



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS LÍDER COMO LIGANTES DE
***AbFtsZ* CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA :

Marlen Parra Sánchez



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: M. en B. Martha Giles Gómez
VOCAL: Profesor: Dra. Laura Cecilia Flores Bocanegra
SECRETARIO: Profesor: Dr. José Alberto Rivera Chávez
1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. José Luis Medina Franco
2° SUPLENTE: Profesor: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

**LABORATORIO 2-5 Y 2-6, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES,
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:



Dr. José Alberto Rivera Chávez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Enrique Aguilar Ramírez

M. en C. Karol Carrillo Jaimes

SUSTENTANTE (S):

Marlen Parra Sánchez

AGRADECIMIENTOS:

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, quien me brindo la oportunidad de desarrollarme académicamente.

A el **Dr. José Alberto Rivera Chávez** quien a mi parecer es un genio, con gran calidad humana. Y con quien estoy agradecida primeramente por la oportunidad de ser parte de su excelente grupo de trabajo, y en segundo por su apoyo y paciencia para realizar este proyecto.

A mi compañero **M. en C. Enrique Aguilar Ramírez** a quien admiro y aprecio. Gracias por el esmero, paciencia, dedicación para la realización de este proyecto. Y por los consejos y enseñanzas de todo tipo para crecer personal y profesionalmente.

A la **M. en C. Karol Carrillo Jaimes** por el apoyo y el tiempo dedicado a la elaboración experimental y escrita de este proyecto.

A la **Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA)** que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IA207422) financió algunas de las actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, a través del proyecto: CF-2019-263977.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A Él. Gracias por darme la oportunidad de estar bien y brindarme fuerza en los momentos difíciles eres mi sostén y mi guía, y el primero con quien comparto mis alegrías.

A mis padres, mis maestros de vida a quienes amo profundamente. Ustedes me han enseñado cual es el verdadero valor del amor y la familia. Los amo y los respeto, gracias por permitirme subir a sus hombros para ver más allá de lo que mi experiencia y juventud me permiten ver.

A mi hermana, te amo. Gracias por todo el apoyo nunca paro de aprender contigo.

A mis compañeros del laboratorio 2-5 y 2-6, quienes me han permitido tener una estancia increíble durante el desarrollo del proyecto, especialmente a Enrique, Sahid, Ixchel, Ingrid, Mariana, Karol, Carlos Daniel, Ángeles, Valeria, Mario Yahir y Mario Carreón.

DEDICATORIA.

A Él, gracias por todo lo que tengo y lo que está por venir.

A mis padres, Carlos Parra y Adriana Sánchez.

¡Mamá, papá! Los amo.

A mi hermana, Ari.

Al Dr. José A. R. C., Enrique A. R. y Karol C. J., unos genios totales.

Los admiro y los respeto

ÍNDICE.

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABLAS.....	VII
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.-ANTECEDENTES	3
2.1. Resistencia a los antimicrobianos.....	3
2.2 Filamenting temperature-sensitive Z (FtsZ): Generalidades	4
2.3 Ligantes de FtsZ.....	6
2.4 Ensayos para determinar la actividad GTPasa de FtsZ.....	9
2.5 Modelado por homología.....	9
2.6 Diagrama de Ramachandran.....	10
2.7 Acoplamiento molecular	12
3.- JUSTIFICACIÓN	13
4.- HIPÓTESIS	14
5.-OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1 Materiales.....	15
6.2 Análisis bioinformático de la proteína FtsZ de <i>Acinetobacter baumannii</i> (AbFtsZ)..	15
6.3 <i>Método in silico</i> . Estudios de acoplamiento molecular	15

6.3.1 Proteína <i>AbFtsZ</i> , obtención del modelo por homología.....	15
6.3.2 Construcción de la base de datos y preparación de los ligandos	16
6.3.3 Acoplamiento molecular (AM, <i>Docking</i>)	16
6.4 Evaluación de los cambios de actividad GTPasa de la enzima <i>AbFtsZ</i>	16
6.5 Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano	17
7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
7.1 Estudio bioinformático de la proteína FtsZ de <i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>AbFtsZ</i>) ..	18
7.2 Obtención del modelo proteico de <i>AbFtsZ</i> por homología	21
7.3 Construcción de una base de datos de metabolitos secundarios de origen fúngico para su evaluación como moduladores de la actividad de <i>AbFtsZ</i>	24
7.4 Estudios de acoplamiento molecular	29
7.5 Evaluación de la inhibición de la actividad GTPasa de <i>AbFtsZ</i> y actividad antibacteriana frente a <i>A. baumannii</i>	34
7.6 Análisis del sitio y del tipo de interacciones para las moléculas con potencial antibacteriano.....	37
8.- CONCLUSIONES.....	43
9.- PERSPECTIVAS.....	44
10. REFERENCIAS	45
11.ANEXOS.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura terciaria de FtsZ <i>B. subtilis</i> (<i>BsFtsZ</i>)	5
Figura 2. Secuencia de la cola C-terminal conservada involucrada en la unión de ZipA y FtsA con FtsZ. ¹¹	5
Figura 3. Estructura de ligantes de FtsZ.	7
Figura 4. A) Distribución de los ángulos ϕ/ψ en un diagrama de Ramachandran.....	11
Figura 5. Secuencia de aminoácidos de <i>AbFtsZ</i>	15
Figura 6. Filogenia de FtsZ de 10 géneros distintos.	19
Figura 7. Predicciones obtenidas para el modelo proteico de <i>AbFtsZ</i>	22
Figura 8. Modelo tridimensional de <i>AbFtsZ</i>	22
Figura 9. Gráfico de Ramachandran para el modelo proteico 3D de <i>AbFtsZ</i>	23
Figura 10. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (1-33)	26
Figura 11. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (34-63).. ..	27
Figura 12. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (64-105)	28
Figura 13. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (106-144) ..	29
Figura 14. Acoplamiento de GTP con <i>AbFtsZ</i>	30
Figura 15. Complejo proteico formado entre berberina y <i>AbFtsZ</i>	31
Figura 16. Acoplamiento molecular de los 144 ligantes de la base de datos y <i>AbFtsZ</i>	33
Figura 17. Resultados teóricos generales del acoplamiento molecular Ligando- <i>AbFtsZ</i>	33
Figura 18. Clasificación y energía de afinidad de las 45 mejores predicciones obtenidas en acoplamiento molecular con <i>AbFtsZ</i>	34
Figura 19. Estructuras de los <i>hits</i> seleccionados.....	35
Figura 20. Actividad GTPasa de <i>AbFtsZ</i> y actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de <i>Acinetobacter baumannii</i> frente a los <i>hits</i> seleccionados.	36
Figura 21. Complejo <i>AbFtsZ</i> -Molécula 15.....	38
Figura 22. Complejo <i>AbFtsZ</i> -Molécula 52.....	38
Figura 23. Complejo <i>AbFtsZ</i> -Molécula 53.....	39
Figura 24. Complejo <i>AbFtsZ</i> -Molécula 142.....	40
Figura 25. Interacción de la molécula 52 con la cola del C-terminal.....	41
Figura 26. Análisis por comparación de la actividad porcentual GTPasa y la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente, de las moléculas 52 (<i>orto</i>), 58 (<i>meta</i>) y 66 (<i>para</i>).....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. MICs, ensayos experimentales y otras actividades biológicas presentadas por los ligantes de FtsZ de origen natural.	8
Tabla 2. Análisis de la distribución de los residuos de aminoácidos de AbFtsZ, en el gráfico de Ramachandran (Figura 9).	24

TABLAS (ANEXO 1)

Tabla A 1. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -8.5 Kcal/mol).....	54
Tabla A 2. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)	55
Tabla A 3. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)	56

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AbFtsZ	FtsZ obtenida a partir de <i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AB	Antibacteriano
AC	Anticancerígeno
ACG	AC
<i>Act</i> _{Antibact}	Actividad antibacteriana
<i>Act</i> _{GTPasa}	Actividad GTPasa
AD	Antidiarreico
Agua milli-Q	Agua ultrapura con grado de laboratorio que ha sido filtrada y purificada por osmosis inversa
AF	Antifúngico
AI	Antiinflamatorio
Ala	Alanina
AM	Acoplamiento molecular
AN	Analgésico
AO	Antioxidante
APD	Antipalúdico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspargina
C_{α}	Carbono alfa
Caldo MH	Caldo Mueller Hinton
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standar International</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
C-terminal	Carboxilo terminal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcFtsZ</i>	FtsZ proveniente de <i>E.coli</i>
EnP	Ensayo de Polimerización
EnGTPasa	Ensayo de actividad GTPasa
MET	Microscopía electrónica de transmisión
<i>FtsZ</i>	Filamenting temperature sensitive
FtsZ-GTP	Complejo entre FtsZ y GTP
GDP	Guanosín difosfato
Gln	Glutamina
<i>Glu</i>	Ácido glutámico
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Actividad enzimática que utiliza guanosín trifosfato como sustrato
IC_{50}	Concentración inhibitoria al 50 %
I-TASSER	Iterative Threading ASSEMBly Refinement
Kcal	Kilocaloría
KCl	Cloruro de potasio
LBSII	Laboratorio de Bioseguridad Nivel II
Lys	Lisina
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
MET	Microscopía electrónica de transmisión
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
<i>MtbFtsZ</i>	FtsZ proveniente de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nm	Nanómetros
	Amino terminal

N-terminal	Organización mundial de la salud
OMS	<i>Protein Data Bank</i>
Pi	Fosfato libre
PCM	Potencial citotóxico moderado
PDB	Partes por millón
ppm	<i>Programs to check the Stereochemical Quality of Protein Structures</i>
PROCHECK	Plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana
PUCRA	Resistencia antimicrobiana
RAM	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. aureus</i>	FtsZ proveniente de <i>Staphylococcus aureus</i>
SaFtsZ	Tris(hidroximetil)aminometano
TEA	Tratamiento en enfermedades autoinmunes
Tris	Polisorbato 20 o monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano
TSM	Tratamiento en el síndrome metabólico
Tween 20	Tirosina
Tyr	University of California, Los Angeles
UCLA	Unidades Formadoras de Colonias
UFC	Volumen
v	Verde Malaquita
VM	Por ciento
%	Longitud de onda
λ	Microlitro
μL	Grados celsius
$^{\circ}\text{C}$	Delta de absorbancia
ΔAbs	Angulo phi, entre N y C α del enlace peptídico
ϕ	Angulo psi, describe la rotación entre el C α y el C del enlace peptídico
ψ	

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos (RAM) es una problemática mundial que cada año afecta a millones de personas y se ha estimado que podría convertirse en una de las principales causas de muerte. Este panorama ha incrementado el interés en encontrar alternativas para mejorar la efectividad de los antimicrobianos, donde uno de los principales obstáculos es la constante aparición de microorganismos resistentes.

