El residuo central es G11 en la enzima del parásito, A12 en la humana, donde el grupo metilo de este AA ocupa un espacio que en la cavidad de la enzima del parásito se encuentra disponible para ser ocupado por la molécula del cofactor. El tercer detalle estructural radica en los residuos que conforman el tallo de cada enzima (extremo C-terminal de cada sub-unidad de la 6-PGDH). El tallo de la enzima humana es más largo, cargado de residuos neutros y once AA adicionales en comparación con Lm6-PGDH; en particular las dos G, una T y la serie de cuatro S (Figura 3.11).

De la comparación entre los complejos enzima/sustrato de la 6-PGDH del parásito con la humana, el factor que parece tener mayor influencia en las diferencias encontradas entre ambas cavidades y que permitiría explicar la conformación que adopta la molécula de cofactor es el de la longitud de los tallos. En la enzima humana, los residuos de su tallo más largo se insertan en la cavidad y ocupan un espacio que promovería el que la molécula de NADP^+ adoptará una conformación diferente para el fragmento de Nam y que este sea el factor estructural responsable de la apertura del sitio activo (Figura 3.13a).

La diferencia en la conformación de la molécula de cofactor se refleja también en las interacciones encontradas entre los residuos de cada enzima y el sustrato (Figura 3.13b). Tanto en Hs6-PGDH y Lm6-PGDH los residuos que conforman el bolsillo positivo de la cavidad se encargan de anclar el fosfato a la misma mediante interacciones de atracción electrostática del tipo puente salino y puentes de H; en Lm6-PGDH hay interacción directa con el NADP⁺ que forma parte de la cavidad, en Hs6-PGDH la interacción ocurre con S477, S478 y S479 del tallo. En detalle las interacciones con el fosfato en Lm6-PGDH se refieren a R454 (2,56 Å), H460 (2,67 Å), K263 (2,45 Å) y en Hs6-PGDH corresponden a R447 (2,71 Å), H453 (2,80 Å) y K261 (3,16 Å) (Figura 3.15c). En la enzima humana hay interacción vía puentes de H entre el OH del C3 del 6PG y los residuos S478 (3,32 Å) y S479 (3,42 Å), estos últimos se ubican en el espacio en el que en la enzima del parásito el grupo carboxilato del sustrato interactúa mediante atracción electrostática con el NADP⁺ (3,98 Å) que se introduce y forma parte de la cavidad, H189 (4,40 Å) y K186 (2,68 Å) y con puente de H con N105 (2,78 Å).

El análisis de las estructuras obtenidas apunta a que las mayores diferencias en la cavidad entre la 6-PGDH humana y *L. (L.) mexicana* radican en las diferencias de los residuos del tallo y cómo estos inciden en la constitución del sitio activo, y no debido a los otros AA que son diferentes en la enzima humana como había sido reportado (F31, N32, T34, Y35, T36 y K37).⁴¹ La superposición de nuestros modelos comprueba que las diferencias en sus orientaciones y el lugar que ocupan en la cavidad son mínimas.

La superposición del modelo de la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* con el de otras especies de interés *T. brucei*, *T. cruzi*, *H. sapiens* y *O. aries* se incluyen en el Apéndice C.

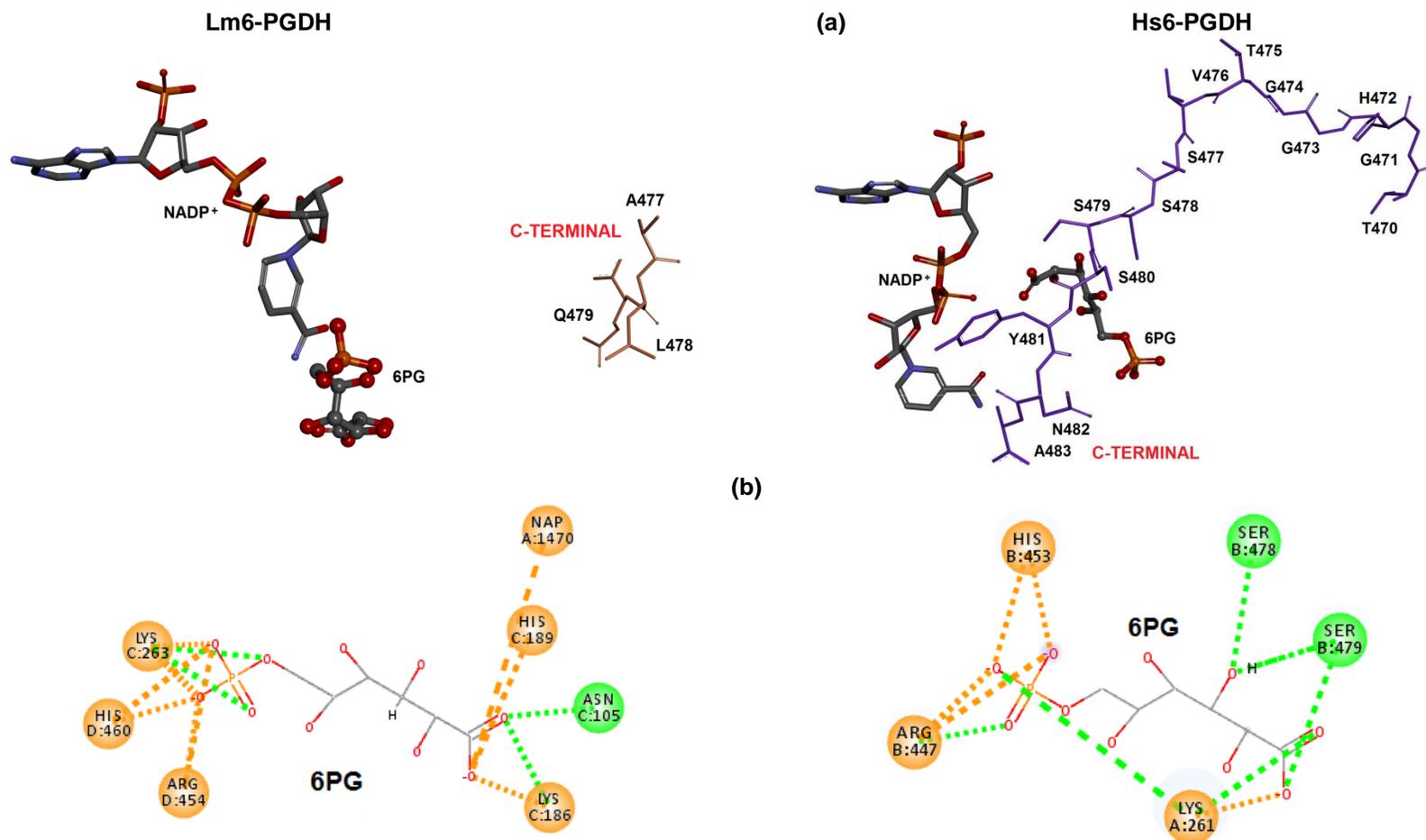


Fig. 3.13. (a) Tallo de la sub-unidad (B) en la cavidad de los complejos enzima/sustrato de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH respecto a la ubicación de NADP⁺ y al 6PG (b) Mapa 2D de las interacciones de la cavidad con el 6PG.

El cambio en la conformación de la molécula del cofactor tiene efecto en la cavidad del sustrato y por lo tanto en la forma en que un ligando se unirá a la enzima. Este hallazgo a nivel estructural es clave para sustentar el uso de la 6-PGDH como blanco terapéutico selectivo. Adicionalmente, este cambio conformacional inducido en la molécula de NADP⁺ podría ser clave para comprender cómo los espacios ocupados por ambos ligandos (sustrato y cofactor) se relacionan en la dinámica de la reacción catalítica de la 6-PGDH.

3.3.4 Barrido virtual de librerías para los modelos de las enzimas Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.

La búsqueda de compuestos con mayor afinidad a la enzima del parásito Lm6-PGDH en comparación a la humana Hs6-PGDH, se llevó a cabo mediante un barrido virtual en base al receptor con cada estructura y la misma librería química, a objeto de discutir sobre la selectividad de los compuestos ensayados. El código de acceso de todos los compuestos de la librería construida en las bases de datos ZINC y Malaria Box se presentan en el Apéndice D.

Cuando se comparan los compuestos obtenidos por jerarquía para Lm6-PGDH y Hs6-PGDH los resultados muestran que si hay selectividad de algunos de ellos a la enzima de parásito. El barrido virtual de la librería de compuestos se realizó veinte veces para cada enzima y los primeros veinte con menor valor de EI para Lm6-PGDH que no están presentes entre los que muestran buena afinidad por la enzima humana, fueron seleccionados como los mejores compuestos o *hits* (Tabla 3.7), y ellos corresponden a las posiciones: 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 y 18 (Figura 3.14).

En relación a la afinidad de los compuestos barridos contra la 6-PGDH como receptor, para ambas especies, todos los *hits* tienen menor EI respecto al sustrato. Para Lm6-PGDH las energías de los 780 compuestos de la librería van desde -9,5 a -4,82 kcal·mol⁻¹ con uno sólo de ellos que exhibe EI positiva (11,82

kcal·mol⁻¹) reflejo de que el mismo no alcanza una conformación estable dentro de la cavidad, de acuerdo a los parámetros de búsqueda para el barrido virtual. En esta enzima la EI correspondiente al complejo con el 6PG es -7 kcal·mol⁻¹, para el complejo del compuesto 1 es igual a -9,5 Kcal·mol⁻¹ y -9,1 y -8,7 kcal·mol⁻¹ en el caso de los compuestos 2 y 3, respectivamente. En la enzima humana, la EI de los complejos para todos los compuestos de la librería se encuentra desde -10,4 a -4,5 kcal·mol⁻¹ con -6,7 kcal·mol⁻¹ para el complejo enzima/6PG, -8,2 kcal·mol⁻¹ para el complejo con (1), -9 kcal·mol⁻¹ con (2) y -5,4 kcal·mol⁻¹ con (3).

A nivel estructural los *hits* poseen una parte polar conformada por heterociclos y grupos funcionales y una parte apolar de cadenas alquílicas y arílicas (Figura 3.14). Tienen peso molecular promedio de 312 g·mol⁻¹ y entre ellos destaca la presencia de un pirrol tetrasustituido con un anillo bencénico m y p-sustituido a 3, 4, 7 y 8 átomos de distancia. Los grupos sustituidos en el pirrol son de tipo acetilo (1, 7, 9, 12, 14 y 15) o etoxi carbonilos (3, 8, 11 y 17) y otros pirroles de menor peso molecular con un fenil sustituido (18) y con dos (11). El compuesto (16) es una sal de ácido sulfónico de un biciclo sustituido con el grupo hidroxilamina que también se ha reportado en un barrido virtual de Tb6-PGDH y es uno de los compuestos más activos ensayados (IC₅₀ 73 μM).⁶³

El compuesto (5) destaca entre las estructuras encontradas ya que es la única piridina entre los *hits*. El compuesto (1) para Lm6-PGDH ocupa la posición 11 en el ranking de la enzima humana, pertenece al grupo de las estructuras de los pirroles, con sustitución de un acetilo en el pirrol y un isopropilo en el benceno y es el de mayor afinidad por la enzima del parásito.

Desde el punto de vista químico, la librería fue construida por similitud estructural a compuestos que pudieran imitar el fragmento tipo aldosa del sustrato y de los resultados del barrido virtual se extrae que algunos heterociclos de cinco miembros (pirrol) o anillos fusionados de cinco y seis miembros (11) con grupos polares sustituidos cumplen con esta característica. Los compuestos obtenidos

con mayor afinidad muestran que la cavidad es suficientemente grande para permitir el ajuste de estructuras de ese tipo.

Tabla 3.6. Compuestos con menor EI obtenidos del barrido virtual de los complejos con Lm6-PGDH y Hs6-PGDH.

Posición	Lm6-PGDH ^a		Hs6-PGDH ^a	
1	ZINC14845416	(100) ^b	ZINC12687919	(100) ^b
2	ZINC12687919	(75)	ZINC15982176	(100)
3	ZINC6595121	(45)	ZINC262881	(100)
4	ZINC2913588	(55)	ZINC1617898	(100)
5	ZINC1624031	(50)	CHEMBL1724062	(45)
6	ZINC1617898	(40)	ZINC9752607	(45)
7	CHEMBL1367009	(40)	ZINC4831054	(45)
8	CHEMBL1494297	(30)	ZINC3556177	(45)
9	ZINC14812180	(45)	ZINC49016688	(55)
10	ZINC2628881	(35)	ZINC7005660	(50)
11	ZINC1708749	(45)	ZINC14845416	(15)
12	CHEMBL1731402	(35)	ZINC8944491	(50)
13	CHEMBL1699733	(45)	ZINC2028932	(40)
14	CHEMBL1471870	(20)	CHEMBL1699733	(45)
15	ZINC3587317	(25)	CHEMBL1431698	(25)
16	ZINC2913590	(40)	ZINC2913590	(40)
17	CHEMBL1558497	(15)	ZINC3590626	(30)
18	ZINC41288560	(35)	ZINC3543990	(10)
19	ZINC9752607	(30)	ZINC14158880	(10)
20	ZINC4831054	(20)	ZINC2913588	(25)

^a Códigos de acceso a las bases de datos ZINC y Malaria Box (CHEMBL)

^b Porcentaje de veces en que ocupa la posición en los 20 barridos.

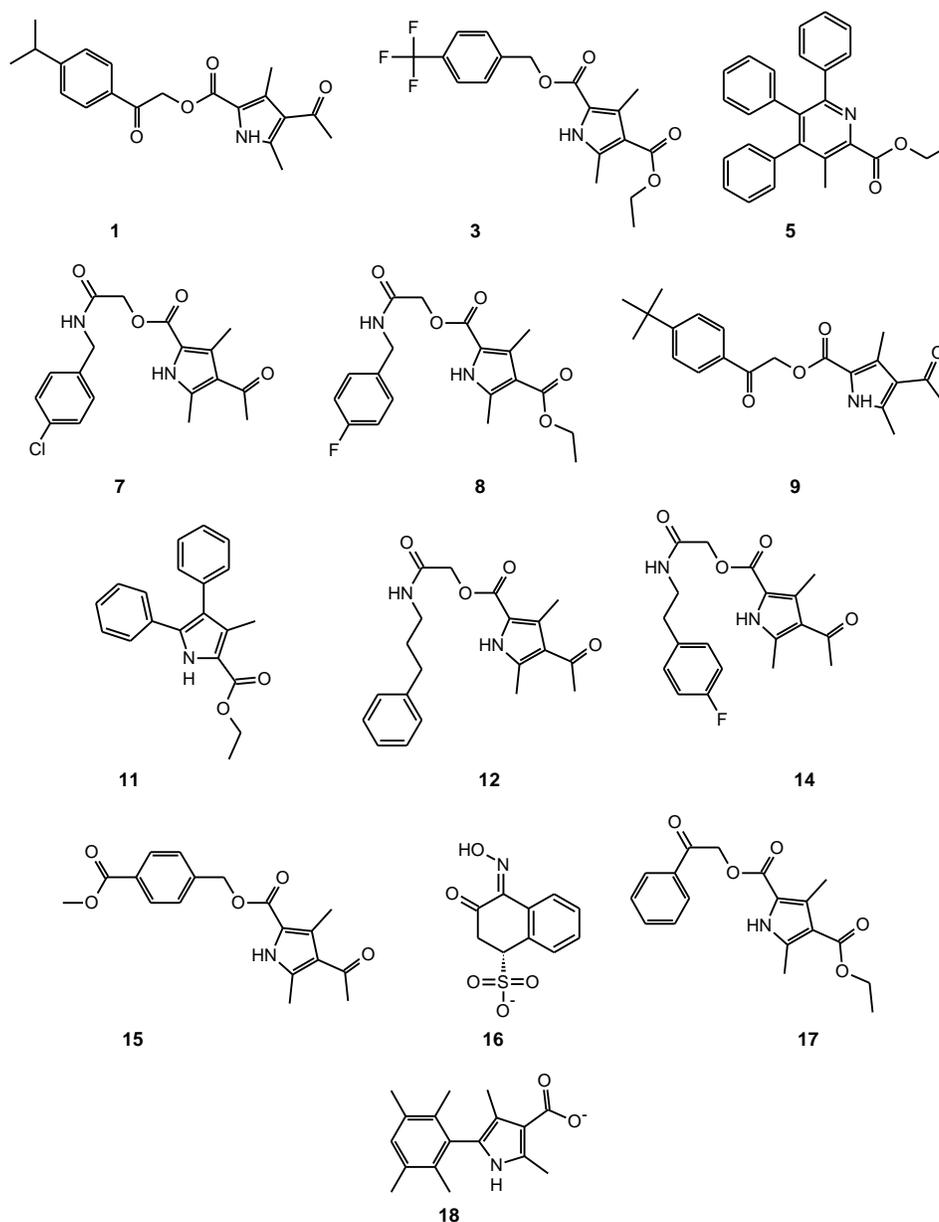


Fig. 3.14. Estructuras químicas de los mejores compuestos obtenidos por barrido virtual de la librería para Lm6-PGDH.