Entre las 12 bacterias con mayor relevancia en la búsqueda de fármacos se encuentra *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Este microorganismo es el responsable de las principales infecciones intrahospitalarias en México.

Actualmente, la búsqueda de nuevos antibióticos para contrarrestar la problemática impuesta por la RAM se desarrolla principalmente en centros de investigación albergados por universidades. Estos grupos de trabajo han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de antibacterianos dirigidos a blancos moleculares novedosos, entre los cuales destaca la proteína FtsZ.

Con base en estas premisas, el presente estudio se centró en la elaboración de una base de datos que comprende 144 metabolitos secundarios de origen fúngico, así como en la evaluación de su interacción virtual con un modelo generado por homología para la enzima FtsZ de *A. baumannii* (*AbFtsZ*), mediante la aplicación de estudios de acoplamiento molecular. Los resultados de cribado virtual seleccionaron 9 moléculas con resultados positivos para realizar dos ensayos in vitro (actividad antibacteriana y actividad enzimática). Los resultados de estos ensayos revelaron que las moléculas **15**, **52**, **53**, **56** y **142** poseen un potencial antimicrobiano prometedor.

1.- INTRODUCCIÓN

Se estima que la resistencia antibacteriana (RAM) podría causar la muerte de 10 millones de personas para el año en 2050.¹ Para hacer frente a este problema, la Organización Mundial de las Salud (OMS) enlistó los 12 microorganismos que representan una mayor amenaza para la salud humana y las agrupó en tres categorías, crítica, alta y media, en función de la urgencia de desarrollar nuevos antibióticos.² En la categoría crítica destaca *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos,² un patógeno cada vez más prevalente en ambientes intrahospitalarios, tanto en México como a nivel mundial, para el cual existen pocas o limitadas alternativas para su tratamiento.

En general, los fármacos antibacterianos actúan inhibiendo la síntesis de la pared o membrana celular³, el metabolismo o la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y en la actualidad, no existen antibióticos con mecanismos de acción distintos a los ya ampliamente estudiados⁴. En este sentido, la búsqueda de moléculas con actividad antibacteriana que actúen a través de mecanismos de acción novedosos es una actividad esencial que se ha dejado en manos de la academia. Algunos de los blancos moleculares más prometedores son aquellos involucrados en la división celular bacteriana,⁵ por ejemplo, la enzima FtsZ. Esta proteína orquesta la formación del divisoma y el anillo Z, de tal forma que alteraciones en su dinámica tienen como consecuencia la interrupción de la fisión binaria, y como consecuencia la muerte celular.³

Sin lugar a duda, tanto los hongos microscópicos como las actinobacterias son las fuentes más prolíficas de moléculas con actividad antibacteriana y han contribuido con más del 50% de los antibióticos empleados en la terapéutica moderna.^{6,7} Además, a partir de hongos microscópicos se han descubierto algunas de las moléculas más prometedoras para el desarrollo de antibióticos dirigidos a FtsZ, por ejemplo, la viriditoxina.⁶⁻⁸

Con base en estas consideraciones, el presente trabajo se enfocó en la construcción de una base de datos de metabolitos secundarios de origen fúngico y la evaluación de su interacción virtual con un modelo generado por homología para la enzima FtsZ de *A. baumannii* (*AbFtsZ*), empleando estudios de acoplamiento molecular.

Esta exploración identificó nueve *hits* de *AbFtsZ*, cada uno de los cuales se evaluó *in vitro* en dos modelos, uno que mide la actividad enzimática y otro la inhibición del crecimiento bacteriano. La aplicación de esta metodología identificó una nueva clase de ligantes de *AbFtsZ* con actividad antibacteriana y marca la pauta para el desarrollo de antibacterianos dirigidos al tratamiento de infecciones provocadas por *A. baumannii* multirresistente

2.-ANTECEDENTES

2.1. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia antimicrobiana (RAM) se refiere al fenómeno en el cual un microorganismo ya no es susceptible a un antimicrobiano al que previamente era sensible.² En el 2017, la Organización Mundial de la Salud emitió un reporte en el cuál enlistó a las bacterias con mayor tasa de RAM a nivel mundial y que requieren atención inmediata para el desarrollo de antibióticos, destacando las bacteria del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.)⁹ y los microorganismos *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella* spp.²

En México (2018) el Programa Universitario para la Contención de la Resistencia Antimicrobiana (PUCRA) a través del informe del Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana¹⁰, reportó un aumento en la resistencia de microorganismos del grupo ESKAPE a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (entre ellos, ciprofloxacino y meropenem)¹⁰, resaltando *A. baumannii* como el patógeno de mayor prevalencia y con perfiles de resistencia más alarmantes¹⁰, principalmente causa infecciones nosocomiales, que van desde neumonía, meningitis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, peritonitis es una bacteria Gram negativa ¹¹, y el tratamiento consta en utilizar carbapenémicos principalmente sin embargo en algunas regiones ya existen cepas que son resistentes a este antibacteriano.¹²

Estos informes evidencian el grave problema de salud pública que representa la RAM, ya que cada vez es más común que las infecciones causadas por microorganismos resistentes no respondan a los tratamientos convencionales, exponiendo a la población global al riesgo inminente de enfrentar una pandemia.¹³

De seguir aumentando la tasa de RAM, se estima que cerca de 10 millones de personas podrían morir en 2050 debido a la resistencia a los antibióticos.¹ Además, un estudio reciente publicado en la revista médica británica *Lancet* determinó que, en 2019, 1.2 millones de muertes estuvieron directamente relacionadas con la RAM, acortando la brecha de tiempo estimada.¹⁴

2.2 Filamenting temperature-sensitive Z (FtsZ): Generalidades

La proteína FtsZ por sus siglas en inglés (*Filamenting temperature-sensitive mutant Z*), es una hidrolasa de unión a GTP (GTPasa)¹⁵. Esta enzima es decisiva en el proceso de división celular bacteriana, ya que es la primera proteína que se mueve al sitio de división celular y a través de procesos de autopolimerización se ensambla en forma de un anillo (anillo Z) que genera una contracción celular que da lugar a dos nuevas células a partir de una.³ Asimismo, FtsZ está altamente conservada en casi todas las bacterias y se considera el homólogo bacteriano de la tubulina.¹⁶

Esta proteína consta de dos dominios conectados por una hélice α (α -H7), el N-terminal que alberga el sitio de unión a GTP y está altamente conservado y el dominio C-terminal donde se sitúa el asa T7, además de la hendidura interdominio que se ubica entre las hojas β del dominio C-terminal y la hélice α -H7.^{17,18} El dominio C-terminal tiene un bajo grado de conservación y corresponde con una estructura corta y crucial para crear interacciones con otras proteínas del divisoma y establecer interacciones laterales entre los protofilamentos del anillo Z (**Figura 1**).^{19,20}

Durante la autopolimerización, en la cual se lleva a cabo la formación del anillo Z, se hidroliza GTP para generar GDP y un grupo fosfato.²¹ En este proceso se forma un complejo llamado divisoma, constituido por una amplia variedad de componentes proteicos. Este proceso es rápido tarda entre 1-5 minutos¹⁵ y tiene como fuerza motriz la unión e hidrólisis de GTP¹⁵, proceso que se lleva a cabo cuando dos unidades monoméricas de FtsZ se unen para formar el sitio catalítico.¹⁸ La polimerización comienza cuando el asa catalítica T7 de uno de los monómeros se inserta en el dominio de unión a nucleótidos de otra unidad de FtsZ, junto con el ion magnesio que a su vez modula la hidrólisis.²¹ La adición de iones de magnesio y potasio promueven la polimerización FtsZ-GTP y la formación del sitio de unión a GTP en la interfaz que se encuentra entre cada dos subunidades.²¹

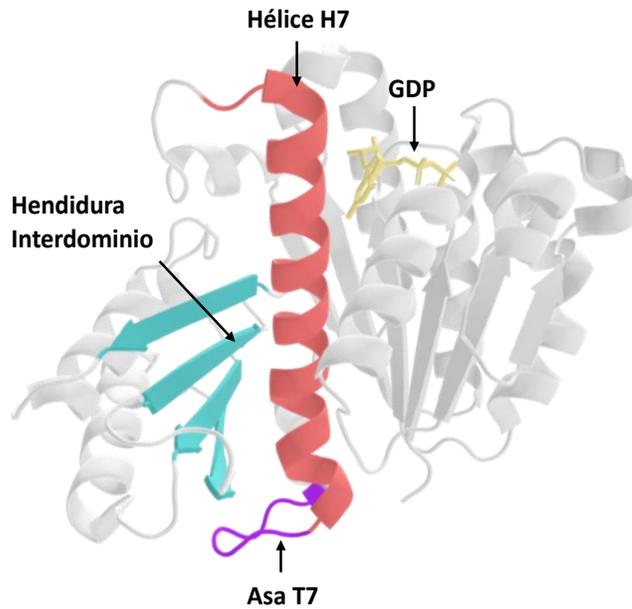


Figura 1. Estructura terciaria de FtsZ *B. subtilis* (BsFtsZ), e destacan la hélice H7 (rosa), el asa T7 (morado), el GDP (amarillo) y la hendidura interdominio que se encuentra entre las hojas beta del C-terminal (azul) y la hélice H7 (PDB: 2RHL).²²

El ensamblaje y dinámica de FtsZ en el anillo Z está regulado por la competencia entre moduladores proteicos positivos (FtsA, ZapA, y ZipA) y negativos (SulA, MinCD, y EzrA) que comparten el mismo sitio de unión en la región conservada del dominio C-terminal.^{23,24}