Las propiedades ADME más representativas de los *hits* se presentan para ser compararse con las que se esperan para un compuesto tipo fármaco, de acuerdo a las reglas de Lipinski¹⁶² (Tabla 3.7). En este caso se considera el LogP,¹⁶³ número de grupos dadores y aceptores de puentes de H, carga neta,

área total de átomos polares,¹⁶⁴ tPSA, masa molecular y número de enlaces rotables.

Los *hits* más afines y selectivos (1, 3 y 5) cumplen las reglas de Lipinski. Los compuestos (1) y (3) poseen un número de donadores y aceptores de puentes de H menor o igual a 5, masa molecular entre 340 y 370 g/mol, menor a 500 g/mol, junto a altos coeficientes de partición que indican una mayor probabilidad de permeabilidad a través de la pared intestinal (lipofilidad). El compuesto (5) tiene un coeficiente de partición calculado octanol-agua de 7. Los tres mejores compuestos obtenidos a partir del barrido virtual tienen área total de átomos polares 170 \AA^2, menos de 10 enlaces rotables y no presentan fragmentos reactivos y/o inestables, de acuerdo a las otras propiedades usadas comúnmente como criterio para compuestos tipo fármaco.⁵⁴

Tabla 3.7. Propiedades ADME para los compuestos con mayor afinidad por Lm6-PGDH.

Compuesto	pH	xlogP	H-BD	H-BA	Carga	tPSA(Å ²)	MM (g/mol)	Enlaces rotables
1	7	4,01	1	5	0	76,00	341,407	7
3	7	4,12	1	5	0	68,00	369,339	8
5	7	7,10	0	3	0	39,00	393,486	6
7	7	2,75	2	4	0	88,26	362,81	7
8	7	2,76	2	5	0	97,49	376,38	9
9	7	4,20	1	5	0	76,00	355,434	7
11	7	5,07	1	3	0	42,00	305,377	5
12	7	2,86	2	4	0	88,26	356,42	9
14	7	2,61	2	4	0	88,26	360,38	8
15	7	3,11	1	6	0	85,00	329,352	7
16	7	-2,18	1	6	-1	107,00	254,243	1
	8-9,5	-2,18	0	6	-2	110,00	253,235	1
17	7	3,16	1	5	0	85,46	329,35	8
18	7	3,92	1	3	-1	56,00	242,298	2

Los compuestos (1), (3) y (5) para Lm6-PGDH se consideran buenas estructuras para *hits* ya que además de presentar las EI más bajas para sus complejos y buenas propiedades ADME, pueden ofrecer un punto de partida en el diseño racional de fármacos contra la leishmaniasis debido a la presencia de núcleos como pirrol, benceno y carbonilo en su estructura y a las posibilidades sintéticas que ellos ofrecen para obtener derivados.

En base a todo lo anterior, las estructuras de los complejos de Lm6-PGDH con los compuestos (1), (3) y (5) fueron optimizadas con etapas de minimización de energía y DM, para verificar la estabilidad de sus complejos y estudiar las interacciones de cada uno en el sitio activo de la enzima.

3.3.5 Estructura de los complejos de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH con los *hits* obtenidos del barrido virtual.

La DM se utilizó como herramienta computacional para optimizar los complejos proteína/ligando obtenidos para los mejores compuestos del barrido virtual. Esta etapa de simulación posterior al *docking* permitió validar y refinar las soluciones del mismo. Se asume que una mala conformación o pose generará una trayectoria de DM inestable, durante la cual el ligando pudiera incluso abandonar la cavidad del sitio activo. En caso contrario, una pose representativa de la estructura mostrará una trayectoria estable, con bajo RMSD en el tiempo respecto a la conformación inicial, y también permitirá el análisis de las interacciones específicas con la proteína receptor. Más aún, la simulación de DM puede proporcionar una visión dinámica del re-arreglo en las conformaciones de las cadenas laterales que se adaptan a la pose del ligando, y a medida que transcurre el tiempo se evidencian las interacciones entre proteína y ligando dadas inicialmente por el *docking* o aparecerán nuevas interacciones con el medio circundante, ya que una DM en solvente explícito puede además sugerir el rol de moléculas de agua dentro del sitio activo que puedan ser importantes para predecir correctamente la forma en que el ligando se une a una proteína.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio comparativo entre complejos con ligandos para estas enzimas, principalmente porque la enzima de *L. (L.) mexicana* es inestable y no se ha cristalizado. La enzima humana sí se encuentra depositada en el PDB pero solamente co-cristalizada con el cofactor. Sin embargo, en base al modelo por homología reportado para Lm6-PGDH ya se han señalado diferencias estructurales entre las cavidades de la enzima del parásito y la humana,⁴¹ en particular en algunos residuos de unión al cofactor. Los modelos obtenidos por *docking*/DM para los diferentes complejos de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH en esta investigación permitieron profundizar en la naturaleza de las diferencias.

Los resultados obtenidos en el barrido virtual de la librería con las estructuras de las enzimas 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *H. sapiens*, muestran que hay compuestos con mayor afinidad a la enzima del parásito que a la humana, por tanto, es de esperar que dichos compuestos interactúen de forma diferente en cada una de las cavidades del sitio activo. Dado que en estos ensayos se busca la mejor orientación del ligando en base al reconocimiento molecular, los complejos con un valor de EI más bajo corresponde a aquellos donde existan mayores interacciones estabilizantes entre los residuos en la cavidad y los grupos del ligando que sea examinado.

En la estructura de los complejos de Hs6-PGDH y Lm6-PGDH se evaluaron las interacciones entre la molécula del ligando y los residuos del sitio activo. En general, los mejores compuestos resultantes del barrido virtual (1) (Figura 3.15), (3) (Figura 3.16) y (5) (Figura 3.17) adoptan diferentes conformaciones en la cavidad de Lm6-PGDH respecto a la de Hs6-PGDH. En todos los compuestos la inserción del tallo en la cavidad de la enzima humana tiene un efecto en el posicionamiento del ligando.

El compuesto (1) se orienta en Lm6-PGDH de forma tal que la carga positiva del NADP⁺ muestra interacción de tipo pi-cación con el grupo fenil del

ligando mientras que su grupo éster interactúa vía puente de H con los AA del llamado bolsillo positivo de la cavidad Y194, Q453, H454 y H463, estos últimos tres residuos pertenecientes a la sub-unidad B. La parte apolar de la molécula del ligando muestra interacciones de van der Waals con I374 y de tipo pi-alquil con la densidad electrónica del anillo de imidazol de H189. A su vez en Hs6-PGDH los puentes de H ocurren con los residuos N188, K261 y T263 con el O y carbonilo del grupo éster y las interacciones de tipo pi-pi con el anillo aromático de (1) y la densidad electrónica pi de las cadenas laterales de F450 y H453, y de tipo pi-alquil con M14.

En el caso del compuesto (3) con Lm6-PGDH predominan las interacciones polares enzima-ligando del tipo puente de H. El grupo trifluorometano se une al NADP^+ , y el O y grupo carbonilo del éster interacciona con Q453, R454 H460 y Y194. Con la enzima humana este mismo ligando forma puentes de H entre el trifluorometano y N108 y carbonilo de A77, mientras que el carbonilo del grupo éster se une a H453. También se encuentran interacciones del tipo pi alquil entre el grupo iso-propilo de (3) y M14.

En la enzima del parásito, el compuesto (5) también se une vía puente de H a K263 y Y194 mediante su grupo éster. Existen interacciones de tipo pi-sigma con I374, de tipo pi-azufre con M234 y pi catión con NADP^+ , H460 y R290, donde se involucra la región de densidad electrónica pi de los sustituyentes aromáticos. Mientras que en la enzima humana predominan las interacciones van der Waals del tipo pi-pi con NADP^+ y F464 y pi-catión con K38.

En todos los complejos de la enzima del parásito destaca la presencia de interacciones específicas del ligando con el grupo éster a través del O y el carbonilo con los AA Y194, H460 y R454 y también con la densidad electrónica pi del grupo pirrol. Es posible que estos fragmentos en la molécula del ligando puedan servir para imitar al grupo fosfato del sustrato y con miras al diseño racional de fármacos dichas interacciones pudieran ser explotadas para promover

otras interacciones que busquen mejorar la afinidad, y además para estudiar la naturaleza de su especificidad.

Del análisis de los complejos las interacciones observadas entre Lm6-PGDH y los *hits* resaltan aquellas con los residuos que conforman el llamado bolsillo positivo de la cavidad, probablemente porque para que la reacción ocurra la unión del grupo fosfato es muy importante desde el inicio de la misma en el posicionamiento correcto del 6PG, así como también las interacciones con residuos que pertenecen a la otra sub-unidad (H460 y R454). En las estructuras obtenidas de los complejos enzima/ligando los resultados subrayan la importancia del análisis realizado para la conformación de la cavidad a partir de residuos pertenecientes a ambas sub-unidades en el dímero de la 6-PGDH. Es esencial que se constituya de forma apropiada la cavidad del sitio activo en relación a la interfase que proporciona la otra sub-unidad, no solamente porque sus residuos forman parte de ella sino también por el tipo de interacciones que son posibles y que pudieran ser utilizadas para diseñar inhibidores tomando como punto de partida los *hits* encontrados en esta investigación.

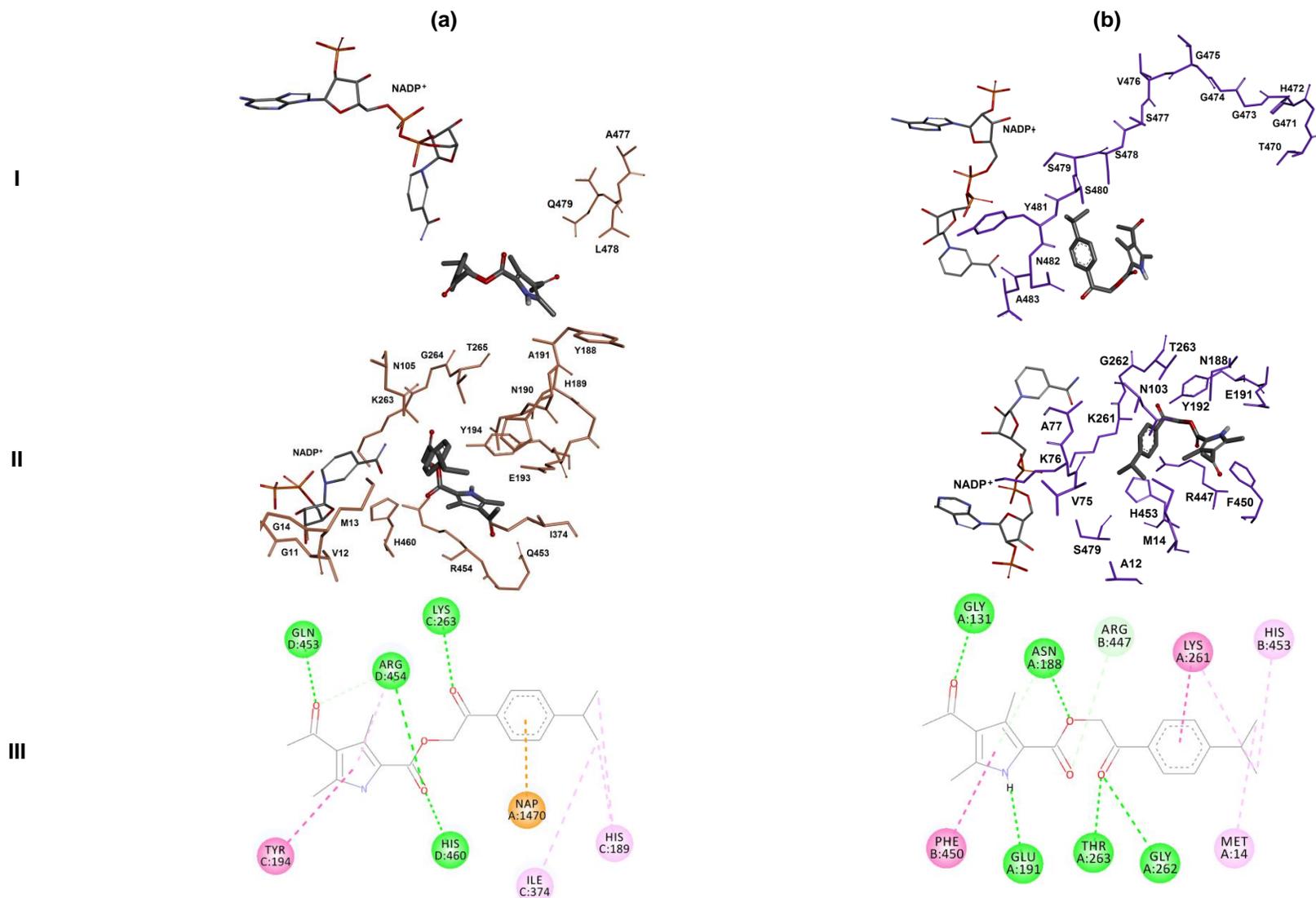


Fig. 3.15. Modos de unión del compuesto (1) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH (a) y Hs6-PGDH (b). (I) Ubicación respecto a NADP⁺ y residuos del tallo (II) En la cavidad del sitio activo (III) Mapa en 2D de los residuos con interacciones en el sitio activo.

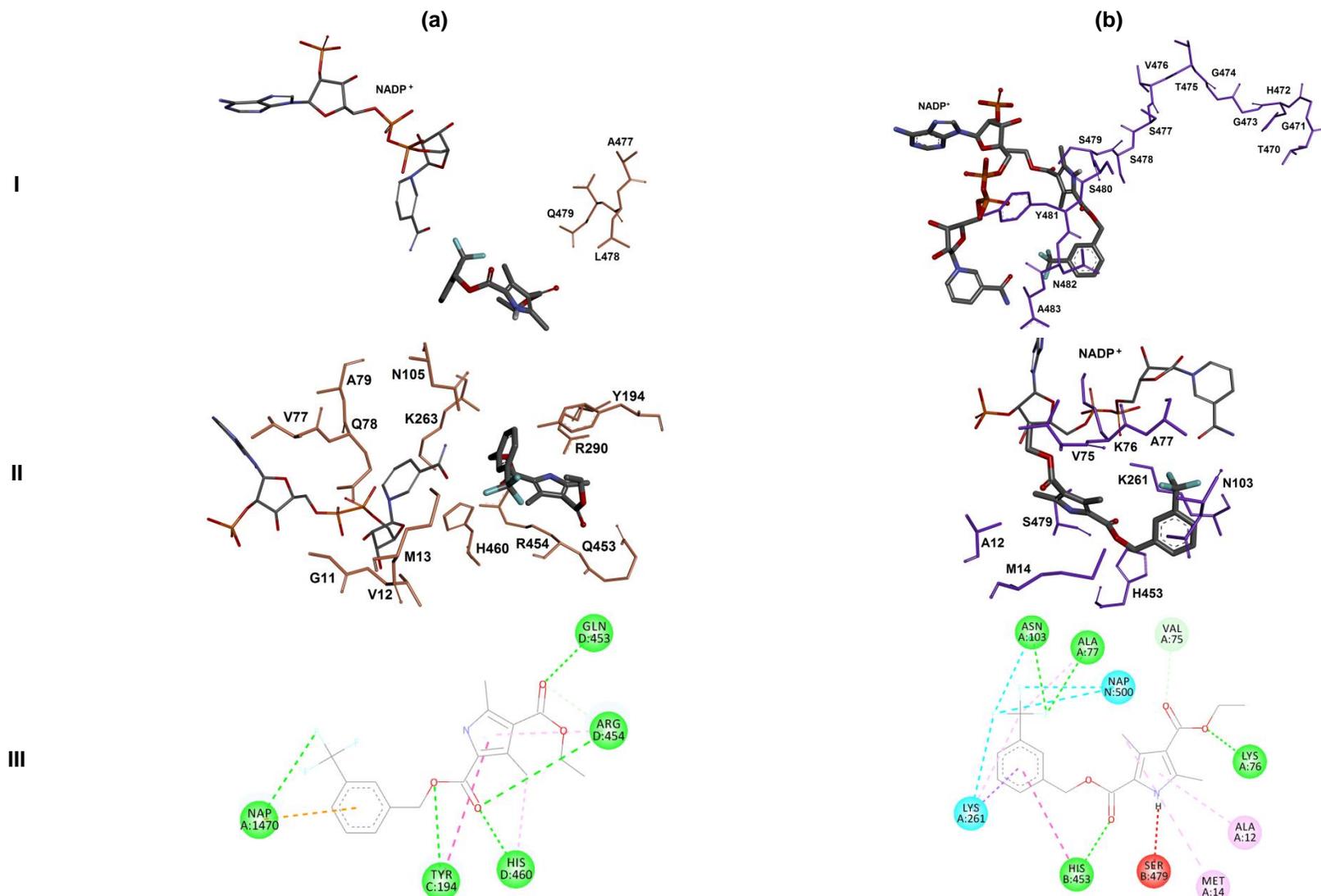


Fig. 3.16. Modos de unión del compuesto (3) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH (a) y Hs6-PGDH (b). (I) Ubicación respecto a NADP+ y residuos del tallo (II) En la cavidad del sitio activo (III) Mapa en 2D de los residuos con interacciones en el sitio activo.

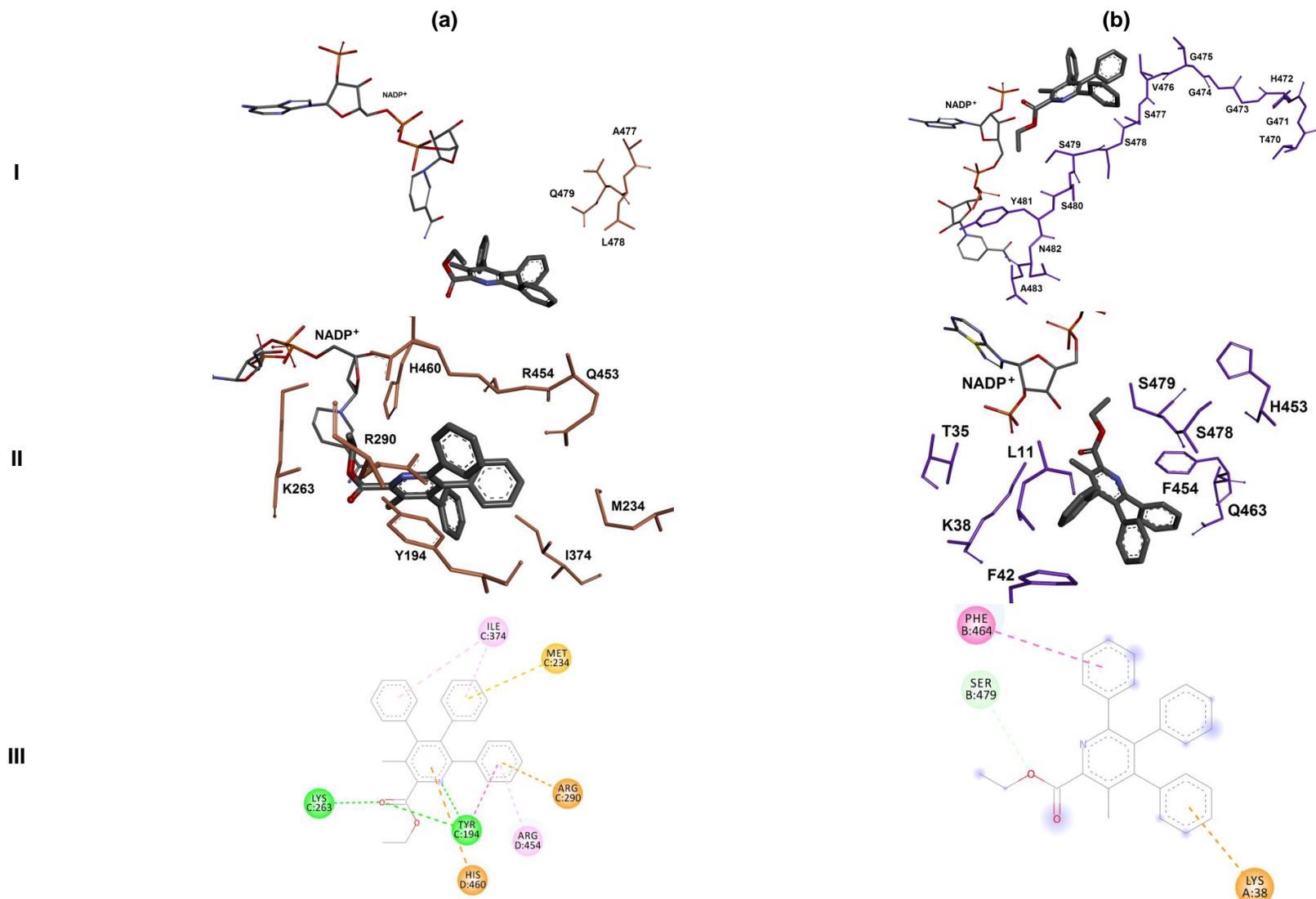


Fig. 3.17. Modos de unión del compuesto (5) obtenido por barrido virtual en Lm6-PGDH (a) y Hs6-PGDH (b). (I) Ubicación respecto a NADP+ y residuos del tallo (II) En la cavidad del sitio activo (III) Mapa en 2D de los residuos con interacciones en el sitio activo.

3.3.6 Discusión.

El barrido virtual de una librería química de 780 compuestos construida a partir de inhibidores de la enzima Tb6-PGDH, con Lm6-PGDH y Hs6-PGDH como receptores arrojó trece compuestos con selectividad a la enzima del parásito, de entre los veinte compuestos con menor EI.

Las estructuras químicas de los *hits* comprenden un núcleo de pirrol con cadenas alquílicas y arílicas sustituidos con grupos polares como el éster, trifluorometano, carbonilo y anillos ricos en densidad electrónica pi como el pirrol y el fenilo. Los mejores tres compuestos (1, 3 y 5) presentan buenas propiedades ADME además de formas de unión características con la enzima del parásito en comparación con su contraparte humana, donde los residuos Y194, K263, T265, R290 y R454 (B) contribuyen a la unión del sustrato a la cavidad, tal y como ha sido previamente reportado;³⁵ dichas uniones no sólo aseguran la orientación apropiada del 6PG para la catálisis, sino que ayudan a inducir el cambio conformacional que precede la reacción para preparar el sitio activo, del que también forma parte la cavidad donde se encuentra el cofactor.

En las conformaciones obtenidas para los complejos enzima/ligando, el cofactor NADP⁺ tiene una conformación diferente cuando el receptor es la enzima del parásito en comparación a la que adopta cuando el receptor es la enzima humana. Hecho que resalta al contrastar por primera vez las estructuras de complejos de ambas enzimas con sus respectivos ligandos y que proporciona nuevos argumentos para la obtención de fármacos selectivos a la enzima Lm6-PGDH, en base a las diferencias estructurales encontradas entre ambas. Aunque los residuos clave se conservan, el tallo en la cavidad de Hs6-PGDH es más largo y rico en residuos S, este factor influye en la conformación que adoptará el sustrato y cualquier otro ligando en la cavidad del sitio activo, respecto a la conformación que pueda adoptar en la cavidad de la enzima del parásito. En todos los complejos optimizados de la enzima *L. (L.) mexicana* y los *hits* (1, 3 y 5) como ligandos, están presentes las interacciones de tipo puente de H entre R454(B) y el

carbonilo del ligando, y la interacción de tipo pi-pi entre anillos aromáticos del ligando y los de Y194 y H460. En la enzima humana los residuos que exhiben las mayor número de interacciones provienen de AA con cadenas laterales neutras N105, G129, G130, G131, N188, T263 y la serie de residuos del tallo S477, S478 y S479, al contrario de lo que ocurre en la enzima del parásito donde predominan las interacciones con los AA cargados que conforman el bolsillo positivo de la cavidad K263, R290, H460 (B), R454 (B).

La información estructural obtenida con nuestros ensayos de posicionamiento molecular respecto a las poses de los ligandos en la cavidad de la enzima y las interacciones importantes presentes en todos los complejos ensayados pueden servir de base para una nueva etapa en el diseño racional de fármacos, una vez los compuestos hayan sido probados *in vitro* para determinar su actividad.

4 DISCUSIÓN GENERAL

La necesidad de renovar la farmacopea disponible para tratar las enfermedades tropicales o desatendidas tales como la leishmaniasis, la enfermedad del sueño, el mal de Chagas, entre otras, se ha incrementado debido a la aparición de resistencias a los fármacos empleados. En el caso particular de la leishmaniasis los antimoniales pentavalentes conforman la primera línea de quimioterapia, son tóxicos y recientemente se ha demostrado un incremento de resistencia a los mismos, por parte del parásito. El alto costo asociado al estudio y desarrollo de un nuevo medicamento para el tratamiento de estas enfermedades no representa un problema prioritario para las compañías farmacéuticas sin que por ello sea menos importante su abordaje. En este sentido es muy importante la aplicación de las metodologías *in silico* para el diseño racional de fármacos y la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

En Kinetoplastidas, la existencia del glicosoma donde se encuentran compartamentalizadas varias enzimas de la ruta glicolítica y de la PPP, que participan del catabolismo de la glucosa en estos parásitos, establece grandes diferencias con el hospedador mamífero. La 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* es funcional en la PPP y se encarga de producir NADPH, que es el poder reductor que protege en condiciones de estrés oxidativo y la hace esencial para la sobrevivencia del parásito. Algunos detalles estructurales relacionados con AA clave en el sitio activo de la 6-PGDH al igual que las diferencias encontradas al comparar la enzima en Kinetoplastidas con su contraparte humana han sido suficientes argumentos para considerar dicha enzima como un blanco terapéutico selectivo.

Además, en este organismo su marcada inestabilidad cinética ha sido una característica notable a fines de su caracterización, sin embargo, a falta de su estructura cristalina es poco lo que se conoce de ella. El modelo obtenido por homología para Lm6-PGDH permitió realizar las comparaciones estructurales con la enzima cristalizada de Tb6-PGH y con el modelo de Tc6-PGDH, enzima que también inestable, y de la que tampoco se dispone de una estructura cristalina. De

los cinco puentes salinos entre sub-unidades presentes en la enzima estable de Tb6-PGDH, Lm6-PGDH sólo tiene cuatro presentes.⁴¹ En este sentido, ha sido relacionada con la enzima de *T. cruzi* a la que se le restituyeron sus dos puentes salinos faltantes por mutagénesis sitio-dirigida recuperando la estabilidad.

En este trabajo se han podido caracterizar los pares iónicos presentes en Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH en base a la distancia entre los residuos que los forman durante una trayectoria de DM. Los resultados muestran que en Tb6-PGDH las interacciones son más estables en el tiempo y ocurren a la distancia óptima de puente salino, mientras que en Lm6-PGDH y Tc6-PGDH los pares iónicos faltantes inciden de forma determinante en la unión de ambas sub-unidades para conformar el dímero funcional; en estas enzimas las interacciones entre las sub-unidades ocurren a mayor distancia y se pueden considerar más lábiles por tener una geometría de interacción menos favorable, lo que afecta la conformación del dímero en el sitio activo, que posee una interfase formada por residuos de ambas sub-unidades. Esta racionalización permitió explicar la inestabilidad cinética en las enzimas en base a los pares iónicos ausentes.

En este sentido, se ha evidenciado que a nivel estructural en la 6-PGDH no es el número de puentes salinos entre sub-unidades los que determinan la estabilidad de la enzima porque aumente el número de interacciones que ayuden a mantener el dímero, sino que su papel en la catálisis está determinado por su ubicación en la estructura 3D. En el análisis de la estructura de la 6-PGDH en las especies estudiadas, pudo notarse que el sitio activo es un bolsillo conformado por residuos de ambas sub-unidades en la interfase dimérica, con residuos del tallo de una sub-unidad y del dominio de la coenzima de la otra. La unión que representan los puentes salinos 3 y 4 son de extrema importancia porque conforman el asiento del sitio activo, contribuyendo a mantener unidas ambas sub-unidades en la interfase dimérica donde la cavidad precisa de estar bien constituida para que tenga lugar el adecuado posicionamiento de dos moléculas, la del sustrato y el cofactor. Por otra parte, el tallo de una sub-unidad funciona como cubierta que

cierra la cavidad del sitio activo y el puente salino 2 actúa como cierre de esa cavidad, razón por la que su ausencia en Lm6-PGDH, tiene incidencia en la estabilidad de la misma, y al estar ausente facilitaría el que ambas sub-unidades se desenheben y la consecuente apertura de la cavidad del sitio activo.

El barrido virtual en base a Lm6-PGDH y Hs6-PGDH permitió obtener trece compuestos, entre los primeros 20, con más afinidad por la enzima de *L. (L.) mexicana* que por la humana. Esta selectividad encontrada entre los 780 compuestos que conformaban la librería ensayada constituye un buen punto de partida en el diseño racional de fármacos selectivos para ser ensayados *in vitro* contra el parásito y que pueden servir en el proceso subsecuente de optimización de sus estructuras en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan servir de líder de medicamentos. A fines de la renovación de las estructuras de los medicamentos empleados en la quimioterapia, los compuestos con núcleos pirrólicos, grupos fenilo y éster, también mostraron buena afinidad para la enzima Lm6-PGDH en el barrido virtual como ha sido reportado para Tb6-PGDH.⁶³

El análisis estructural de la enzima 6-PGDH es esencial para ganar en la comprensión de su actividad enzimática y en las características particulares de la misma en cada una de las especies. Los resultados obtenidos en referencia al comportamiento de los pares iónicos estudiados confirman la importancia que tienen en la conformación del sitio activo de la enzima. Las interacciones electrostáticas entre sub-unidades son particulares de la 6-PGDH en Kinetoplastidas y contrasta con la enzima humana, la de oveja y la de bacteria *L. lactis*, donde las interacciones entre los tallos de ambas sub-unidades no son de naturaleza electrostática sino más bien hidrofóbicas. La enzima humana tiene un tallo rico en residuos neutros, del tipo A, S, que tienen influencia en la constitución de su cavidad. Nuestros resultados confirman el potencial que tiene la 6-PGDH como blanco terapéutico, ya que estas interacciones de naturaleza electrostática son características de Tripanosomatideos, y entre ellos y *L. (L.) mexicana* no son iguales, y los residuos que forman o no puentes salinos inciden en la actividad

enzimática, a pesar de que la mayoría de los residuos del sitio activo se conserva. Adicionalmente, en la dinámica de la 6-PGDH, las diferentes conformaciones que adopta el cofactor cuando se comparan las estructuras de los complejos modelados con la enzima de *L. (L.) mexicana* y la de *H. sapiens*, que podrían estar influenciadas principalmente por diferencias en las regiones C-terminal del tallo, así como también en la huella dactilar de unión al cofactor (${}^9\text{GxGxxG}^{14}$) y en menor medida a un residuo no conservado entre ambas (K76). Todos estos factores estructurales pueden seguir explotándose en el diseño racional de fármacos, orientado de forma selectiva a mejorar la interacción de los ligandos con la enzima del parásito, en comparación con su contraparte humana. Con particular optimización de los residuos con interacciones del tipo puente de H con grupos específicos presentes en los *hits* (Y194, R454, H460).