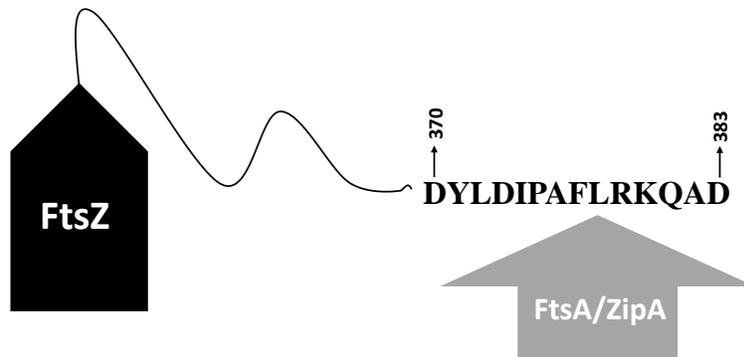


Figura 2. Secuencia de la cola C-terminal conservada involucrada en la unión de ZipA y FtsA con FtsZ.²⁴

Los reguladores positivos aumentan la polimerización y estabilizan los protofilamentos, mientras que los negativos como EzrA inhiben su polimerización.²³ El balance entre estos dos tipos de reguladores es esencial para el correcto funcionamiento de la maquinaria enzimática que permite la división celular, por lo tanto, es razonable hipotetizar que el desbalance de las funciones mediadas por estos reguladores puede conducir a la muerte celular por deficiencia en el proceso de división.²⁴ En este sentido, la búsqueda de ligantes

capaces de interactuar con los aminoácidos de la región conservada del dominio C-terminal, puede conducir a la obtención de antibióticos novedosos.²⁴

2.3 Ligantes de FtsZ

A la fecha la mayoría de los ligantes de origen natural reportados para FtsZ (escopoletina (I-2), totarol (I-3), sanginarina (I-4), plumbagina (I-5), cinalmaldehído (I-6), viriditoxina (I-7) y berberina (I-8), **Figura 3, Tabla 1**) se comportan como inhibidores de la actividad GTPasa de la proteína, con excepción de la curcumina (I-1), que incrementa la actividad de FtsZ en *E.coli*,²⁵ interfiriendo con la estabilidad y ensamblaje de los protofilamentos del anillo Z.²⁵

Es importante destacar que la mayoría de los ligantes reportados para FtsZ se han descrito principalmente en bacterias Grampositivas.²⁶ En estos estudios los principales sitios de interacción reportados son el sitio de unión a GTP que se encuentra altamente conservado debido a su papel fundamental en la polimerización, que ocurre de forma general como “cabeza-cola”,²⁷ donde la hidrólisis del GTP disminuye la interacción de la proteína con el nucleótido y en consecuencia resulta en la ruptura del protofilamento.²⁷ El sitio interdominio ubicado en la hendidura situada entre el dominio C-terminal y la hélice H7,²⁷ la mayoría de los ligantes que interaccionan en este sitio actúan como inhibidores. Este sitio es similar al sitio de unión del taxol en la tubulina.²⁷

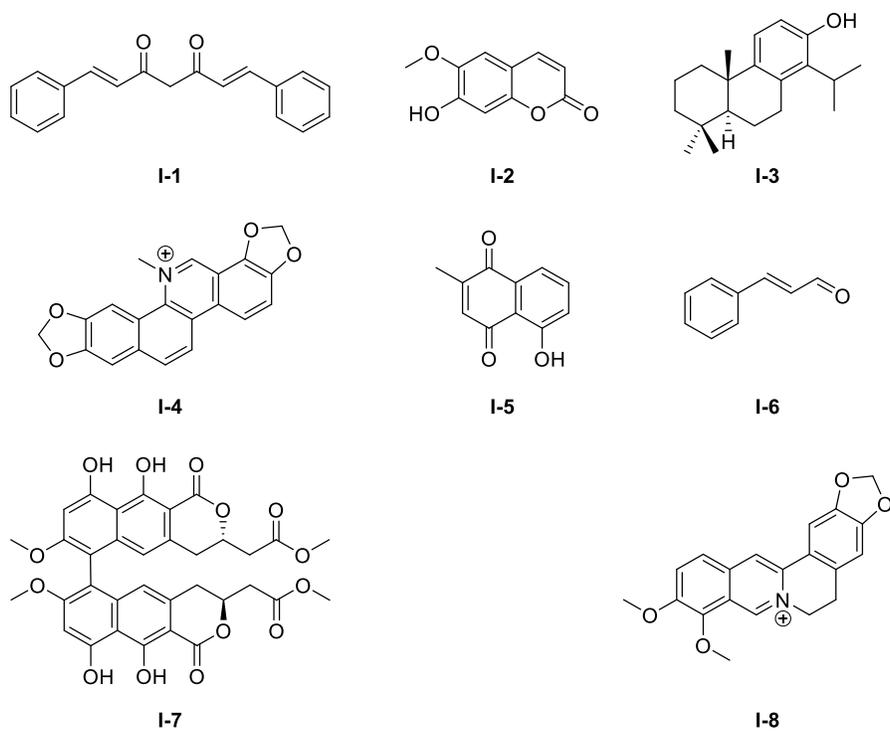


Figura 3. Estructura de ligantes de FtsZ. Curcumina (**I-1**), Escopoletina (**I-2**), Totarol (**I-3**), Sanginarina (**I-4**), Plumbagina (**I-5**), Cinalmaldehido (**I-6**), Viriditoxina (**I-7**), Berberina (**I-8**).^{4,28,29}

Tabla 1. MICs, ensayos experimentales y otras actividades biológicas presentadas por los ligantes de FtsZ de origen natural.

Clase (Figura 3)	CMI	Ensayo de inhibición de la proteína	Otras actividades biológicas	Ref.
Curcumina (I-1)	<i>B. subtilis</i> (100 µM) <i>E. coli</i> (100 µM) *Incremento de la actividad GTPasa.	EnP EnGTPasa MET	✓ AC, AB y AO.	3,4
Cinamaldehído (I-6)	<i>B. subtilis</i> (0.5 µg/ml) <i>E. coli</i> (1 µg/ml) <i>S. aureus</i> (0.25-4 µg/ml)	EnGTPasa EnP MET	✓ AB y MET.	3,4,30,31
Escopoletina (Cumarina) (I-2)	<i>M. tuberculosis</i> (42 µg/ml)	EnGTPasa EnP	✓ AC, AO, AI, APD, ACG y AN.	32
Plumbagina (I-5)	<i>M. smegmatis</i> (31 µM) <i>B. subtilis</i> (29 µM)	EnGTPasa EnP MET	✓ AF	28
Totarol (I-3)	<i>B. subtilis</i> (2 µM)	EnGTPasa EnS	✓ AP, AFy AB.	33
Sanguinarina (I-4)	<i>S. aureus</i> (20.8 µM) <i>B. subtilis</i> (20.8 µM) <i>E. coli</i> (> 333 µM) <i>K. pneumoniae</i> (16 µM) <i>A. baumannii</i> (16 µM) <i>P. aeruginosa</i> (> 333 µM)	EnGTPasa EnP MET	✓ AB y AC.	34
Berberina (I-8)	<i>B. subtilis</i> (360 µM) <i>S. aureus</i> (551 µM) <i>E. faecium</i> (>551 µM) <i>S. epidermidis</i> (128 µM) <i>E. coli</i> >1450 µM) <i>K. pneumoniae</i> (>1450 µM)	EnGTPasa EnP MET	✓ AD, AI, TEA y TSM.	35,36
Viriditoxina (I-7)	<i>S. aureus</i> (4-8 µg/ml) <i>E. faecium</i> (8-16 µg/ml) <i>S. pneumoniae</i> (16-32 µg/ml) <i>E. coli</i> (64 µg/ml)	EnGTPasa EnP	✓ PCM, AB y AC.	29

EnP: Ensayo de polimerización, EnGTPasa: Ensayo de actividad GTPasa, MET: Microscopía electrónica de transmisión, EnS: Ensayo de Sedimentación. AC:Anticancerígeno, AB:Antibacteriano, AO:Antioxidante, AI:Antiinflamatorio, APD:Antipalúdico, ACG:Anticoagulante, AN:Analgésico, AF:Antifúngico, AP:Antiplasmodial, AD:Antidiarreico, TEA:Tratamiento de enfermedades autoinmunes, TSM: Tratamiento en el síndrome metabólico, PCM: Potencial citotóxico moderado.

2.4 Ensayos para determinar la actividad GTPasa de FtsZ

La actividad GTPasa de FtsZ está determinada por la producción de fosfatos³⁷ y existen varios métodos disponibles para medir la liberación de fosfato en ensayos *in vitro*,³⁷ una de las técnicas más sensibles consiste en la precipitación ácida de un sustrato proteico que contiene fósforo ³²P, en este caso se determina la radioactividad liberada en el sobrenadante,³⁷ sin embargo, la aplicación de este protocolo tiene restricciones debido al manejo de elementos radioactivos.³⁷ Una alternativa a este ensayo consiste en emplear sustratos no radioisotópicos donde la medición del Pi liberado se hace a través de la formación de azul de molibdeno por la reducción de fosfomolibdato,³⁸ aunque este ensayo es simple y carece de sensibilidad.³⁸ Una opción para aumentar la sensibilidad a Pi del ensayo consiste en la formación de un complejo coloreado entre el molibdato acidificado y el colorante verde malaquita.³⁸

El verde de malaquita es un reactivo útil en este sentido, permitiendo la detección colorimétrica de cantidades picomolares de fosfato inorgánico debido a la formación de un complejo de verde malaquita con fosfomolibdato.³⁷ Los ensayos de verde de malaquita se han utilizado para detectar fosfato liberado de una variedad de sustratos endógenos como proteínas y lípidos.³⁸

Cuando el colorante verde malaquita forma un complejo con fosfomolibdato cambia a su absorción máxima.³⁹ Este complejo se estabiliza hasta 48 h con detergentes como Tween 20, lo que permite una fácil detección colorimétrica que es lineal con tan solo 50 a 1000 pmol y después se realiza la medición de la absorbancia a 620 nm. ³⁸

2.5 Modelado por homología

El modelado por homología es un método utilizado para predecir *in silico* el plegamiento hipotético de estructuras proteicas no resueltas experimentalmente por cristalografía de rayos X, microscopía electrónica y/o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN por sus siglas en inglés).⁴⁰ Sin embargo, es importante tener en cuenta que las predicciones de estructura pueden ser aproximadas y no siempre reflejan con precisión la estructura real de la proteína.