Los resultados obtenidos aportan validez a la escogencia de la enzima 6-PGDH como blanco selectivo por los hallazgos resultantes del análisis de la estructura de la cavidad entre ambas especies y también gracias a que por primera vez un barrido virtual permite obtener compuestos con mayor afinidad por la enzima del parásito en comparación con la humana. Los *hits* obtenidos serán ensayados para estudiar su actividad *in vitro*.

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En base a los resultados de esta investigación se puede concluir:

- Las trayectorias de DM resultantes para las enzimas simuladas permitieron obtener una descripción del comportamiento en el tiempo de los pares iónicos inter sub-unidades.
- En Tb6-PGDH, Lm6-PGDH y Tc6-PGDH la naturaleza de los pares iónicos no es la misma, a pesar de estar constituidos por los mismos residuos, no todos son puentes salinos.
- La variabilidad estructural encontrada en las trayectorias entre enzimas nativas y con las correspondientes mutaciones *in silico* permitió inferir acerca del papel de cada uno en el mantenimiento del dímero: el par 2 actúa como cierre al sitio activo y las uniones que proporcionan los pares 3 y 4 ayudan a sostener la cavidad que conforma el sitio activo.
- Es la ubicación de pares iónicos en la 6-PGDH de Kinetoplastidas lo que afecta su estabilidad cinética y no su número.
- Se validaron las diferencias estructurales a nivel del sitio activo entre las enzimas de Lm6-PGDH y Hs6-PGDH que han sugerido a la enzima como blanco selectivo.
- Los mejores compuestos (1, 3 y 5) con mayor afinidad por Lm6-PGDH y propiedades ADME adecuadas para un fármaco fueron encontrados por barrido virtual de una librería química.
- Las interacciones entre los compuestos con mayor afinidad por la 6-PGDH del parásito y los residuos Y194, R454(B) y H460(B) del sitio activo son importantes en la contribución a la estabilidad del complejo y pueden seguir explotándose

en la búsqueda de inhibidores que puedan servir de líderes para un medicamento.

Como perspectivas futuras del trabajo se plantean los siguientes aspectos:

- Ensayar *in vitro* los compuestos con mejor afinidad (1, 3 y 5), entre otros, selectivos a la enzima de *L. (L.) mexicana*.
- Evaluar las contribuciones de cada uno de los pares iónicos inter sub-unidades en la 6-PGDH a su estabilidad, a partir de los modelos con aproximaciones a la energía libre.
- Evaluar el comportamiento de la cavidad del sitio activo de la 6-PGDH en el tiempo, en presencia de sus ligandos naturales.
- Evaluar el comportamiento de los pares iónicos para complejos de las enzimas 6-PGDH con el sustrato y cofactor, para profundizar la influencia de los mismos en el sitio activo, y de ser posible en el mecanismo de reacción.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud Leishmaniasis (página web en línea). Disponible: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/> (consulta: 2012, Noviembre 1).
2. Convit, J.; Ulrich, M.; Fernández, C.; Tapia, E; Cáceres, M.; Rondón, A. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg. Med.* **1993**; 87: 444-448
3. Murray H. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2185-2197.
4. Oletta J., Carvajal A., Peña S. Leishmaniasis, consideraciones generales y epidemiológicas. Boletín de la red de sociedades científicas médicas Venezolanas. Alerta N°195. 2011.
5. Revista Comunidad Biomédica (página web en línea). Disponible: <http://comunidadbiomedica.blogspot.com/2010/04/3000-nuevos-casos-de-leishmaniasis-se.html> (consulta: 2012, Noviembre 17).
6. World Health Organization Leishmaniasis Fact Sheet (página web en línea) Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (consulta: 2015, noviembre 15)
7. Sundar S., Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2002**. 15, 593-598
8. Ouellette M., Drummelsmith J., Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug. Resist. Updat.* **2004**. 7, 257-266.
9. Coombs G., Croft S. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology.* **2003**, 19, 502-508.
10. Handman E., Murray H., Davis A. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *TRENDS in Parasitology.* **2004**, 20, 73-76.
11. Barret M.P., Gilbert I. Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 471-482.

12. Berman, J.D. et al. (1998) Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull. World Health Organ.* 76, 25–32.
13. Thakur, C.P. et al. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1999, 93, 319–323.
14. Sundar, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347, 1739–1746.
15. Arevalo, I. et al. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin. Infect Dis.* 2001, 33, 1847–1851.
16. Sundar S., Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* 2001, 6, 849-854.
17. Croft, S.L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* 2001, 6, 899–905.
18. Mullen B., Baillie A., Carter K. Visceral Leishmaniasis in the BALB/c Mouse: A Comparison of the Efficacy of a Nonionic Surfactant Formulation of Sodium Stibogluconate with Those of Three Proprietary Formulations of Amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 2722-2725.
19. Thakur, C.P. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with injectable paromomycin (aminosidine). An open-label randomized phase-II clinical study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000, 94, 432–433.
20. Barrett, M.P. et al. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 82–88.
21. Gualdrón-López M., Michels P., Quiñones W., Cáceres A., Avilán L., Concepción J-L. Function of Glycosomes in the Metabolism of Trypanosomatid Parasites and the Promise of Glycosomal Proteins as Drug Targets. En *Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery*. Jäger T., Koch O., Flohé L. (Edit.). Wiley-VCH Verlag.

22. Verlinde C., Hannaert V., Blonski C., Willson M., Périé J., Fothergill-Gilmore L., Opperdoes F., Gelb M., Hol W., Michels P. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist. Updat.* 2001, 4, 50-65.
23. Barrett M. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, **1997**. 13, 11-16.
24. Cronin C., Nolan D., Voorheis P. The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Letters*. **1989**, 244, 26-30.
25. Opperdoes F., Michels P. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int. J. Parasitology*. 2001, 31, 482-490.
26. Cazzulo J., Beluardi P., Stern A., Maugeri D., Igoillo-Esteve M. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for chemotherapy of Chagas disease. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2007, 79, 649-663.
27. Rosemeyer M.A. The biochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. *Cell Biochem. Funct.* **1987**, 5, 79-95.
28. Deyanira C. Aislamiento y caracterización del gen de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH: E.C.1.1.1.44) (gnd) de *Leishmania* sp. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas, 2008.
29. Adams M., Gover S., Leaback R., Phillips C., Somers D. The structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2,5 Å resolution. *Acta Cryst.* **1991**. B47, 817-820.
30. Phillips C., Dohnalek J., Gover S., Barrett M., Adams M.J. A 2.8 Å resolution structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: comparison with the sheep enzyme accounts for differences in activity with coenzyme and substrate analogues. *J. Mol. Biol.* 1998, 282, 667-681.
31. Sundaramoorthy R., Lulek J., Barret M. P., Bidet O., Ruda G. F., Gilbert I. H., Hunter W. N. Crystal structures of a bacterial 6-phosphogluconate dehydrogenase

reveal aspects of specificity, mechanism and mode of inhibition by analogues of high-energy reaction intermediates. *FEBS J.* 2007, 274, 275-286.

32. Chen Y-Y., Ko T-P., Chen W-H., Lo L-P., Lin C-H., Wang A. Conformational changes associated with cofactor/substrate binding of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: implications for enzyme mechanism. *J. Struct. Biol.* **2009**, ASAP.

33. Berdis A., Cook P. Chemical mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Candida utilis* from pH studies. *Biochemistry.* **1993**, 32, 2041-2046.

34. Zhou C-Z., Liu W., Wang Y., He W. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd I. *BMC Structural Biology.* 2007, 7, 38-46.

35. Barret M. P., Arkison S., Adams, M., Le Page R., Wells J., Hanau S. y Tetaud E. 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*: a role for arginine residues in binding substrate and coenzyme. *Biochem. J.* **1999**, 338, 55-60.

36. [Joint Center for Structural Genomics](#). CRYSTAL STRUCTURE OF A PUTATIVE ROSSMANN-LIKE DEHYDROGENASE (CGL2689) FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM AT 2.07 Å RESOLUTION.

37. Zhang Z, Chamala S, Evans B, Foti R, Gizzi A, Hillerich B, Kar A, Lafleur J, Seidel R, Villigas G, Zencheck W, Almo SC, Swaminathan S. The crystal structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Geobacter metallireducens*. Por publicar.

38. Ng, S.S., Von Delft, F., Pilka, E.S., Kavanagh, K.L., McDonough, M.A., Savitsky, P., Arrowsmith, C.H., Weigelt, J., Edwards, A., Sundstrom, M., Schofield, C.J., Oppermann, U. Structure of Human Phosphogluconate Dehydrogenase in Complex with NADPH at 2.53 Å. **2009**. Por publicar.

39. Adams M., Ellis G., Gover S. Naylor C., Phillips. Crystallographic study of coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure.* **1994**, 2, 651-668.

40. Hanau S., Ripa M., Bertelli M., Dallochio F., Barrett M. P. 6-Phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Kinetics analysis and inhibition by trypanocidal drugs. *Eur. J. Biochem.* 1996, 240, 592-599.
41. González D., Pérez J., Serrano ML., Esteve M., Cazzulo J., Barret M., Bubis J., Mendoza-León A. The 6-Phosphogluconate dehydrogenase of *Leishmania (Leishmania) Mexicana*: Gene characterization and protein structure prediction. *J. Molec. Microb. Biotech.* 2010, 19: 213-223.
42. Esteve M., Cazzulo. J. The 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: the absence of two inter-subunit salt bridges as a reason for enzyme instability. *Mol. & Biochem. Parasitology.* **2004.** 133, 197-207.
43. Darren J. Creek, Isabel M. Vincent, Michael P. Barrett, Pharmacological Metabolomics in Trypanosomes En Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery. Jäger T., Koch O., Flohé L. (Edit.). Wiley-VCH Verlag. 2013, 37.
44. Ferreira L., Dos Santos R., Oliva G., Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 2015, 20, 13384-13421.
45. Hans-Joachim B. Computational tools for structure-based ligand design. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 1996, 66, 196, 197–210.
46. Anderson A. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem. & Biol.* 2003, 10, 787-797.
47. Shoichet B., McGovern S., Wei B., Irwin J. Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2002, 6, 439–446.
48. Ghosh S., Nie A., An J., Huang Z. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2006, 10, 194-202.
49. Eddershaw P. J., Beresford A. P., Bayliss M. K. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug Discovery Today.* 2000, 5, 9, 409–414.
50. Ekins S., Rose J. In silico ADME/Tox: the state of the art. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2002, 20, 305–309.

51. Lipinski, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2000, 44, 235-249.
52. Congreve M.; Carr R.; Murray C.; Jhoti H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug. Discov. Today*, 2003, 8, 876-877.
53. Hughes, J.D.; Blagg, J.; Price, D.A.; Bailey, S.; Decrescenzo, G.A.; Devraj, R.V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y.M.; Gibbs, M.E.; Gilles, R.W.; et al. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 4872-4875.
54. Hann, M. M.; Oprea, T. I. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, 8, 255-263.
55. Wang J., Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy. *Drug Discovery World*. 2004. 73-86.
56. Wunberg T., Hendrix M., Hillisch A., Lobell M., Meier H., Schmeck C., Wild H., Hinzen B. Improving the hit-to-lead process: data-driven assessment of drug-like and lead-like screening hits. *Drug Discovery Today*. 2006, 11, 175-18.
57. Terstappena G. C., Reggiana A. In silico research in drug discovery. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2001, 22, 23-26.
58. World Health Organization Neglected Tropical Diseases (página web en línea) Disponible: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (consulta: Noviembre 24, 2015).
59. Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D., Savioli, L. Control of Neglected Tropical Diseases. *N. Engl. J. Med.* 2007, 357, 1018-1027.
60. Hanau S., Salmon L., Hardré R., Dallochio F., Cervellati C., Rinaldi E., Pasti C. Sugar derivatives as new 6-phosphogluconate dehydrogenase inhibitors selective for the parasite *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 1207-1214.

61. Dardonville C., Rinaldi E., Hanau S., Barret M., Brun R., Gilbert I. Synthesis and biological evaluation of substrate-based inhibitors of 6-phosphogluconate dehydrogenase as potential drugs against African Trypanosomiasis. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 3205-3214.
62. Dardonville C., Rinaldi E., Barret M., Brun R., Gilbert I., Hanau S. Selective inhibition of *Trypanosoma brucei* 6-Phosphogluconate dehydrogenase by high-energy intermediate and transition-state analogues. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3427-3437.
63. Ruda G., Campbell G., Alibu V., Barret M., Brenk R., Gilbert I. Virtual screening form novel inhibitors of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5056-5062.
64. McCammon A., Karplus M. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology.* 2002, 9, 646 – 652.
65. Kukol A. Methods in molecular biology: Molecular modeling of proteins. Humana Press. 2008. pp. 3-24.
66. Tajkhorshid E., Aksimentiev A., Balabin I., Gao M., Isralewitz B., Phillips J., Zhu F., Schulten K. Large Scale Simulation of Protein Mechanics and Function. *Advances in Protein Chemistry*, 2003, 195-247.
67. Nilges M., Hilbers C., Horstink L., Abseher R. Essential Spaces Defined by NMR Structure Ensembles and Molecular Dynamics Simulation Show Significant Overlap. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics.* 1998, 31, 370–382.
68. Shaw D., Dror R., Eastwood M., Piana S., Raval A. Refinement of protein structure homology models via long, all-atom molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2012, 80, 2071-2079.
69. Ginalski K. Comparative modeling for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology.* 2006, 16, 172–177.
70. Serrano M. Determinación de la estructura tridimensional de moléculas peptídicas a través de modelado molecular. Caracas, Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 2004.

-
71. Forrest L., Tang C., Honig B. On the Accuracy of Homology Modeling and Sequence Alignment Methods Applied to Membrane Proteins. *Biophys. J.* 2006, 91, 508–517.
72. Fiser A., Sánchez R., Melo F., Sali A. Comparative protein structure modeling en Computational Biochemistry and biophysics. Backer O, MacKerell A., Roux B., Watanabe M. (Editores). New York. Marcel Dekker, 2001.
73. Tramontano A. Homology Modeling with Low Sequence Identity. *Methods.* **1998**, 14. 293-300.
74. Sánchez R., Sali A. Advances in comparative protein-structure modelling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997, 7, 206-214.
75. D.C. The Art of Molecular Dynamics Simulation. Cambridge University Press. New York, 2004. Segunda edic.
76. Ponder J., Case D. Force Fields for Protein Simulations. *Advances in Protein Chemistry*, 2003, 66, 27-85.
77. Binder K., Horbach J., Kob W., Paul W., Varnik F. Molecular dynamics simulations. *Journal of Physics: Condensed Matter.* 2004, 16.
78. Metropolis N., Metropolis A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H., Teller E. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 1953, 21, 1087.
79. Laurendeau, Normand M. (2005). Statistical thermodynamics: fundamentals and applications. Cambridge University Press. ISBN 0-521-84635-8., Appendix N, p. 434.
80. Paterlini M. G., Ferguson D. M. Constant temperature simulations using the Langevin equation with velocity Verlet integration. *Chemical Physics.* 1998, 236, 243–252
81. Andersen H. Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *J. Chem. Phys.* 1980, 72, 2384-2394.

-
82. Nosé S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics*. 1984, 52, 255-268.
83. Smith L., Daura X., van Gunsteren W. Assessing *equilibration* and convergence in biomolecular simulations. *PROTEINS: Structure, function and genetics*. 2002. 48, 487-496.
84. Walton E., VanVliet J. Equilibration of experimentally determined protein structures for molecular dynamics simulation. *Phys. Rev.* 2006, E74, 061901, DOI: 10.1103/PhysRevE.74.061901.
85. Rarey M., Lengauer T. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opinion in Struc. Biol.* 1996, 6, 402-406.
86. Sousa S., Fernandes P., Ramos M. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins*. 2006, 65, 15-26.
87. Kuntz I., Blaney J., Oatley S., Langridge R., Ferrin R. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 1982, 161, 269-288.
88. Wei B., Weaver L., Ferrari A., Matthews B., Shoichet B. Testing a Flexible-receptor Docking Algorithm in a Model Binding Site. *J. Mol. Biol.* 2004, 337, 1161-1182.
89. B-Rao C., Subramanian J., Sharma S. Managing protein flexibility in docking and its applications. *Drug Discovery Today*, 2009, 14, 394-400.
90. Claussen H, Buning C, Rarey M, Lengauer T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J Mol Biol.* 2001; 308: 377–95.
91. Kirkpatrick S., Gellat J., Vecchi M. Optimization by simulated annealing. *Science*. 1983, 220, 671-680.
92. Jones G., Willett P., Glen R., Leach A., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 1997, 267, 727-748.

93. Morris G., Goodsell D., Halliday R., Huey R. Hart W., Belew R., Olson A. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1639-1662.
94. Morris G., Goodsell D., Huey R., Olson A. Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of Autodock 2.4. *J. Comput. Aided Mol Des.* 1996, 10, 293-304.
95. Tame J. Scoring functions: A view from the bench. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 1999, 13, 99-108.
96. Huey R., Morris G., Olson A., Goodsell D. A semi-empirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* 2007, 28, 1145-1152.
97. Jain A. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 1996, 10, 427-440.
98. Marco E., Gago F. Overcoming the inadequacies or limitations of experimental structures as drug targets by using computational modeling tools and molecular dynamics simulations. *ChemMedChem.* 2007, 2, 1388-1401.
99. Marco De Vivo, Matteo Masetti, Giovanni Bottegoni, and Andrea Cavalli. The Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 2016. Por publicar. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01684.
100. Lorber D., Shoichet B. Flexible ligand docking using conformational ensembles. 1998, 7, 938-950.
101. Moitessier N., Englebienne P., Lee D., Lawandi J., Corbeil C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Brit. J. Pharm.* 2008, 153, S7-S26.
102. Charifson, P. S., Corkery, J. J., Murcko, M. A. Walters, W. P. Consensus scoring: a method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 5100–5109.
103. Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 62, 1239–1249.

104. Kubinyi. H. QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: methodology. *Drug Discover Today*. 1997, 2, 457-467.
105. Abagyana R., Totrovb M. High-throughput docking for lead generation. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001, 5, 375–382.
106. Shoichet B., Irwin J., Ferreira R., Kolb P. Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20, 429–436.
107. Ni H., Zeng S., Qin X., Sun X., Zhang S., Zhao X., Yu Z., Li L. Molecular Docking and Site-directed Mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* Chitinase to Improve Chitinolytic, Synergistic Lepidopteran-larvicidal and Nematicidal Activities. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11, 304–315.
108. Lasker K., Sali A., Wolfson H., J. Determining macromolecular assembly structures by molecular docking and fitting into an electron density map. *Proteins*. 2010, 78, 3205–3211.
109. Mathieu M., Modis Y., Zeelen J. P., Engel C. K., Abagyan R. A., Ahlberg A., Rasmussen B., Lamzin V. S., Kunau W. H, Wierenga R. K. The 1.8 Å crystal structure of the dimeric peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*: implications for substrate binding and reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 1997, 273, 714–728.
110. Charifson P. S., Corkery J. J. , Murcko M. A., Walters W. P. Consensus Scoring: A Method for Obtaining Improved Hit Rates from Docking Databases of Three-Dimensional Structures into Proteins. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, pp 5100–5109.
111. Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2002, 46, 409-443.
112. Muegge I, Oloff S. Advances in virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2006, 3, 405-411.
113. Shoichet B. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. 2004, 432, 862-865.

114. Schneider G., Böhm H-J. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug Discovery Today*. 2002, 7, 64–70.
115. Oprea T., Matter H. Integrating virtual screening in lead discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004, 349-358.
116. Lengauer T., Lemmen C, Rarey M, Zimmermann M. Novel technologies for virtual screening. *Drug Discovery Today*, 2004, 9, 27-34.
117. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 580-594.
118. McInnes C. Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007, 11, 494–502.
119. Cerqueira N., Gesto D., Oliveira E., Santos-Martins D., Brás N., Sousa S.F., Fernandes P.A., Ramos P.A. Receptor-based virtual screening protocol for drug Discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 582, 56-67.
120. Alvarez J. High-throughput docking as a source of novel drug leads. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004, 8, 365–370.
121. Greer J., Hajduk P. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007, 6, 211-219.
122. Lyne P. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug discovery today*. 2002, 7, 1047-1055.
123. Ghosh S., Nie A., An J., Huang Z. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, 10, 194–202.
124. Ripphausen P., Nisius B., Bajorath J. State-of-the-art in ligand-based virtual screening. *Drug Discovery Today*. 2011, 16, 372-376.
125. Selicka H. E., Beresfordb A. P., Tarbitb M. H. The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2002, 7, 109–116.

126. David J.M Spalding, Andrew J Harker, Martin K Bayliss. Combining high-throughput pharmacokinetic screens at the hits-to-leads stage of drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2000, 5, 70-76.
127. Kaplan W. Littlejohn J. Swiss-PDB Viewer (Deep View). *Brief Bioinform.* 2001, 2, 195-197.
128. Drug Design Laboratory. 2009. VEGAZZ. (página web en línea). Disponible en: http://nova.colombo58.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGA_ZZ. (consulta: 2009, Diciembre 1).
129. Phillips J., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid, Villa E., Chipot C., Skeel R., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005, 26, 1781-1802.
130. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.* 1996, 14, 33-38.
131. *Discovery Studio Visualizer, Release 4.5*, San Diego: Accelrys Software Inc., 2007.
132. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8* Schrödinger, LLC.
133. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comp. Chem.* 2010, 31, 455-46.
134. Moreland J.L, Gramada A., Buzko O. V., Zhang Q., Bourne P.E. The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics.* 2005, 6:21.
135. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research.* 2009, 37, D387-D392.
136. Laskowski R., MacArthur M., Moss D., Thornton J. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993, 26, 283-291.

137. Wiederstein M., Sippl M. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, W407-410.
138. Dundas J., Ouyang Z., Tseng J., Binkowski A., Turpaz Y. Liang J. CASTp: Computed Atlas of surface Topography of Proteins with Structural and Topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, W116-118.
139. Brylinski M., Skolnick. A threading-based method (FINDSITE) for ligand-binding site prediction and functional annotation. *PNAS.* 2007, 105, 129–134.
140. Benson D., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., Sayers E. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, D32-37.
141. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics.* 2007, 23, 2947-2948.
142. MacKerell A., Bashford D. et al. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys Chem. B.* 1998, 102, 3586-3616.
143. NAMD 2.9 User's Guide. 2012 (página web en línea). Disponible: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/> (consulta: 2012, Diciembre 9).
144. Gasteiger J., Marsili M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Letters.* 1978, 19, 3181-3184.
145. Balaeff A. SODIUM. Theoretical Biophysics Group. Beckman Institute for Advanced Science and Technology. University of Illinois at Urbana-Champaign.
146. Jorgensen W., Chandrasekhar J., Madura J. Impey R., Klein M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79, 926.
147. Abdunour Y. Toukmaji, John A. Board Jr. Ewald summation techniques in perspective: a survey. *Comp. Phys. Comm.* 1996, 95, 73-92.

148. Andersen H. Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comp. Phys.* 1983, 52, 24-34.
149. Frenkel D., Smit B. Understanding Molecular Simulation From Algorithms to Applications. Academic Press, California, 2002.
150. Markley J, Bax A., Arata Y., Hilbers C., Kaptein R., Sykes B., Wright P., Wüthrich K. Recommendations for the presentation of NMR structures of protein and nucleic acids. *Pure & Appl. Chem.* 1998, 70, 117-142.
151. Nussinov R., Kumar S. Relationship between ion pair geometries and electrostatic strengths in proteins. *Biophys J.* 2002, 83, 1595-612.
152. D.J. Barlow, J.M. Thornton. Ion-pairs in proteins. *Journal of Molecular Biology.* 1983, 198, 168, 867-885.
153. Pedretti A., Bocci E., Maggi R., Vistoli G. Homology modelling of human DHCR24 (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. *Steroids.* 2008, 73, 708-719.
154. Goodsell, D. S., Morris, G. M. and Olson, A. J. Automated Docking of Flexible Ligands: Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognition.* 1996, 9, 1-5.
155. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comp. Chem.* 2010, 31, 455-461.
156. Irwin J., Shoichet B. ZINC-a free database of commercially available compounds for virtual screening *J. Chem. Inf. Model,* 2005, 45, 177-182.
157. Spangenberg T., Burrows J., Kowalczyk P., McDonald S., Wells T., Willis P. The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases. *PLoS ONE,* 2013, 8, e62906.
158. Willett P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Disc. Today.* 2006, 11, 1046–1053.

-
159. Winnfried Hasel, Thomas F. Hendrickson, W. Clark Still. A rapid approximation to the solvent accessible surface areas of atoms. *Tetrahedron Computer Methodology*. 1988, 1, 103-116.
160. Bosshard H. R., Marti D. N., Jelesarov M., Jelesarov I. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J. Mol. Recognit.* 2004, 17, 1-16.
161. Li L., Dworkowski F. S. N., Cook P. Importance in catalysis of the 6-phosphate-binding site of 6-phosphogluconate in sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 25568-25576.
162. Lipinski C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* 1. 2004, 4, 337–341.
163. Hou T. J., Xu X. J. ADME evaluation in drug discovery. 2. Prediction of partition coefficient by atom-additive approach based on atom-weighted solvent accessible surface areas. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 1058-67.
164. Ertl P., Rohde B., Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 3714-3717.

[Escriba texto]

7 APÉNDICE

7.1 APÉNDICE A

Validación de los modelos obtenidos por homología para la enzima 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* y *T. cruzi*.

L. (L.) mexicana

Lm6PGDH	1	MSNDLGI IGL	GVMGANLALN	IAENGFKVAV	FNRTYTKTTS	FLKEHENEAL
1PGJ	1	SMDVGVVGL	GVMGANLALN	IAEKGFKVAV	FNRTYSKSEE	FMKANASAPP
		* * . * . . **	*****	*** . *****	***** . *	* . *
Lm6PGDH	51	VVNLKGYETM	KEFAASLKKP	RRAFILVQAG	AATDSTIEQL	KEVFEEGDIV
1PGJ	50	AGNLKAFETM	EAFASLKKP	RKALILVQAG	AATDSTIEQL	KKVFEKGDIL
		*** . . ***	***** * . *	* . *****	***** * *	*** ** .
Lm6PGDH	101	IDTGNANFKD	QDRRAAQLES	QGLRFLGMGI	SGGEEGARKG	PAFFPPGGTSP
1PGJ	100	VDTGNANFKD	QGRRAQQLEA	AGLRFLGMGI	SGGEEGARKG	PAFFPPGGTSL
		. ***** . ***	* *** ** .	*****	*****	***** *
Lm6PGDH	151	VWEEVRPIVE	AAAAKAEDGR	PCVTFNGKGG	AGSCVKMYHN	AGEYAVLQIWI
1PGJ	150	VWEEIRPIVE	AAAAKADDGR	PCVTMNGSGG	AGSCVKMYHN	SGEYAILQIWI
		*** . *****	***** . ***	*** ** *	*****	. **** . ***
Lm6PGDH	201	GEAYSALLAF	GFNNDQIADV	FESWKADGFL	KSYMLDISIV	ACRAREAAGN
1PGJ	200	GEVFDILRAM	GLNNDEVAAV	LEDWKSKNFL	KSYMLDISIA	AARAKDKDGS
		** . * * *	* . ***** *	. * ** . **	*****	* ** . . *
Lm6PGDH	251	YLSEKVLDRD	GSKGTGLWSA	QEALEVGVPA	PSLNMAVISR	QMTMYKAERV
1PGJ	250	YLTEHVMDRI	GSKGTGLWSA	QEALEIGVPA	PSLNMAVVS	QFTMYKTERQ
		** . * * . ***	*****	***** . ***	***** . *	* **** . **
Lm6PGDH	301	ANSKAFPHFP	CGPCEKATDK	SPNSPEAKQL	FHAVLSLSIIA	SYAQMFQCLR
1PGJ	300	ANASNAPGIT	QSPGYTLKNK	SPSGPEIKQL	YDSVCIAIIS	CYAQMFQCLR
		** . * . . *	* . *	** . ** ** *	. . * . . **	*****
Lm6PGDH	351	ELDKVYGFGL	NLPATIATFR	AGCILQGYLL	GPMTKAFFEN	PNLPLNMDAF
1PGJ	350	EMDKVHNFGL	NLPATIATFR	AGCILQGYLL	KPMTEAFEKN	PNISNLMCAF
		* . *** **	*****	*****	*** ** *	** . . *** **
Lm6PGDH	401	TKEIAAGLND	CRQILARLTV	NTAVSLAGMM	ASLSYINAMY	TEILPYGQLV
1PGJ	400	QTEIRAGLQN	YRDMVALITS	KLEVSIPVLS	ASLNYVTAMF	TPTLKYGQLV
		** *** .	* . . . * . *	. * . . .	*** . * . ** .	* * *****
Lm6PGDH	451	SLQRDVFGRH	GYERTDRDGR	ESFEWPALQM	SNDLGI IGLG	VMGANLALNI
1PGJ	450	SLQRDVFGRH	GYERVDKGR	ESFQWPELQ	SMDVGVVGLG	VMGANLALNI
		*****	**** * . ***	*** . ** **	* * . * . . ***	*****

Fig. A1. Alineamiento de secuencias para la sub-unidad A de Lm6-PGDH y de Tb6-PGDH.