Las herramientas computacionales más empleadas con este propósito son I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement; modelado basado en plantillas y *ab initio*), Rossetta (*ab initio*), Robeta (*ab initio*),⁴¹ y más recientemente Alpha Fold, un programa de

inteligencia artificial (IA) que realiza predicciones utilizando sistemas de aprendizaje profundo.⁴²

I-TASSER es un programa y servidor en línea utilizado para predecir la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas.⁴³ El proceso de predicción de estructura en ITASSER involucra varias etapas.⁴⁴ En primer lugar, utiliza la técnica de "threading" para encontrar modelos homólogos conocidos que puedan servir como plantillas para la predicción, en este sentido, se parte de una perspectiva biológica, donde se afirma que proteínas homólogas tienen un ancestro común. Uno de los requisitos para emplear el modelado basado en plantillas es que la proteína diana tenga una identidad de secuencia $\geq 25\%$ con relación a una estructura molde resuelta,⁴¹ de otra manera cuando no se pueden identificar secuencias homólogas se utiliza la predicción de estructura *ab initio* (método semiempírico) que está basada en principios de mecánica cuántica.^{40,41} Posteriormente, I-TASSER utiliza el método de ensamblaje de fragmentos para generar posibles estructuras utilizando fragmentos de proteínas con estructuras conocidas.⁴⁵ Consecutivamente, se realiza un refinamiento iterativo para mejorar la precisión de la estructura final. La calidad de los modelos generados se puede evaluar empleando los gráficos de Ramachandran.⁴⁶

2.6 Diagrama de Ramachandran

Los diagramas de Ramachandran son herramientas visuales que permiten evaluar la calidad y la conformación de las estructuras tridimensionales de proteínas. Estas gráficas representan la relación entre los ángulos diedros phi (ϕ) y psi (ψ) de los aminoácidos en una proteína, que corresponden a los ángulos entre los enlaces peptídicos que conectan los C α de los aminoácidos sucesivos en la cadena polipeptídica.^{47,48}

La combinación de los ángulos ϕ y ψ determina la conformación de una proteína e indica si una región de la proteína se encuentra en una conformación estructuralmente favorable, como una hélice alfa, una lámina beta o una estructura en bucle.⁴⁸ Las gráficas de Ramachandran muestran estas combinaciones de ángulos en un gráfico bidimensional, y permiten visualizar las regiones permitidas y prohibidas en términos de energía y estabilidad.^{47,48}

En una gráfica de Ramachandran típica, las regiones permitidas corresponden a las combinaciones de ángulos diedros que no generan choques estéricos significativos ni torsiones excesivas en la estructura.^{48,49} Por otra parte, las regiones prohibidas son aquellas

donde las combinaciones de ángulos generan interacciones estéricas desfavorables o conformaciones poco probables.⁴⁹

El gráfico se divide en cuatro cuadrantes.⁵⁰ De acuerdo con las regiones sombreadas representadas en la **Figura 4**, donde el color más intenso (rojo) representa las regiones permitidas y un color más claro (blanco/ amarillo claro) representa regiones no permitidas o desfavorecidas energéticamente.⁵¹

El cuadrante ($0^\circ < \psi < 180^\circ$, $-180^\circ < \phi < 0^\circ$) es la región que contiene una mayor distribución de los ángulos ϕ/ψ más favorables. El cuadrante ($-180^\circ < \psi < 0^\circ$, $-180^\circ < \phi < 0^\circ$) es la segunda región más favorable.⁵⁰ El cuadrante ($-180^\circ < \psi < 0^\circ$, $0^\circ < \phi < 180^\circ$) representa una región donde se permiten algunas conformaciones.⁵⁰ El cuadrante ($0^\circ < \psi < 180^\circ$, $-180^\circ < \phi < 0^\circ$) es una región más desfavorecida y representa la conformación con choques estéricos.⁵⁰ Si se encuentra varios ángulos diedros en las zonas no permitidas de esta gráfica, entonces el modelo obtenido es de mala calidad e indica problemas en la estructura, mientras que una mejor agrupación en la región permitida indica un modelo de mayor calidad.⁴⁶ Por lo general se espera que la mayoría de los aminoácidos cumpla con este criterio, sin embargo, la glicina es una excepción ya que suele aparecer en regiones no permitidas,⁵² debido a que no posee una cadena lateral de carbono β ,^{53,54} lo que permite una mayor cantidad de combinaciones de los ángulos ϕ y ψ , por lo tanto, este aminoácido suele representarse con una simbología distinta ya que se espera encontrar en una zona atípica (**Figura 4A**).⁵⁴ En la **Figura 4B**, se muestra la distribución de los ángulos ϕ/ψ de la proteína FtsZ de *B. subtilis*.

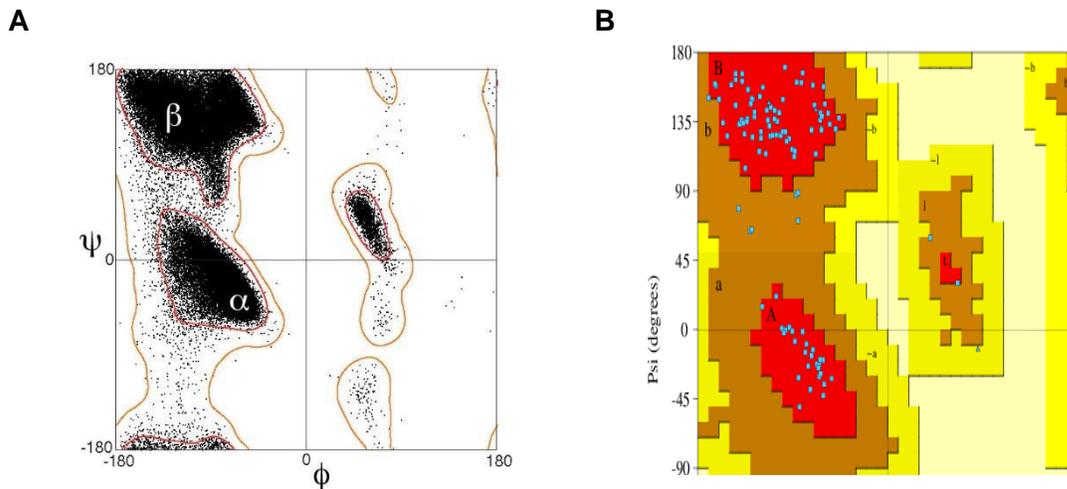


Figura 4. A) Distribución de los ángulos ϕ/ψ en un diagrama de Ramachandran convencional. B) Distribución de los ángulos ϕ/ψ de la proteína FtsZ de *B. subtilis*. El diagrama se divide en varias regiones favorecidas (rojo), permitidas (café), poco favorables (amarillo) y no permitidas (blanco/amarillo claro) (Fuente de la imagen: Diagrama de Ramachandran⁵¹ PDBSum de 2RHL (derecha) Obtenido a partir de la siguiente liga : PROCHECK summary for 2rhl (ebi.ac.uk).

2.7 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método *in silico*,⁵⁵ que permite predecir y calcular de manera teórico-computacional la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco molecular (proteico) en representación tridimensional.⁵⁵

Los resultados corresponden a la energía de afinidad dada en Kcal/mol, misma que hace referencia a la energía libre de Gibbs en la reacción de formación del complejo ligando-proteína ($P + L \rightleftharpoons PL$),⁵⁶ donde un valor negativo concierne a una reacción más estable y espontánea.⁵⁶ Esto está directamente relacionado con la estabilidad y especificidad de la unión entre el ligando y la diana terapéutica. Este método bioinformático es un gran auxiliar en el descubrimiento de nuevos principios activos o fármacos, contribuye en el ahorro de tiempo y recursos económicos para optimizar los gastos experimentales, ya que permiten estudiar un gran número de compuestos virtualmente, aumentando la probabilidad de éxito en el descubrimiento de moléculas líder.⁵⁶

3.- JUSTIFICACIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un problema de salud pública de ámbito mundial, con una tasa de crecimiento que aumenta cada año y de continuar así, se posicionará como la causa principal de muerte para el año 2050, causando hasta 10 millones de muertes.¹ Estas cifras son alarmantes, por ello, la OMS generó una lista que incluye a las bacterias clínicamente más relevantes de acuerdo con su perfil de resistencia y las clasificó en tres categorías: crítica, elevada y media.^{1,2} Entre las críticas, se destaca *Acinetobacter baumannii* que es una amenaza a nivel mundial y es la principal responsable del incremento de la tasa de mortalidad asociada a la resistencia a los antimicrobianos en México.¹⁰

Por otra parte, esta misma organización exhortó a la comunidad científica al estudio integral de los mecanismos que gobiernan el fenómeno de la RAM y al desarrollo de nuevos antibióticos con mecanismos de acción novedosos que den solución a esta problemática.¹ Actualmente, uno de los blancos farmacológicos más promisorios para el desarrollo de antibióticos de nueva generación consiste en atacar las proteínas que conforman el divisoma bacteriano.⁵⁷ Entre estas proteínas sobresale FtsZ, una diana atractiva por el papel esencial que cumple en la división celular. En particular, *AbFtsZ* es un reto vigente para las investigaciones actuales ya que a la fecha no existen reportes de su estructura cristalográfica, limitando el acceso a la búsqueda y desarrollo de moléculas que alteren su función correcta.¹⁸

En este sentido, la aplicación de métodos computacionales como el cribado virtual disminuyen los costos ligados a la identificación de *hits* y aumentan la probabilidad de éxito.⁵⁸

En atención a las recomendaciones de la OMS y la disponibilidad de herramientas tanto computacionales (*docking*) como de infraestructura que permite la realización de evaluaciones experimentales *in vitro*, surge el presente trabajo de investigación, que tiene por objetivo identificar ligantes de la proteína *AbFtsZ* con potencial antibacteriano frente a *A. baumannii* multirresistente.

4.- HIPÓTESIS

El cribado virtual basado en acoplamiento molecular de una colección de moléculas de origen fúngico contra un modelo de la proteína *AbFtsZ*, permitirá priorizar el estudio de moléculas como posibles ligantes de la enzima y seleccionar las más apropiadas para su evaluación *in vitro*.

5.-OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar ligantes de la proteína *AbFtsZ* con potencial antibacteriano frente *A. baumannii* multirresistente utilizando estudios de cribado virtual y ensayos *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

- Construir una base de datos de productos naturales de origen fúngico para realizar el cribado virtual.
- Generar un modelo por homología de la estructura terciaria de *AbFtsZ* para los estudios *in silico* de interacción ligante-proteína.
- Identificar *hits* potenciales como ligantes de *AbFtsZ* por medio de acoplamiento molecular.
- Comprobar el efecto sobre la actividad enzimática de *AbFtsZ* de cada uno de los *hits*, mediante un ensayo *in vitro*.
- Determinar el potencial antibacteriano de los *hits* en un modelo de inhibición del crecimiento de *A. baumannii*.