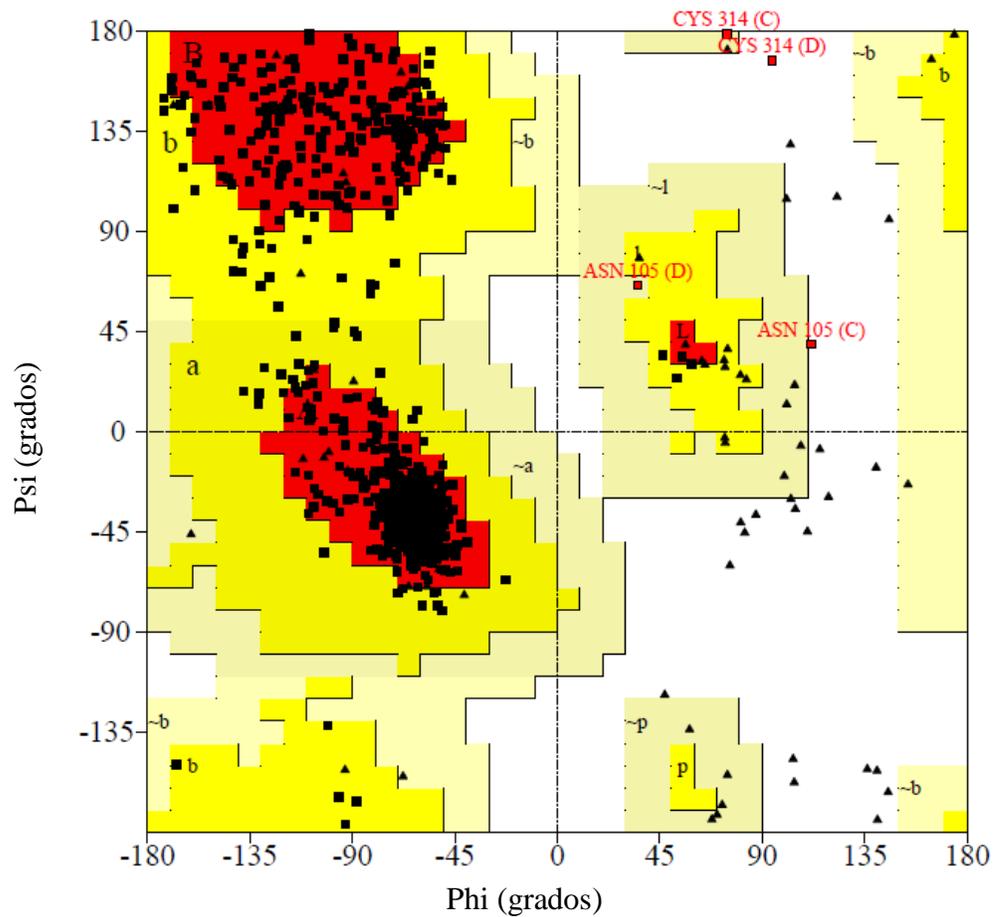


Fig. A2. Gráfico Ramachandran generado con ProCheck¹³⁶ para el dímero de Lm6-PGDH. Ángulo de torsión Psi vs. Phi en función de la energía. Las regiones con valores Psi/Phi más favorables se indican, de forma progresiva, en rojo, amarillo y mostaza. (▲) Residuos Glicina (■) Otros residuos.

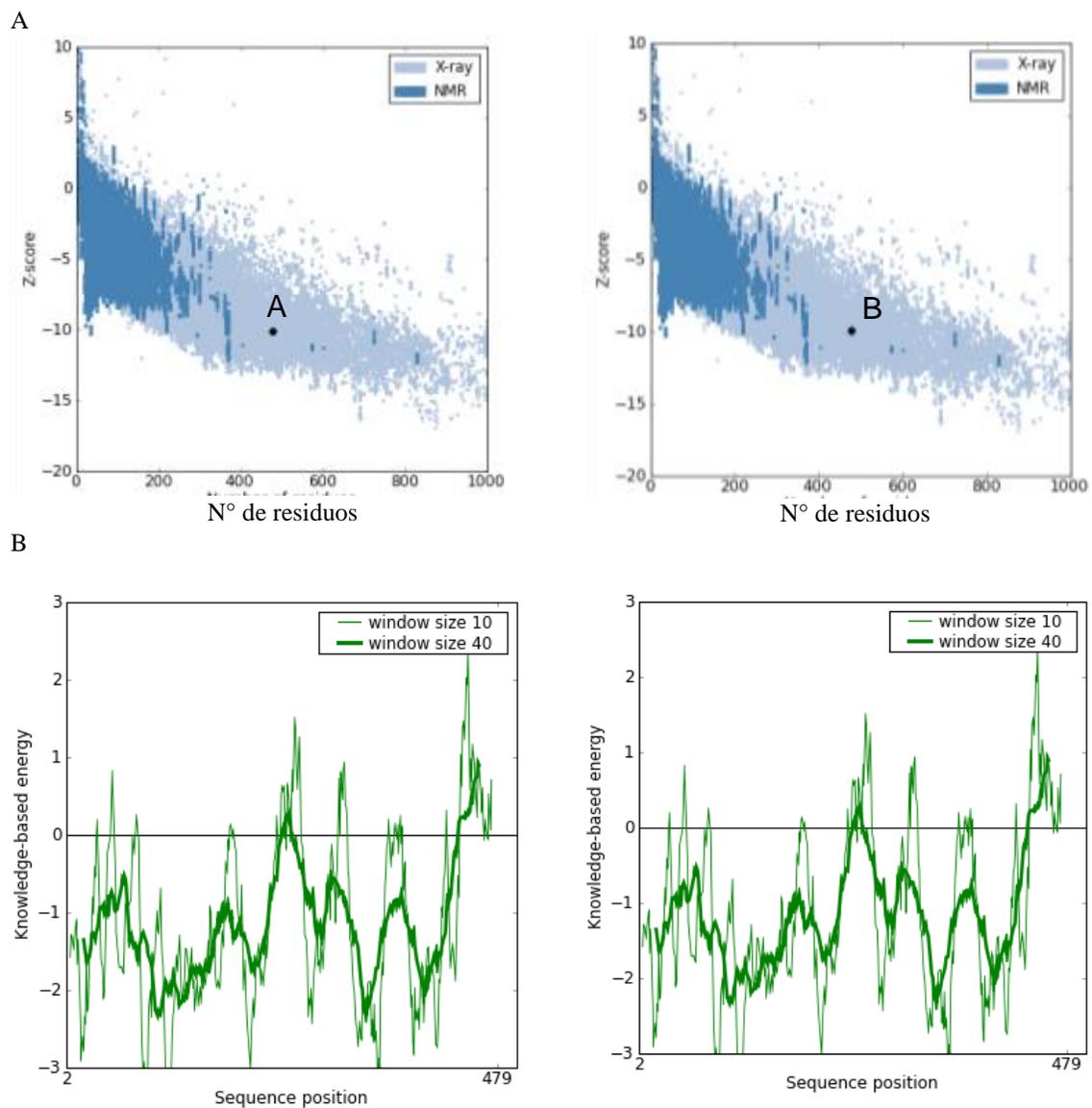


Fig. A3. Evaluación del plegamiento del modelo estructural de Lm6-PGDH obtenido por homología con Tb6-PGDH. A. ProsaWeb¹³⁷ Z-scores de todas la cadenas de proteínas depositadas en el PDB determinadas con RMN (azul oscuro) y rayos-X (azul claro). Los puntos negros corresponden a cada sub-unidad del modelo A y B: -9,90 y -9,99 respectivamente. B. Distribución de energía por residuo para las sub-unidades A y B.

T. cruzi

Tcruzia	1	-MDVGIVGL	GVMGANLALN	IAEKGFBVAV	FNRTYSKAES	FIKEHASAPF
1PGJA	1	SMDVGVVGL	GVMGANLALN	IAEKGFKVAV	FNRTYSKSEE	FMKANASAPF
		****.***	*****	*****	*****	*.*.*****
Tcruzia	49	AANLKAYETM	KSFIMAIIKP	RKIFILVQAG	AATDATIEQL	KGVLEKDDII
1PGJA	50	AGNLKAFETM	EAFASLKKP	RKALILVQAG	AATDSTIEQL	KKVFEKGDIL
		*.****.***	*.***	**	*****	****.*****
Tcruzia	99	VDTGNAHFKD	QTRRAEQLEA	AGLRFILGMI	SGGEEGARKG	PAFFPPGGTLS
1PGJA	100	VDTGNAHFKD	QGRRAQQLEA	AGLRFILGMI	SGGEEGARKG	PAFFPPGGTLS
		*****	*.***.***	*****	*****	*****
Tcruzia	149	VWKEIQPVVE	AAAAKADDGR	PCVTMNGRGG	AGSCVKMYHN	AGEYAVLQVW
1PGJA	150	VWEEIRPIVE	AAAAKADDGR	PCVTMNGSGG	AGSCVKMYHN	SGEYAILQIW
		.*.*	*****	*****	*****	****.***
Tcruzia	199	GEAFDVLRAM	GLSNDEVAAV	FEDWKAKGFL	TSYMLDISIV	AARAKVADGS
1PGJA	200	GEVFDILRAM	GLNNDEVAAV	LEDWKSKNFL	KSYMLDISIA	AARAKDKDGS
		.*.*	*****	*****	*****	*****
Tcruzia	249	HLSEHVKDCI	GSKGTGLWSA	QEALEVGVPA	PSLNMAVLSR	QMTMYKSERE
1PGJA	250	YLTEHVMDRI	GSKGTGLWSA	QEALEIGVPA	PSLNMAVVS	QFTMYKTERQ
		*.***.*	*****	*****	*****	****.***
Tcruzia	299	LNAKTLPFVL	KVPGYAIKDK	SPNAPEIRQL	YHAVSIAIIA	CYAQMFQCLR
1PGJA	300	ANASNAPGIT	QSPGYTLKKN	SPSGPEIKQL	YDSVCIAIIS	CYAQMFQCLR
		.*	*.***	***.***	***.***	*****
Tcruzia	349	ALDKVYDFGL	DLPATIIATFR	AGCILKGYLL	QPMTEAFAKN	VKLSNLLCAF
1PGJA	350	EMDKVHNFGL	NLPATIIATFR	AGCILQGYLL	KPMTEAFEKN	PNISNLMCAF
		.***.***	*****	*****	*****	***.***
Tcruzia	399	EKEIREGLQS	YRDILGFITS	KTALTLPVLS	ASLVYVNGMF	TPTLRYGQLV
1PGJA	400	QTEIRAGLQN	YRDMVALITS	KLEVSIPVLS	ASLNYVTAMF	TPTLKYGQLV
		.***.***	*****	*****	*****	****.***
Tcruzia	449	SLQRDVFGRH	GYERLDKEGR	ESHQWPELQ		
1PGJA	450	SLQRDVFGRH	GYERVDKGR	ESFQWPELQ		
		*****	****.***	**	*****	

Fig. A4. Alineamiento de secuencias para una sub-unidad de Tc6-PGDH y de Tb6-PGDH.

Tabla A1. Modelado por homología de la enzima 6-PGDH de *T. cruzi* respecto a *T. brucei*.

	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
Código PDB	1PGJ	-
Nº residuos p/cadena	478	476
Nº residuos del dímero	956	952
% ID secuencia	100 %	78,29 %
R.M.S.D. Cα (Å)	-	0,5
z-score (por cadena)	-10,1 (A)/ -10,11 (B)	- 10,15 (A) / -10,24 (B)
% Phi/Psi	91,1	90,6

* Respecto a Tb6-PGDH (1PGJ)

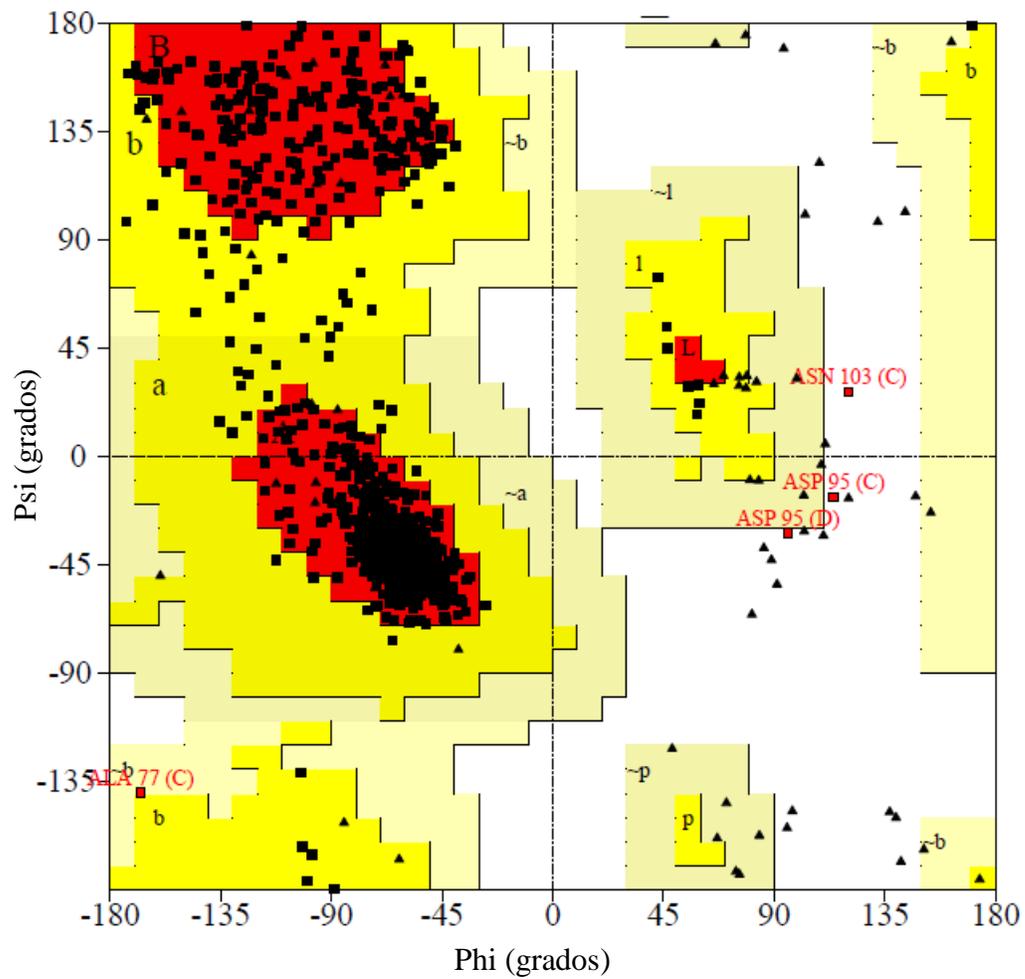


Fig. A5. Gráfico Ramachandran generado con ProCheck¹³⁶ para el dímero de Tc6-PGDH. Ángulo de torsión Psi Vs. Phi en función de la energía. Las regiones con valores Psi/Phi más favorables se indican, de forma progresiva, en rojo, amarillo y mostaza. (▲) Residuos Glicina (■) Otros residuos.

7.2 APENDICE B

Validación de las trayectorias de DM. Evolución de estructura secundaria para las enzimas nativas Lm6-PGDH y Tc6-PGDH.

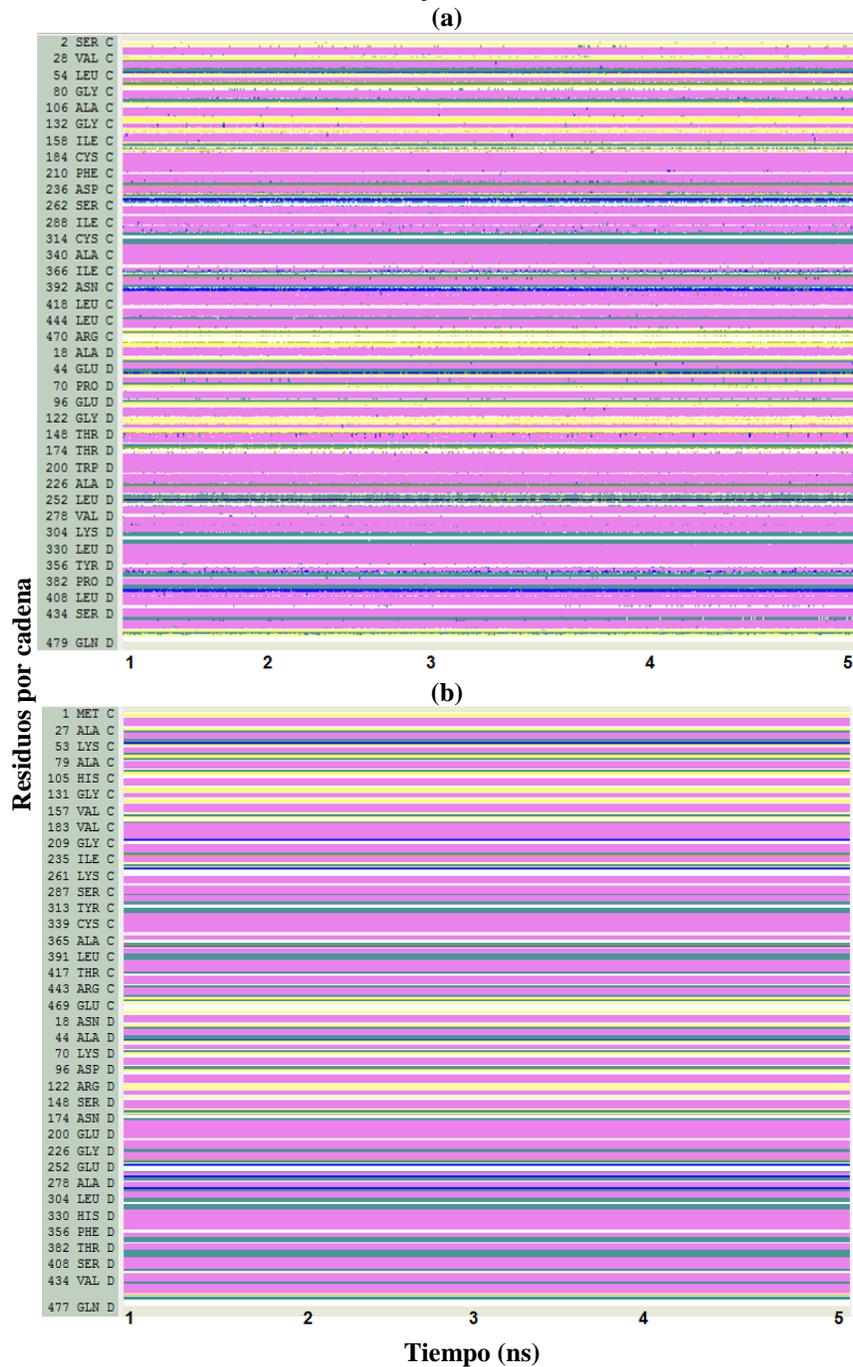


Fig. B1. (a) Lm6-PGDH (b) Tc6-PGDH

Validación de las trayectorias de DM. Evolución de estructura secundaria para las enzimas mutadas Lm*6-PGDH y Tc**6-PGDH.

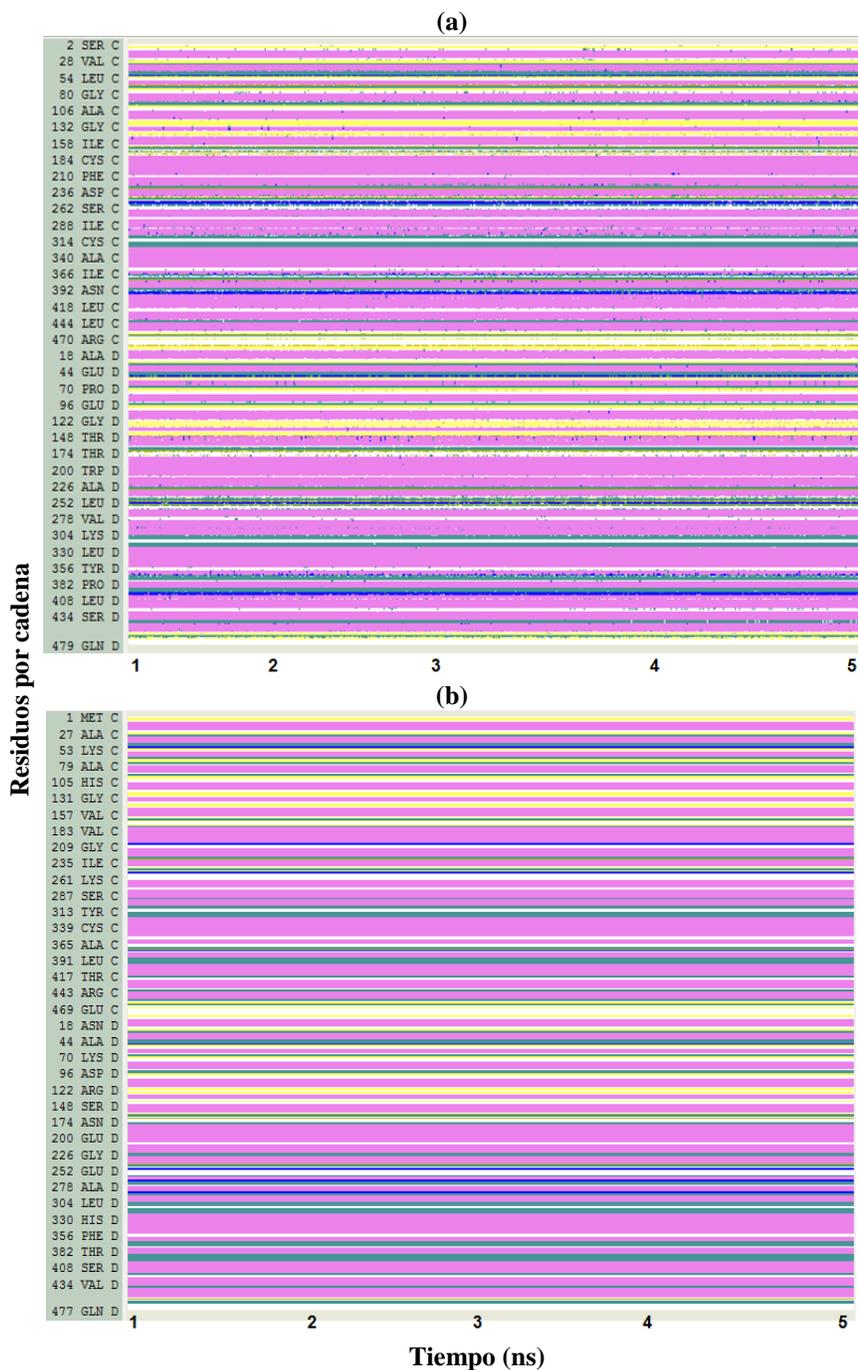


Fig. B2. (a) Lm*6-PGDH (b) Tc**6-PGDH

Tabla B1. Validación de los modelos de las enzimas mutadas de la 6-PGDH de Kinetoplastidas durante las etapas de DM.

	Calent.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Equilibrio	Prod.	
<i>k</i>	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5	1,5	100	1,5	
RMSD*	^a 0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18	0,18	0,16	0,16	0,16	0,18	0,18	
	^b 0,10	0,25	0,25	0,25	0,18	0,18	0,17	0,19	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	
Z-score	^a -10,62	-10,6	-10,6	-10,61	-10,24	-10,61	-10,61	-10,61	-10,61	-10,61	-10,61	-10,61	-10,61	-10,6	-10,6
	^b -10,01	-10,08	-10,05	-10,01	-10	-10	-10,03	-10,03	-10,05	-10,05	-10,03	-10,03	-10,05	-10,05	
%Phi/Psi	^a 91,7	91,9	91,1	91,5	91,3	91,3	91,8	91,7	91,6	91,6	91,6	91,6	91,6	91,6	
	^b 90,3	90,2	90,3	90,3	90,4	90,3	90,1	90,3	90,4	90,3	90,3	90,3	90,3	90,3	
α- hélices	^a 529	528	528	528	528	528	528	528	528	528	528	528	528	528	
	^b 519	519	519	518	517	517	517	522	518	518	518	518	518	518	
3.10 hélices	^a 32	33	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
	^b 39	38	38	38	38	38	38	38	38	30	39	39	39	39	
Láminas β	^a 74	71	70	75	82	82	82	78	82	82	82	82	82	82	
	^b 82	83	78	82	82	82	74	74	82	78	78	78	88	78	
Lazo	^a 166	167	169	168	160	163	161	162	159	161	164	164	160	164	
	^b 165	161	167	166	168	166	174	169	173	168	168	168	167	168	
Vueltas	^a 132	134	134	130	131	128	130	133	132	130	127	127	131	127	
	^b 127	131	130	128	127	129	129	129	129	129	129	129	129	129	

* Para los átomos del esqueleto de la proteína respecto a la primera estructura de la DM

^a Lm*6-PGDH

^b Tc**6-PGDH

7.3 APÉNDICE C

Superposición de las estructuras de la 6-PGDH de *T. brucei*, *T. cruzi* y *H. sapiens* con el modelo validado y refinado de la enzima de *L. (L.) mexicana*.

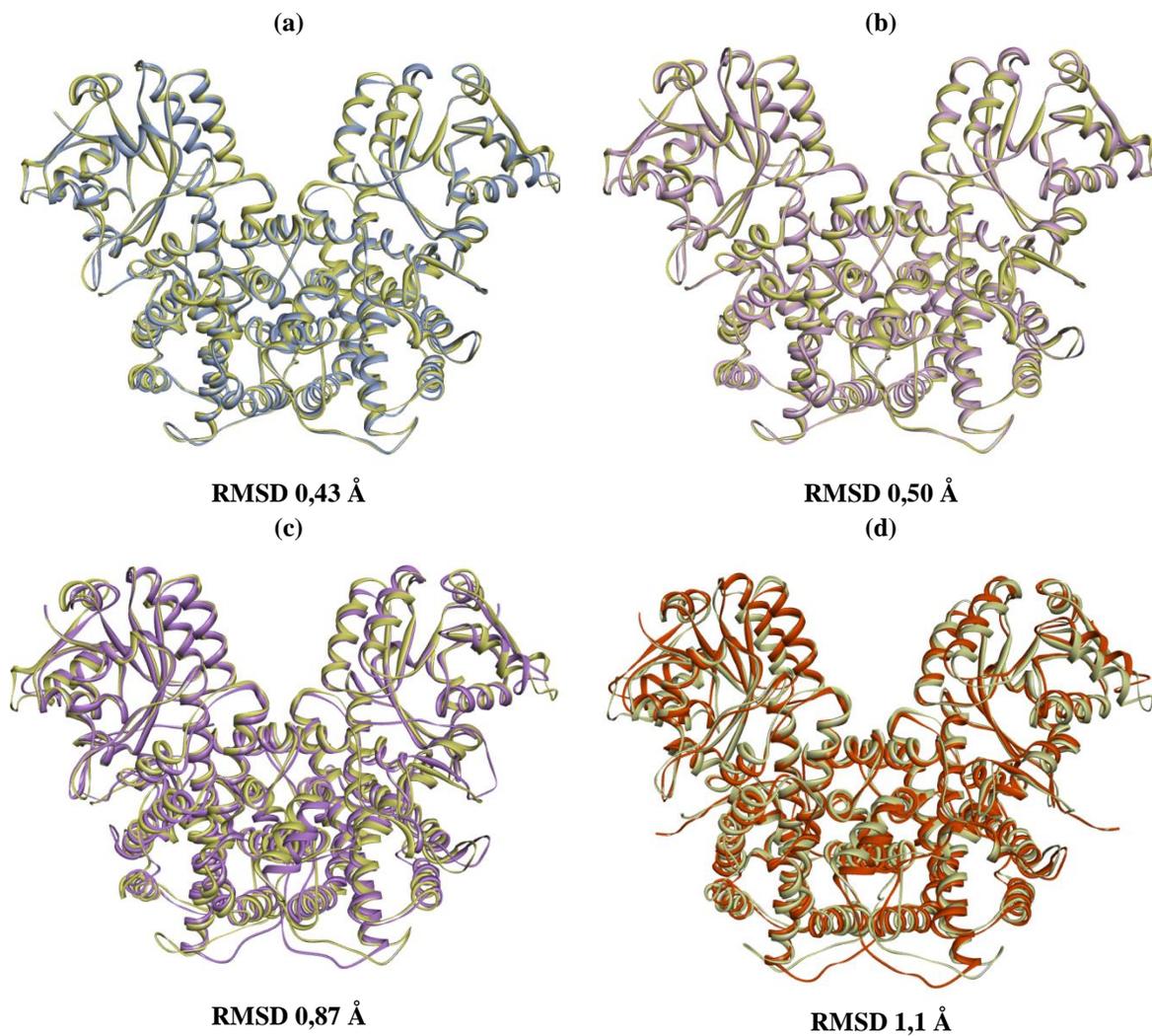


Fig. C1. Superposición de la estructura de la 6-PGDH de *L. (L.) mexicana* con la de otras especies: (a) *T. brucei* (b) *T. cruzi* (c) *H. sapiens* (d) *O. aries*.

7.4 APÉNDICE D

**Código de acceso de los 780 compuestos de la librería química construida.
Fuente: ZINC y Malaria Box (CHEMBL).**

1	1*
2	11*
3	12*
4	13*
5	15*
6	16*
7	17*
8	18*
9	2*
10	3*
11	6PG
12	B*
13	C*
14	CHEMBL50541
15	CHEMBL600689
16	CHEMBL1444097
17	CHEMBL1494297
18	CHEMBL1494872
19	CHEMBL1587659
20	CHEMBL1588536
21	CHEMBL1980322
22	CHEMBL1990481
23	CHEMBL581219
24	CHEMBL1299946
25	CHEMBL1312210
26	CHEMBL1324825
27	CHEMBL1340107
28	CHEMBL1342749
29	CHEMBL1357541
30	CHEMBL1361525
31	CHEMBL1366652
32	CHEMBL1367009
33	CHEMBL1376824
34	CHEMBL1376858
35	CHEMBL1379927
36	CHEMBL1386810
37	CHEMBL1387338
38	CHEMBL1387914
39	CHEMBL1407914
40	CHEMBL1413042
41	CHEMBL1426942
42	CHEMBL1428617
43	CHEMBL1428887
44	CHEMBL1431698
45	CHEMBL1438492
46	CHEMBL1445009
47	CHEMBL1455388
48	CHEMBL1457648
49	CHEMBL1457798
50	CHEMBL1465671
51	CHEMBL1467827
52	CHEMBL1471870
53	CHEMBL1477005
54	CHEMBL1496012
55	CHEMBL1497806
56	CHEMBL1497808
57	CHEMBL1502325
58	CHEMBL1505779
59	CHEMBL1529735
60	CHEMBL1547039
61	CHEMBL1549439
62	CHEMBL1554450
63	CHEMBL1558497
64	CHEMBL1560858
65	CHEMBL1570567
66	CHEMBL1589281
67	CHEMBL1603777
68	CHEMBL1609084
69	CHEMBL1609378
70	CHEMBL1609869
71	CHEMBL1699545
72	CHEMBL1699733
73	CHEMBL1701700
74	CHEMBL1706165
75	CHEMBL1714816
76	CHEMBL1718638
77	CHEMBL1721089
78	CHEMBL1723247
79	CHEMBL1724062
80	CHEMBL1725396
81	CHEMBL1731402
82	CHEMBL1732416
83	CHEMBL1876820
84	CHEMBL1889921
85	CHEMBL1964924
86	CHEMBL1173787
87	CHEMBL1337265
88	CHEMBL1421448
89	CHEMBL1524265
90	CHEMBL1577715
91	CHEMBL1885650
92	CHEMBL1463091
93	CHEMBL1503273
94	CHEMBL1532250
95	CHEMBL1539496
96	CHEMBL1334791
97	CHEMBL1479734
98	CHEMBL1377322
99	CHEMBL1392703
100	CHEMBL1403570
101	CHEMBL1433038
102	PEX
103	ZINC00032517
104	ZINC00032624
105	ZINC00037839
106	ZINC00038817
107	ZINC00042614
108	ZINC00047067
109	ZINC00047746
110	ZINC00049226
111	ZINC00049227
112	ZINC00049494
113	ZINC00049506
114	ZINC00050254
115	ZINC00051435
116	ZINC00051468
117	ZINC00051503
118	ZINC00052406
119	ZINC00052944
120	ZINC00052945
121	ZINC00052982
122	ZINC00056258
123	ZINC00056661
124	ZINC00056662
125	ZINC00056663
126	ZINC00056664
127	ZINC00056725
128	ZINC00076517
129	ZINC00076527
130	ZINC00076530
131	ZINC00080993
132	ZINC00080997
133	ZINC00081545
134	ZINC00083742
135	ZINC00093288
136	ZINC00094804