6.-MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Todos los reactivos empleados en este trabajo se obtuvieron de alguno de los siguientes distribuidores, Sigma-Aldrich, Merck, Fermont, JT Baker y se emplearon directamente.

6.2 Análisis bioinformático de la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* (*AbFtsZ*).

Se utilizaron 137 secuencias de FtsZ pertenecientes a diferentes especies de 10 géneros, entre ellos, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Escherichia*, las secuencias se obtuvieron del GenBank y el árbol filogenético se realizó utilizando el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis).

6.3 Método *in silico*. Estudios de acoplamiento molecular

6.3.1 Proteína *AbFtsZ*, obtención del modelo por homología

Se utilizó una estrategia de predicción de estructura *in silico* para obtener la estructura 3D más adecuada de la enzima *AbFtsZ* usando la secuencia de aminoácidos mostrada en la **Figura 5**, esta secuencia se obtuvo después de clonar y amplificar el gen de la proteína de *A. baumannii* A564 (comunicación personal, M. en C. Karol Carrillo Jaimes).

```
MGSSHHHHHSSGENLYFQGHMASFEFIEDELNDGNGQARFTVFGVGGGGGNAVQHMVQSD
IQGVKFCANTDKQALDCMNAPFKIQLGEGSTRGLGAGANPEVGQVAAEESREIIRQHLEGTDM
VFVTAGMGGGTGTGAAPVVAEVAKEMGILTGVVTTTPFNFEGRRRQKSAERGIEALEAHVDSLII
IPNQRLLSVYGDISMKDAYKKADDVLLNAVRSIFDLVVNRGHINLDFADLKTAMSTRGYAMMGAG
LGRGEDRARQAAEQAIRSPLLDNVNIINAKGVLINITGGDDITLRETEIITDVVNQIVDLDEGEIFYG
TVFDPDARDELRVTVIATGLTRNAADAEPKRKRNTVSHTSTQSAQSVDEDDVPAINKRQNAENDV
NNAPSSTPRSSPMSIQDYLNQQRK
```

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de *AbFtsZ*.

La secuencia de aminoácidos se guardó en formato FASTA para realizar una búsqueda de secuencias homólogas. La búsqueda se realizó utilizando el servidor BLASTP. Por su parte, el modelo tridimensional para la proteína se construyó utilizando el servidor en línea I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>, último acceso 22 noviembre 2022). El modelo generado se validó utilizando el programa PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>, último acceso 22 de noviembre 2022).

6.3.2 Construcción de la base de datos y preparación de los ligandos

Se construyó un base de datos que alberga 144 metabolitos secundarios de origen fúngico de distintas clases estructurales, incluyendo policétidos, alcaloides, péptidos no ribosomales, derivados del ácido siquímico y compuestos de biogénesis mixta.

Todos los compuestos contenidos en la base de datos se optimizaron utilizando un campo de fuerza de mecánica molecular y se guardaron en el formato adecuado para su uso en la interfase MGLTools de la suite de AutoDock (<https://autodocksuite.scripps.edu/adt/>, último acceso 2 de mayo del 2022)

6.3.3 Acoplamiento molecular (AM, Docking)

Los cálculos de acoplamiento molecular se ejecutaron en AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>, último acceso 2 de noviembre de 2023). Para ello, se generaron los archivos.pdbqt tanto para los ligantes como para la proteína. Las dimensiones del espacio de búsqueda se establecieron como $x = y = z = 126$ puntos separados por 0.325 Å, para asegurar la completa cobertura de la proteína. Las conformaciones de interacción ligante-proteína se generaron utilizando Vina. La exhaustividad de búsqueda se estableció en ocho y el rango de energía se definió en 3 Kcal/mol.

6.4 Evaluación de los cambios de actividad GTPasa de la enzima *AbFtsZ*

La evaluación de la activación/inhibición de la enzima se realizó siguiendo el protocolo reportado por Lutkenhaus *et al.*, 1998,⁵⁹ Quan *et al.*, 2005,⁶⁰ y Martín *et al.*, 2012,⁶¹ con algunas modificaciones. Brevemente, el ensayo se realizó en placa de 96 pozos, empleando una solución amortiguadora de Tris-50 mM, KCl-200 mM, MgCl₂-2.5 mM a pH 7.0; GTP como sustrato (50 µM), la enzima FtsZ (4 µM) y las moléculas a evaluar (500 µM en DMSO). Después, la placa se incubó por 30 minutos a 37 °C, transcurrido este tiempo se adicionó una solución de verde de malaquita (Verde de malaquita 79 %, Molibdato 20 %, Tween 1 %), e inmediatamente se registró la absorbancia a 630 nm en un lector de placas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, empleando como control positivo la berberina (500 µM) y DMSO como control negativo. Los resultados de actividad se calcularon con la **ecuación 1** y se expresan en porcentaje (%).

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\Delta Abs_{\text{tratamiento}}}{\Delta Abs_{100\% \text{ Actividad}}} \times 100$$

$$\Delta Abs_{\text{tratamiento}} = Abs_{\text{Molécula}} - Abs_{\text{blanco}}$$

$$\Delta Abs_{100\% \text{ Actividad}} = Abs_{100\% \text{ Actividad}(DMSO)} - Abs_{\text{blanco}(DMSO)}$$

Ecuación 1

6.5 Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano

Este ensayo se realizó siguiendo medidas estrictas de seguridad en un laboratorio de bioseguridad nivel II (LBSII). Para este ensayo se siguió la metodología reportada por la norma del CLSI (*Clinical Laboratory Standar International*) (<https://clsi.org/>, último acceso 2 de noviembre de 2023). Este ensayo tiene una duración aproximada de 3 días, la cepa *A. baumannii* A564 es un aislado intrahospitalario (Instituto Nacional de Pediatría) y panresistente, y se encuentra conservada a una temperatura de -80 °C. Un cristal de la bacteria se sembró en caldo MH estéril y se incubó por 18-24 h a 37 °C. Este ensayo es un método de microdilución en placa de 96 pozos que emplea caldo MH, la molécula a evaluar (2.5 mM-DMSO) o el control positivo (gentamicina 100 ppm), y una suspensión bacteriana previamente ajustada a 0.5 unidades de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), equivalente a 0.08-0.13 unidades de densidad óptica (600 nm). Brevemente, en una placa de 96 pozos se mezclaron 88 µL de caldo MH, 2 µL de la solución de la molécula de prueba en DMSO, DMSO al 2% o bien el control positivo y 10 µL de la suspensión bacteriana e inmediatamente se registró la densidad óptica (D.O) de la suspensión a una λ de 600 nm ($A_{t=0}$), seguidamente la placa se incubó a 37 °C por 24 horas ($A_{t=24}$). Transcurrido el tiempo de incubación se registró una segunda lectura de D.O a la misma λ . Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición y se calculan de acuerdo con la **ecuación 2**. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo los controles de esterilidad, el control negativo (DMSO) y el control positivo.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{\Delta Abs_{\text{muestra}}}{\Delta Abs_{100\% \text{ crecimiento}}} \right) \times 100$$

$$\Delta Abs_{\text{muestra}} = Abs_{\text{muestra } t=24} - Abs_{\text{muestra } t=0}$$

$$\Delta Abs_{100\% \text{ crecimiento}} = Abs_{\text{suspensión bacteriana } t=24} - Abs_{\text{suspensión bacteriana } t=0}$$

Ecuación 2

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación de mayor alcance que tiene como objetivo principal el descubrimiento de agentes antimicrobianos que sirvan como prototipo estructural para el desarrollo de antibióticos de nueva generación. Particularmente, en este estudio se abordó la búsqueda de ligantes dirigidos a la enzima FtsZ de *Acinetobacter baumannii* A564, un blanco molecular novedoso sin estudios previos en la literatura.

7.1 Estudio bioinformático de la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* (AbFtsZ)

El estudio comenzó con un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína FtsZ de distintas especies de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Escherichia*. Para ello se recopilaron 137 secuencias proteicas, se alinearon y posteriormente se construyó un cladograma (árbol filogenético no enraizado, **Figura 6**), con la finalidad de establecer la relación evolutiva en la secuencia de esta proteína en cada especie analizada y determinar la utilidad de esta proteína como blanco farmacológico.

El resultado de este análisis mostró una diferencia clara entre la secuencia de aminoácidos de la proteína FtsZ de microorganismos Grampositivos y Gramnegativos, con identidades que oscilan entre el 40 % y 50 %. Dentro de los microorganismos Gramnegativos las secuencias se agruparon en seis clados distintos, uno para cada género. En particular, todas las especies de *Acinetobacter* se agrupan en un solo clado, evidenciando la diferencia en la secuencia de aminoácidos en comparación con otros microorganismos. Resulta evidente que *A. baumannii* muestra diferencias relevantes en el grado de conservación de la secuencia de FtsZ con respecto a las demás especies del mismo género, contribuyendo de esta manera a su alta resistencia a los antimicrobianos y brindando una oportunidad para el desarrollo de moléculas selectivas contra esta especie. De acuerdo con lo descrito en la literatura, *A. baumannii* es una de las bacterias de mayor importancia clínica^{12,13} y es uno de los agentes más recurrentes en infecciones nosocomiales. Esta bacteria es miembro del grupo ESKAPE,⁹ y su alto grado de resistencia la clasificó como prioridad alta para el desarrollo de antibióticos de acuerdo con los comunicados de la OMS.² Sus principales mecanismos de resistencia son los cambios en la permeabilidad de su membrana, la expresión de numerosas bombas de extrusión y la formación de biopelículas.¹¹

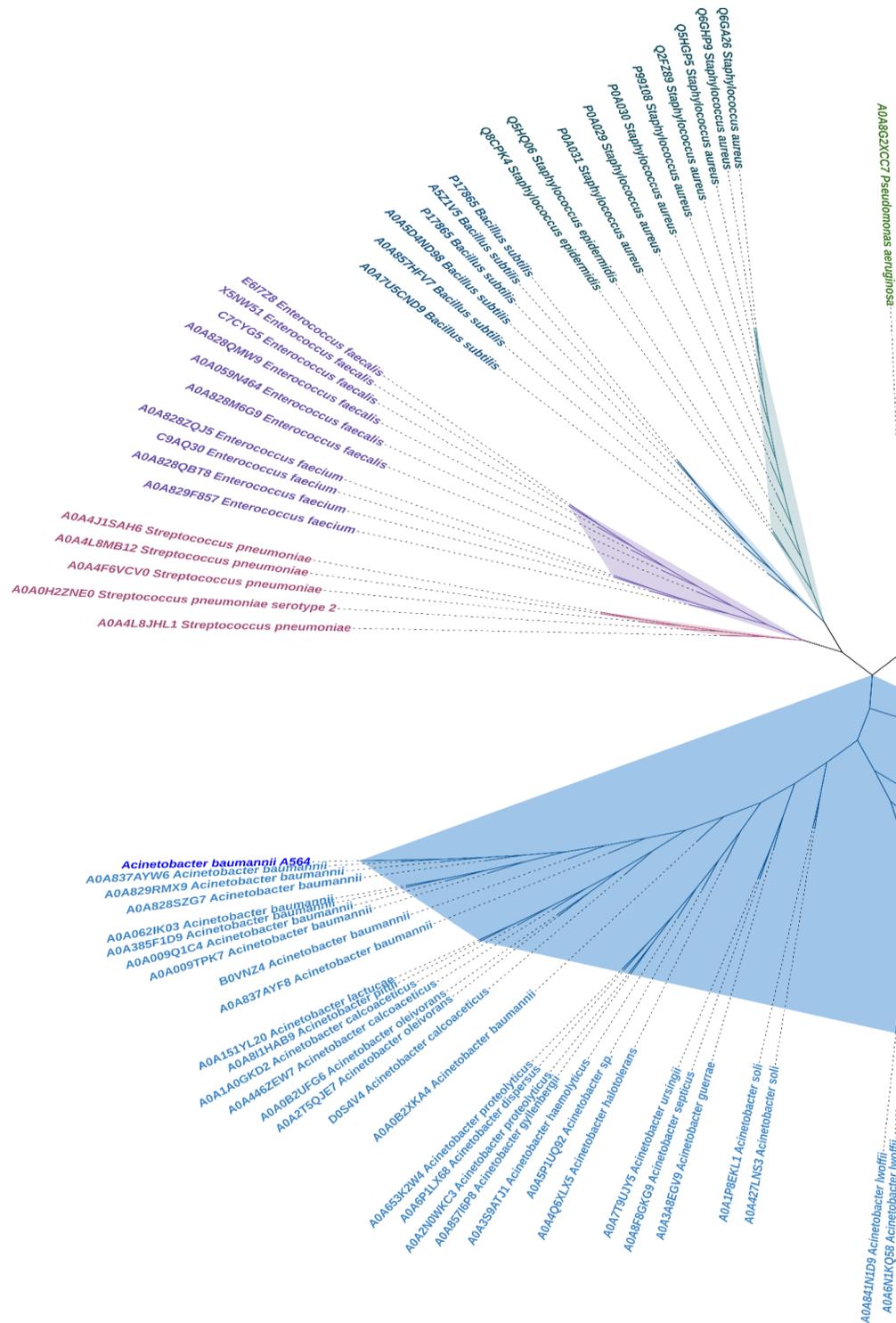
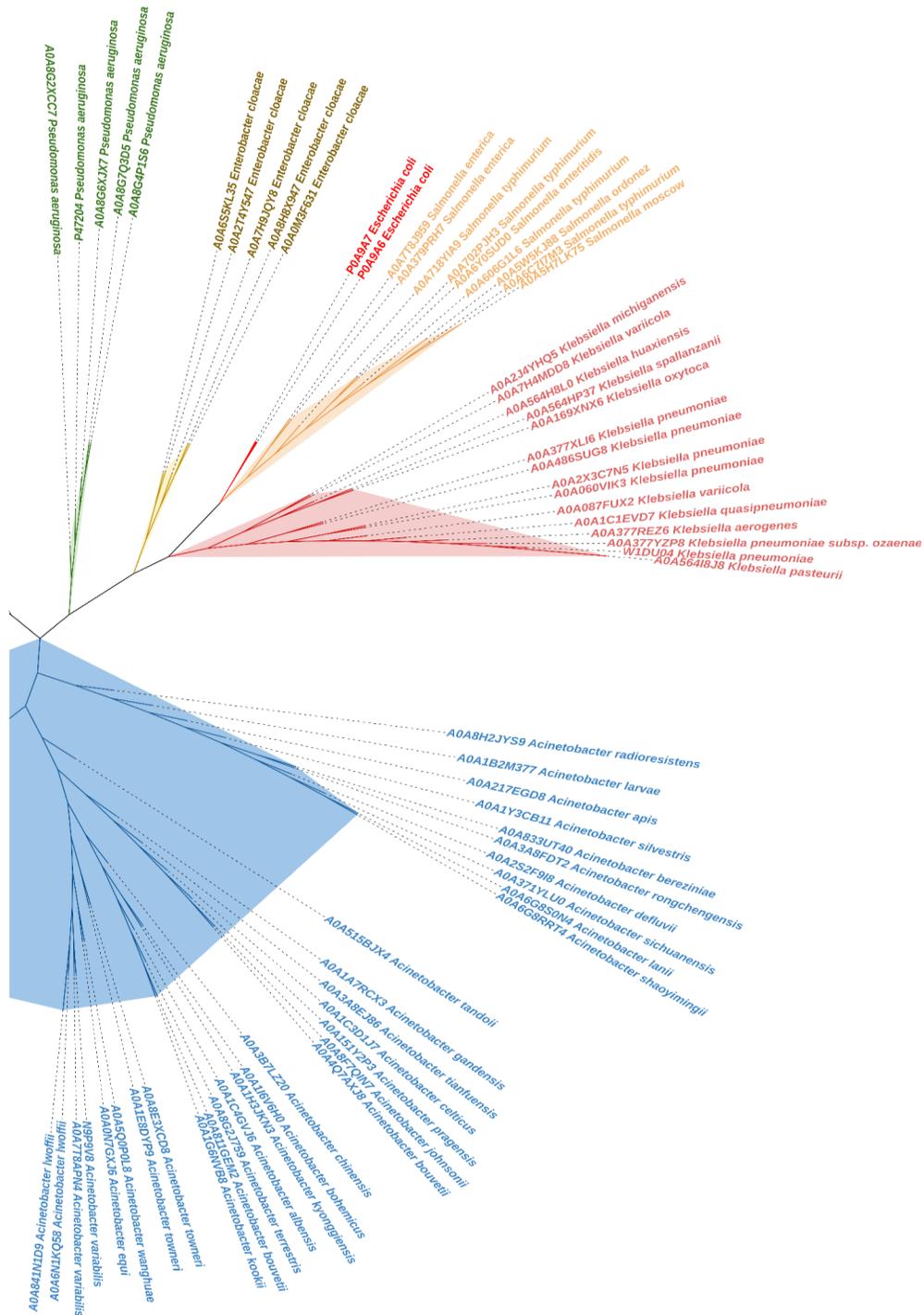


Figura 6. Filogenia de FtsZ, incluye 137 secuencias de 10 géneros distintos. Análisis evolutivo por el método de Máxima Verosimilitud. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo basado en la matriz JTT. Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-8111,63) no enraizado. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por



pares estimadas mediante el modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 0,5117)). Este análisis involucró 137 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95 % de cobertura del sitio.

7.2 Obtención del modelo proteico de *AbFtsZ* por homología

Hasta el momento no existe una estructura cristalográfica de *AbFtsZ*. Para obtener información sobre la estructura de la proteína y dirigir la investigación hacia el descubrimiento de moléculas moduladoras de su actividad, se construyó un modelo por homología usando el servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>, último acceso noviembre 2022).⁴⁴

Esta plataforma permite construir modelos 3D para estructuras proteicas sin reportes cristalográficos en el banco de datos de proteínas (PDB por sus siglas en inglés). El modelo 3D de *AbFtsZ* se ensambló utilizando 10 estructuras con un TM-score > 0.674, los códigos PDB de cada estructura y su valor de TM son los siguientes: 1W59 (0.829), 2R6R1 (0.741), 2RHL (0.737), 2VAW (0.730), 1RLU (0.721), 6UMK (0.696), 2BTQ (0.686), 4B46 (0.677), 6KPP (0.674), 3CB2 (0.674). TM-score es una métrica que evalúa la similitud topológica de estructuras de proteínas, el valor oscila entre cero y uno, donde un valor de 1.0 indica una similitud del 100 % entre dos estructuras, si el valor de TM es mayor a 0.5, entonces la probabilidad de que las estructuras pertenezcan a la misma familia topológica es de 37%, pero si TM es mayor a 0.6 la probabilidad aumenta al 80%.⁶²

Posteriormente, el servidor generó cinco modelos, la precisión de éstos se midió empleando la puntuación C (valor de confianza del modelo) que fluctuó entre -1.08 y -3.48 (**Figura 7**). La puntuación C estima la calidad de los modelos proteicos predichos por I-TASSER y está basado en las alineaciones de los templados, el puntaje C se encuentra entre -5.0 y 2.0 y se considera que un modelo con puntaje C mayor a -1.5 tiene una topología correcta.⁴³ Los resultados de este análisis permitieron seleccionar el modelo 1 (valor de C -1.08) como el más adecuado para continuar con los estudios moleculares de interacción ligante-proteína.