137	ZINC00097687
138	ZINC00105361
139	ZINC00105627
140	ZINC00108049
141	ZINC00121453
142	ZINC00132462
143	ZINC00132466
144	ZINC00133220
145	ZINC00133453
146	ZINC00139449
147	ZINC00158648
148	ZINC00158866
149	ZINC00158975
150	ZINC00158978
151	ZINC00158979
152	ZINC00169822
153	ZINC00173793
154	ZINC00174185
155	ZINC00174186
156	ZINC00174187
157	ZINC00178415
158	ZINC00179374
159	ZINC00194705
160	ZINC00198455
161	ZINC00208252
162	ZINC00225562
163	ZINC00225582
164	ZINC00245179
165	ZINC00245187
166	ZINC00245190
167	ZINC00248382
168	ZINC00253539
169	ZINC00254364
170	ZINC00295582
171	ZINC00296203
172	ZINC00320872
173	ZINC00325341
174	ZINC00332946
175	ZINC00333145
176	ZINC00337377
177	ZINC00337754

178	ZINC00338630
179	ZINC00339959
180	ZINC00348144
181	ZINC00384435
182	ZINC00391084
183	ZINC00391085
184	ZINC00391086
185	ZINC00391269
186	ZINC00393118
187	ZINC00393120
188	ZINC00393121
189	ZINC00396724
190	ZINC00398611
191	ZINC00398612
192	ZINC00399905
193	ZINC00399906
194	ZINC00401639
195	ZINC00402233
196	ZINC00402234
197	ZINC00402330
198	ZINC00402331
199	ZINC00402335
200	ZINC00402337
201	ZINC00402338
202	ZINC00447023
203	ZINC00492604
204	ZINC00494941
205	ZINC00495014
206	ZINC00522397
207	ZINC00547631
208	ZINC00710718
209	ZINC00820470
210	ZINC00829036
211	ZINC00848204
212	ZINC01097822
213	ZINC01338034
214	ZINC01338167
215	ZINC01361231
216	ZINC01561235
217	ZINC01587522
218	ZINC01593114

219	ZINC01595864
220	ZINC01596858
221	ZINC01596864
222	ZINC01617897
223	ZINC01617898
224	ZINC01624031
225	ZINC01668535
226	ZINC01708749
227	ZINC01711339
228	ZINC01712455
229	ZINC01712456
230	ZINC01712457
231	ZINC01721254
232	ZINC01729617
233	ZINC01733367
234	ZINC01757861
235	ZINC01758732
236	ZINC01758735
237	ZINC01769062
238	ZINC02027659
239	ZINC02028932
240	ZINC02028933
241	ZINC02155784
242	ZINC02155791
243	ZINC02187792
244	ZINC02187822
245	ZINC02276233
246	ZINC02300464
247	ZINC02386402
248	ZINC02391900
249	ZINC02485706
250	ZINC02493485
251	ZINC02496560
252	ZINC02499596
253	ZINC02507533
254	ZINC02511156
255	ZINC02518804
256	ZINC02518812
257	ZINC02518814
258	ZINC02518824
259	ZINC02519426

260	ZINC02519428
261	ZINC02519442
262	ZINC02519443
263	ZINC02519456
264	ZINC02519487
265	ZINC02519536
266	ZINC02519545
267	ZINC02519577
268	ZINC02519708
269	ZINC02519721
270	ZINC02526734
271	ZINC02531012
272	ZINC02556934
273	ZINC02570772
274	ZINC02571626
275	ZINC02571634
276	ZINC02577863
277	ZINC02585162
278	ZINC02628881
279	ZINC02642378
280	ZINC02643995
281	ZINC02646986
282	ZINC02656505
283	ZINC02659686
284	ZINC02665210
285	ZINC02871172
286	ZINC02913588
287	ZINC02913590
288	ZINC03030919
289	ZINC03030928
290	ZINC03122527
291	ZINC03132843
292	ZINC03245369
293	ZINC03282309
294	ZINC03288183
295	ZINC03303740
296	ZINC03326839
297	ZINC03326910
298	ZINC03330088
299	ZINC03340137
300	ZINC03365447

301	ZINC03365466
302	ZINC03365471
303	ZINC03371062
304	ZINC03374965
305	ZINC03434790
306	ZINC03437429
307	ZINC03439547
308	ZINC03439548
309	ZINC03439562
310	ZINC03440901
311	ZINC03440930
312	ZINC03446003
313	ZINC03479845
314	ZINC03479873
315	ZINC03479997
316	ZINC03480015
317	ZINC03480234
318	ZINC03483693
319	ZINC03483702
320	ZINC03483710
321	ZINC03483784
322	ZINC03531913
323	ZINC03531966
324	ZINC03531967
325	ZINC03532046
326	ZINC03532052
327	ZINC03542528
328	ZINC03543375
329	ZINC03543378
330	ZINC03543382
331	ZINC03543989
332	ZINC03543990
333	ZINC03556131
334	ZINC03556177
335	ZINC03587317
336	ZINC03587380
337	ZINC03590626
338	ZINC03590627
339	ZINC03590629
340	ZINC03590668
341	ZINC03597746

342	ZINC03597757
343	ZINC03597811
344	ZINC03597812
345	ZINC03597819
346	ZINC03630821
347	ZINC04006098
348	ZINC04035663
349	ZINC04071112
350	ZINC04103995
351	ZINC04218350
352	ZINC04228204
353	ZINC04234974
354	ZINC04271677
355	ZINC04271678
356	ZINC04271679
357	ZINC04277368
358	ZINC04277378
359	ZINC04329097
360	ZINC04343023
361	ZINC04355143
362	ZINC04419572
363	ZINC04530447
364	ZINC04548415
365	ZINC04549626
366	ZINC04549768
367	ZINC04549770
368	ZINC04683441
369	ZINC04831048
370	ZINC04831054
371	ZINC04967342
372	ZINC04967343
373	ZINC04986655
374	ZINC05001339
375	ZINC05001345
376	ZINC05002293
377	ZINC05016792
378	ZINC05131697
379	ZINC05135016
380	ZINC05135175
381	ZINC05135176
382	ZINC05135178

383	ZINC05197306
384	ZINC05212053
385	ZINC05212059
386	ZINC05266025
387	ZINC05326298
388	ZINC05326300
389	ZINC05326325
390	ZINC05326460
391	ZINC05326461
392	ZINC05667074
393	ZINC05749043
394	ZINC05813220
395	ZINC05818736
396	ZINC05928289
397	ZINC05945165
398	ZINC06069668
399	ZINC06091397
400	ZINC06154916
401	ZINC06206627
402	ZINC06561547
403	ZINC06561612
404	ZINC06595121
405	ZINC06658376
406	ZINC06720866
407	ZINC06750302
408	ZINC06750302
409	ZINC06751575
410	ZINC07005660
411	ZINC07413171
412	ZINC07413230
413	ZINC07413240
414	ZINC07654479
415	ZINC07986287
416	ZINC08231875
417	ZINC08231876
418	ZINC08232450
419	ZINC08277708
420	ZINC08315628
421	ZINC08341545
422	ZINC08341575
423	ZINC08341578

424	ZINC08342835
425	ZINC08342839
426	ZINC08344783
427	ZINC08654047
428	ZINC08884489
429	ZINC08884490
430	ZINC08944491
431	ZINC08981433
432	ZINC08985805
433	ZINC09051295
434	ZINC09158846
435	ZINC09158848
436	ZINC09158878
437	ZINC09204448
438	ZINC09256695
439	ZINC09313888
440	ZINC09336328
441	ZINC09364008
442	ZINC09417864
443	ZINC09457975
444	ZINC09457978
445	ZINC09457979
446	ZINC09457991
447	ZINC09458179
448	ZINC09468724
449	ZINC09477375
450	ZINC09502167
451	ZINC09512232
452	ZINC09512234
453	ZINC09512235
454	ZINC09512251
455	ZINC09514278
456	ZINC09579141
457	ZINC09583476
458	ZINC09583489
459	ZINC09721404
460	ZINC09752607
461	ZINC09883537
462	ZINC09908487
463	ZINC09909922
464	ZINC10028127

465	ZINC10028131
466	ZINC10028135
467	ZINC10028137
468	ZINC10028140
469	ZINC10028142
470	ZINC10028146
471	ZINC11804038
472	ZINC12413627
473	ZINC12568334
474	ZINC12687919
475	ZINC12910022
476	ZINC13535403
477	ZINC13564048
478	ZINC13739153
479	ZINC13985442
480	ZINC14066521
481	ZINC14158880
482	ZINC14169665
483	ZINC14169666
484	ZINC14674497
485	ZINC14675450
486	ZINC14812180
487	ZINC14845416
488	ZINC14903872
489	ZINC14982191
490	ZINC14984267
491	ZINC15982176
492	ZINC16183843
493	ZINC16682983
494	ZINC16697762
495	ZINC16766115
496	ZINC18275888
497	ZINC20311171
498	ZINC20362235
499	ZINC21185139
500	ZINC21711940
501	ZINC21712334
502	ZINC22066778
503	ZINC22313555
504	ZINC23075051
505	ZINC23469930

506	ZINC25724693
507	ZINC25757150
508	ZINC25783361
509	ZINC26254541
510	ZINC26506996
511	ZINC26507006
512	ZINC26896067
513	ZINC26896444
514	ZINC26897114
515	ZINC26898436
516	ZINC26953845
517	ZINC30678295
518	ZINC32171354
519	ZINC32191922
520	ZINC32221718
521	ZINC32222152
522	ZINC32232751
523	ZINC32269146
524	ZINC32299310
525	ZINC32299318
526	ZINC32302481
527	ZINC32500841
528	ZINC32501007
529	ZINC32501249
530	ZINC32501250
531	ZINC32501252
532	ZINC32627864
533	ZINC32628087
534	ZINC33835502
535	ZINC33975219
536	ZINC33992247
537	ZINC34135721
538	ZINC34172348
539	ZINC34215503
540	ZINC34303141
541	ZINC34448880
542	ZINC34448886
543	ZINC34449520
544	ZINC34479034
545	ZINC34514968
546	ZINC34557224

547	ZINC34579046
548	ZINC34628565
549	ZINC34770439
550	ZINC34860109
551	ZINC34928767
552	ZINC35510118
553	ZINC35510124
554	ZINC35569350
555	ZINC35940121
556	ZINC35962838
557	ZINC36437382
558	ZINC36438210
559	ZINC36449527
560	ZINC36466454
561	ZINC36811084
562	ZINC37263332
563	ZINC37525711
564	ZINC37624155
565	ZINC37624187
566	ZINC37624215
567	ZINC37624225
568	ZINC37624231
569	ZINC37624240
570	ZINC37624285
571	ZINC37624286
572	ZINC37624289
573	ZINC37624290
574	ZINC37624316
575	ZINC37624317
576	ZINC37624318
577	ZINC37624319
578	ZINC37624320
579	ZINC37624321
580	ZINC37624322
581	ZINC37624323
582	ZINC37624327
583	ZINC37624381
584	ZINC37624382
585	ZINC37624385
586	ZINC37624387
587	ZINC37624389

588	ZINC37624389
589	ZINC37624392
590	ZINC37624394
591	ZINC37624396
592	ZINC37624397
593	ZINC37624410
594	ZINC37624414
595	ZINC37624415
596	ZINC37624419
597	ZINC37624421
598	ZINC37624454
599	ZINC37624458
600	ZINC37624461
601	ZINC37624463
602	ZINC37624464
603	ZINC37624465
604	ZINC37624466
605	ZINC37624467
606	ZINC37624470
607	ZINC37624471
608	ZINC37624472
609	ZINC37624473
610	ZINC37624480
611	ZINC37624481
612	ZINC37624493
613	ZINC37624497
614	ZINC37624506
615	ZINC37624517
616	ZINC37624540
617	ZINC37624544
618	ZINC37624553
619	ZINC37624571
620	ZINC37624572
621	ZINC37624573
622	ZINC37624575
623	ZINC37624582
624	ZINC37624584
625	ZINC37624608
626	ZINC37624627
627	ZINC37624629
628	ZINC37624631

629	ZINC37624634
630	ZINC37624641
631	ZINC37624651
632	ZINC37624652
633	ZINC37624653
634	ZINC37624667
635	ZINC37624667
636	ZINC38973161
637	ZINC38995777
638	ZINC39017478
639	ZINC39040081
640	ZINC39062718
641	ZINC39083955
642	ZINC39084303
643	ZINC39084317
644	ZINC39115922
645	ZINC39116599
646	ZINC39189706
647	ZINC39200487
648	ZINC39206190
649	ZINC39248707
650	ZINC39264064
651	ZINC39411307
652	ZINC39415837
653	ZINC39415838
654	ZINC40186741
655	ZINC40541681
656	ZINC40541683
657	ZINC40541687
658	ZINC40546717
659	ZINC40546723
660	ZINC40974876
661	ZINC41228149
662	ZINC41228155
663	ZINC41251206
664	ZINC41288560
665	ZINC41328180
666	ZINC41404381
667	ZINC42362486
668	ZINC43199174

669	ZINC43827559
670	ZINC44076501
671	ZINC44138241
672	ZINC44560037
673	ZINC44787405
674	ZINC45052455
675	ZINC45235341
676	ZINC45792984
677	ZINC45792987
678	ZINC45793045
679	ZINC45806211
680	ZINC45814733
681	ZINC45814773
682	ZINC45921673
683	ZINC45921676
684	ZINC46045950
685	ZINC46045953
686	ZINC46046042
687	ZINC47818634
688	ZINC47818646
689	ZINC47895790
690	ZINC48764062
691	ZINC48765464
692	ZINC48766212
693	ZINC49015500
694	ZINC49015504
695	ZINC49015588
696	ZINC49015592
697	ZINC49015596
698	ZINC49015600
699	ZINC49015630
700	ZINC49015634
701	ZINC49015697
702	ZINC49015701
703	ZINC49015705
704	ZINC49015709
705	ZINC49015985
706	ZINC49016146
707	ZINC49016162
708	ZINC49016168

709	ZINC49016533
710	ZINC49016688
711	ZINC49016897
712	ZINC49016909
713	ZINC49016986
714	ZINC49017180
715	ZINC49017233
716	ZINC49017251
717	ZINC49017291
718	ZINC49017296
719	ZINC49017322
720	ZINC49017325
721	ZINC49017344
722	ZINC49017347
723	ZINC49019170
724	ZINC49019174
725	ZINC49019269
726	ZINC49019273
727	ZINC49019326
728	ZINC49019330
729	ZINC49019334
730	ZINC49019338
731	ZINC49453388
732	ZINC49453517
733	ZINC49455090
734	ZINC49455092
735	ZINC49455094
736	ZINC49455096
737	ZINC50826594
738	ZINC55312845
739	ZINC55312847
740	ZINC56216412
741	ZINC57214301
742	ZINC58172997
743	ZINC58358334
744	ZINC62350595
745	ZINC62721258
746	ZINC66346000
747	ZINC69197872
748	ZINC70463077

749	ZINC70463078
750	ZINC70463079
751	ZINC70463093
752	ZINC71256483
753	ZINC71613761
754	ZINC71772636
755	ZINC71772636
756	ZINC71778661
757	ZINC72226023
758	ZINC72226024
759	ZINC72226025
760	ZINC72232729
761	ZINC72233157
762	ZINC75279897
763	ZINC75279898
764	ZINC79062329
765	ZINC82290987
766	ZINC82671046
767	ZINC82699486
768	ZINC82699487
769	ZINC83254813
770	ZINC83268330
771	ZINC83823987
772	ZINC83824205
773	ZINC84605940
774	ZINC85347984
775	ZINC87222870
776	ZINC88077406
777	ZINC91301348
778	ZINC91351963
779	ZINC91692650
780	ZINC95215902

*Control: (B, C)
 Inhibidores de T.
 brucei⁶²
 (1,2,3,11,12,13,15,16,1
 7,18) Hits obtenidos del
 barrido virtual⁶³