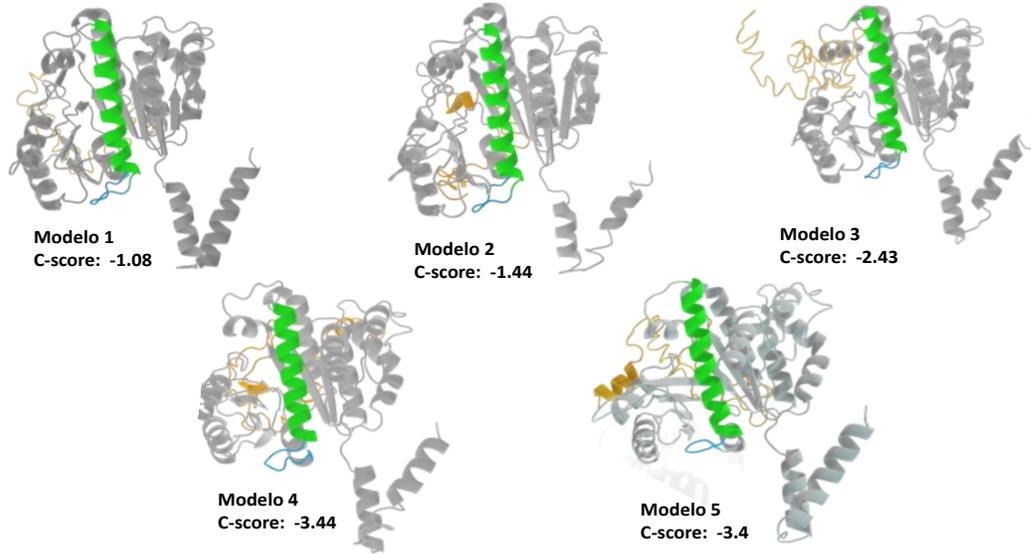


Figura 7. Predicciones obtenidas por homología a través de I-TASSER para el modelo proteico de *AbFtsZ*, en cada modelo se muestra la puntuación C-score, en naranja se destaca la región C-terminal, en verde la hélice H7 y en azul el asa T7.

Posteriormente, el modelo 1 se minimizó energéticamente empleando cálculos de dinámica molecular para optimizar la geometría de los aminoácidos (**Figura 8**). Subsecuentemente, la estructura minimizada se validó con el servidor PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu>, último acceso noviembre 2022).⁶³



Figura 8. Modelo tridimensional de *AbFtsZ* obtenido a través de la optimización del modelo 1 (I-TASSER) utilizando dinámica molecular. Se resaltan el asa T7 en color azul, la hélice H7 en verde y la región C-terminal en naranja.

El diagrama de Ramachandran (**Figura 9**) para el modelo minimizado se generó en PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu>, último acceso noviembre 2022) , en este diagrama se observan los ángulos de torsión ϕ y ψ . En concreto el ángulo ϕ describe la rotación entre los átomos de N y el C α , mientras que el ángulo ψ describen la rotación entre el C α y el C del enlace peptídico.⁴⁹ Este análisis permite identificar si los ángulos resultantes en la proteína propuesta a través del modelo por homología cumplen con ángulos estéricamente correctos.⁴⁹

En el diagrama de Ramachandran se observa que la mayor parte de los residuos (98.5 %) se encuentran en las regiones permitidas del gráfico, corroborando que el modelo generado por I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>, último acceso noviembre 2022) y minimizado a través de dinámica molecular es adecuado para su posterior uso en estudios de acoplamiento molecular. Esta información se corroboró mediante el cálculo del parámetro ERRAT (<https://saves.mbi.ucla.edu>, último acceso noviembre 2022) (91.9 %), que mide la calidad del modelo en función de las interacciones no covalentes entre C, N y O en el esqueleto de la proteína.⁶⁴

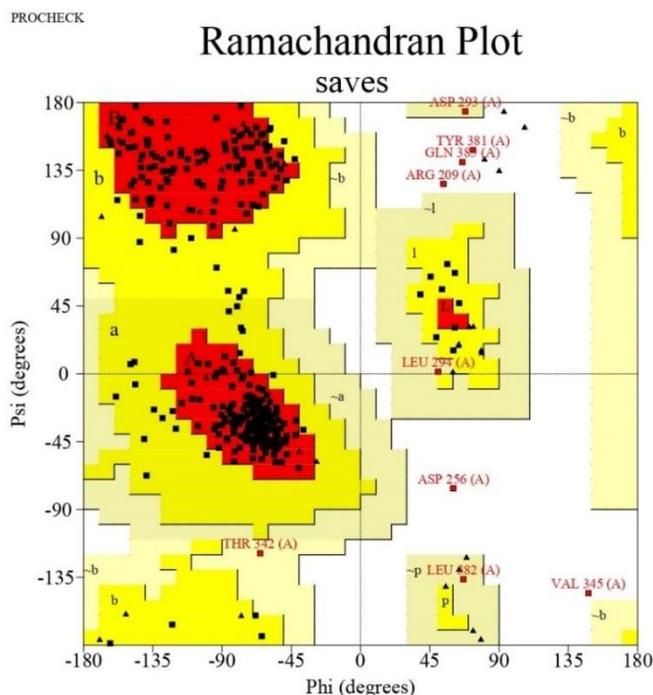


Figura 9. Gráfico de Ramachandran obtenido mediante PROCHECK para el modelo proteico 3D de AbFtsZ

Tabla 2. Análisis de la distribución de los residuos de aminoácidos de AbFtsZ, en el gráfico de Ramachandran (**Figura 9**) enfatizando las zonas permitidas y no permitidas, y excluyendo el análisis de residuos de prolina y glicina.

	Cantidad	Porcentaje
Residuos en la región más favorable [A,B,L]	284	84.5%
Residuos en regiones permitidas adicionales [a,b,l,p]	43	12.8%
Residuos en regiones generosamente permitidas {~a,~b,~l,~p}	4	1.2%
Residuos en regiones no permitidas	5	1.5%
Número de residuos exceptuando a prolina y glicina	336	100%
Número de residuos terminales excluyendo Glicina y Prolina.	2	
Número de residuos de glicina (se muestran como triángulos)	38	
Número de residuos de prolina	12	
Número total de residuos	388	

7.3 Construcción de una base de datos de metabolitos secundarios de origen fúngico para su evaluación como moduladores de la actividad de AbFtsZ

La naturaleza se considera una fuente importante de quimiotipos biológicamente activos,⁶⁵ útiles como prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos potenciales.⁶⁵ En un estudio bibliográfico realizado por Newman y Cragg se reportó que entre los años 1981 y 2019 cerca del 48% de los compuestos antibacterianos aprobados para su comercialización tenían una estrecha relación con los productos naturales.⁶

Entre los productos naturales, los de origen fúngico destacan por sus propiedades antibacterianas.⁶ Uno de los compuestos más destacados es la penicilina, aislada de *Penicillium rubens* en 1929 por Alexander Fleming,⁶⁵ y posteriormente las cefalosporinas, aisladas de cepas de *Cephalosporium*.⁶⁶ Otros ejemplos relevantes de moléculas de origen fúngico que han dado origen a molécula con aplicación en la terapéutica contemporánea son la pravastatina un potente inhibidor de la biosíntesis del colesterol en humanos,⁶⁷ la mirocina que dio origen al fingolimod, el primer tratamiento oral para la esclerosis múltiple,⁶⁷ la anidulafungina (prescrita para el tratamiento de candidiasis) obtenida por semisíntesis a partir de un producto de fermentación de *Aspergillus nidulans*,^{67,68} la fumagilina aislada de *Aspergillus fumigatus*⁶⁹ utilizada en el tratamiento de la microporidiosis.⁶⁹ Entre otros fármacos se encuentra el taxol producido por el hongo endófito *Taxomyces andreanae* presente en el árbol *Taxus brevifolia*.⁷⁰ Es importante destacar que en la última década cerca de la mitad de los metabolitos fúngicos descubiertos tienen origen en hongos

endófitos y la proporción de nuevas estructuras químicas producidas por estos organismos es mayor con respecto a los hongos aislados del suelo.⁶

En este contexto, esta investigación se enfocó en explorar la capacidad de unión de metabolitos secundarios fúngicos con la enzima *AbFtsZ*. El estudio comenzó con la construcción de una base de datos que alberga 144 moléculas de origen fúngico (ascomicetos del subfilo Pezizomycotina) incluyendo metabolitos secundarios y derivados semisintéticos con esqueletos carbonados diversos, por ejemplo, policétidos, alcaloides, péptidos no ribosomales, derivados del ácido siquímico y compuestos de biogénesis mixta. Los compuestos **1-9** de la base de datos corresponden a xantonas preniladas, **10, 12, 13, 16 y 17** son butirolactonas, **11, 14, 15, 24 y 107** son meroterpenoides. Los compuestos **18-23** son alcaloides. **25-27 y 33** son péptidos fusionados que dan origen a dicetopiperazinas. Los compuestos **28-30** son indolterpenoides. Las sustancias **31 y 32** son bases nitrogenadas. **34 y 35** son peptaiboles, **36 y 37** son péptidos no ribosomales, **38-42** son lipopéptidos. El producto **43** es un derivado del ácido antranílico. Las sustancias **44** es un derivado semisintético de un péptido no ribosomal, las sustancias **45, 46, 50 y 51** son butirolactonas semisintéticas, mientras que **52-73** son fenalenonas diméricas obtenidas por semisíntesis. Los compuestos **74-105, 108-129 y 131-144** son policétidos de distintas clases estructurales, por ejemplo, azafilonas, xantonas, antraquinonas, pironas, cromenos, tetraciclinas, decalinas, etc., y los productos **106 y 130** son metabolitos de biogénesis mixta. (Figura 10-13).

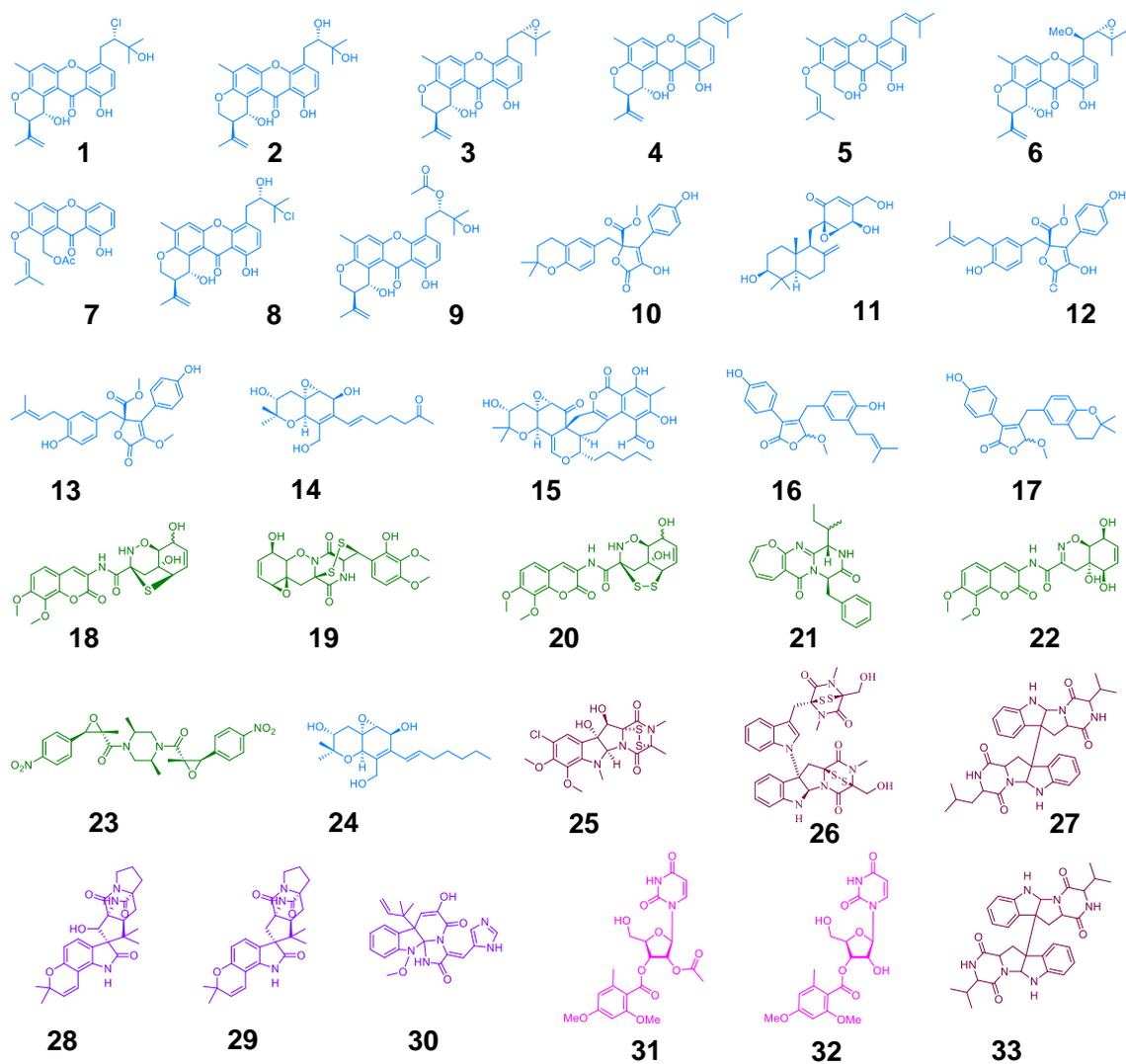


Figura 10. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (1-33) La clasificación consistió en: meroterpenoides (azul claro), alcaloides (verde oscuro), dicetopiperazinas (vino), indolterpenoides (morado) y derivados de bases nitrogenadas (rosa).^{71,72}

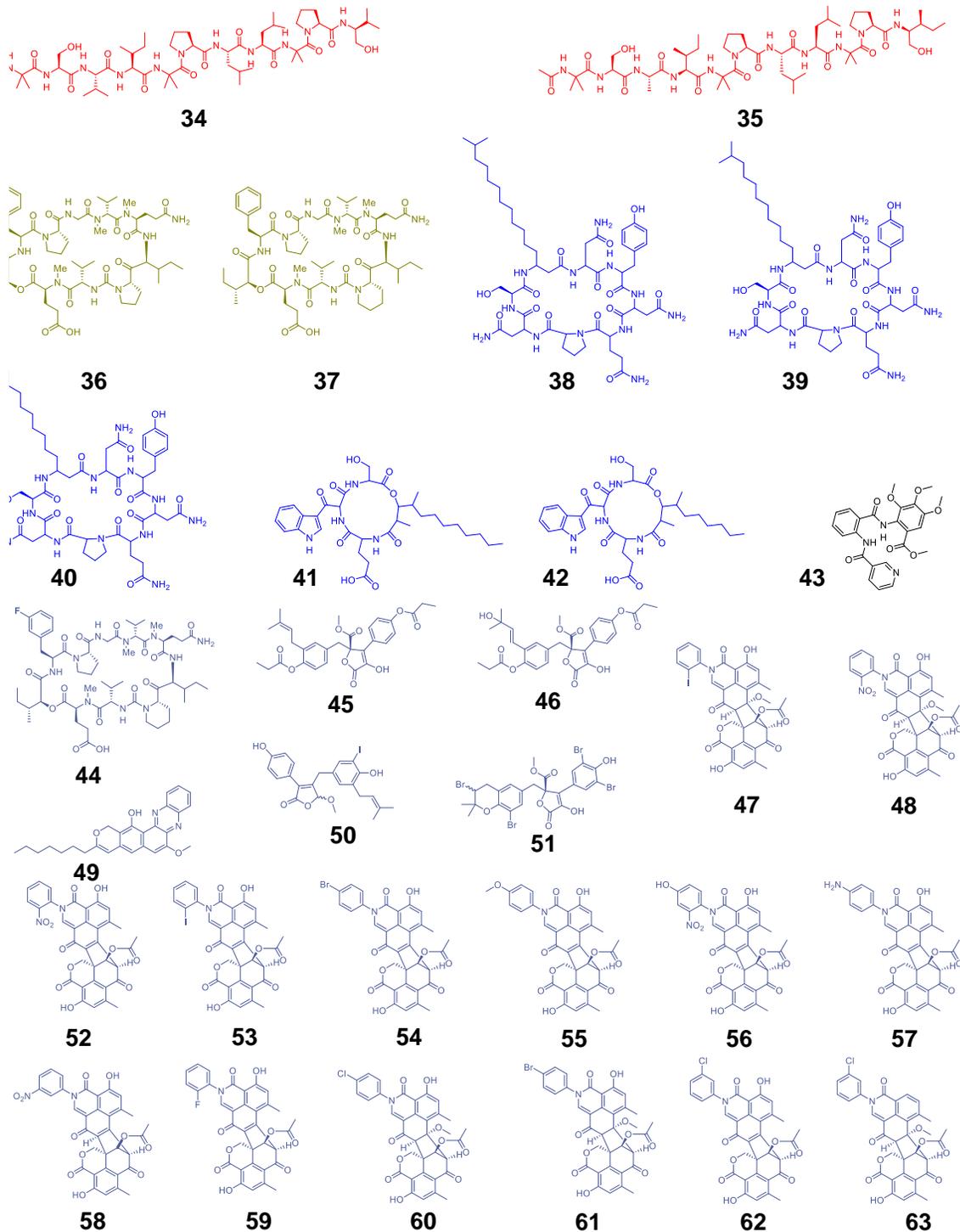


Figura 11. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (34-63). La clasificación consistió en: Peptaiboles (rojo), péptidos no ribosomales (verde olivo), lipopéptidos (azul rey), derivado de ácido antranílico (negro) y derivados semisintéticos (azul petróleo).⁷³

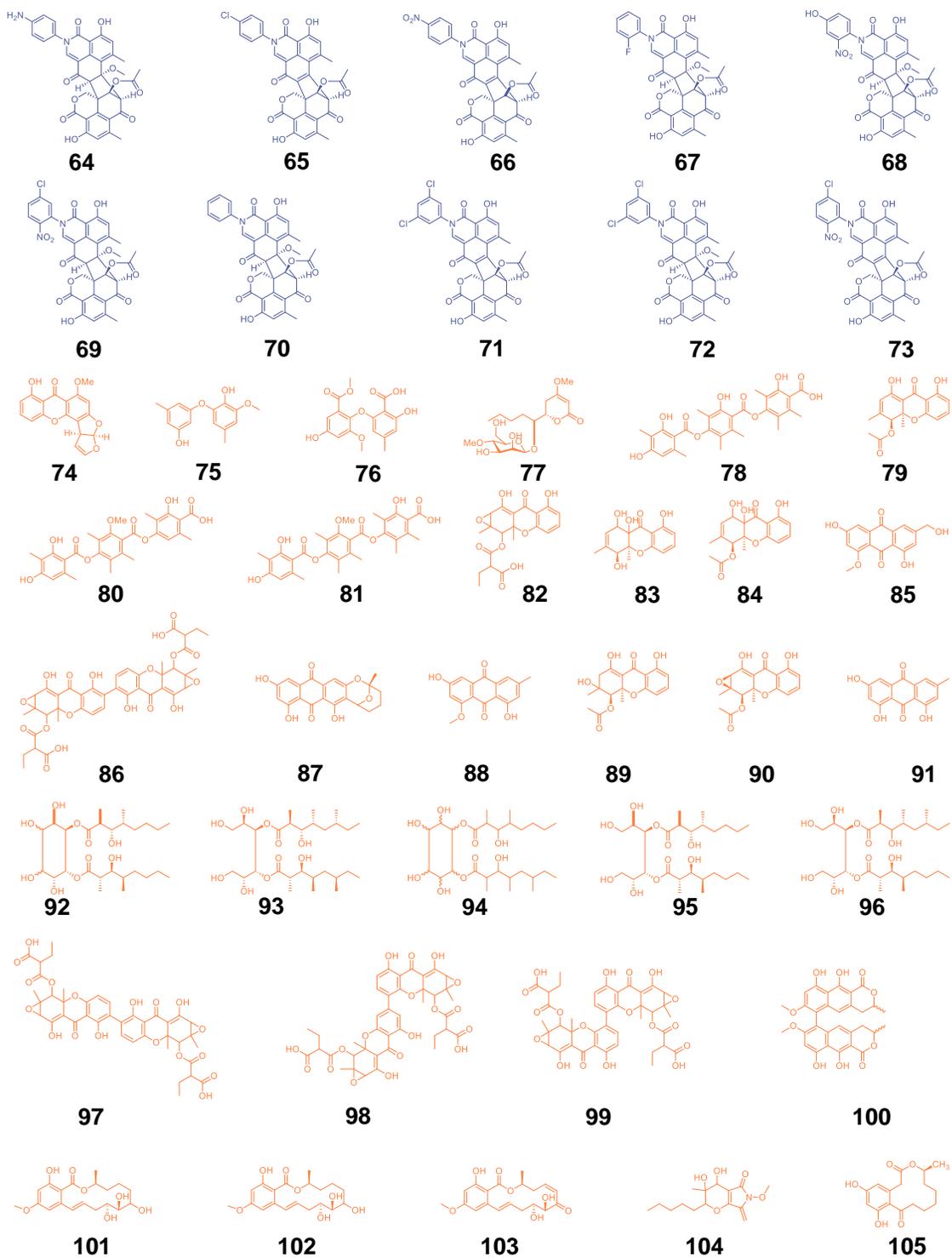


Figura 12. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (64-105) La clasificación consistió en: derivados semisintéticos (azul petróleo) y policétidos (naranja).^{73,74}

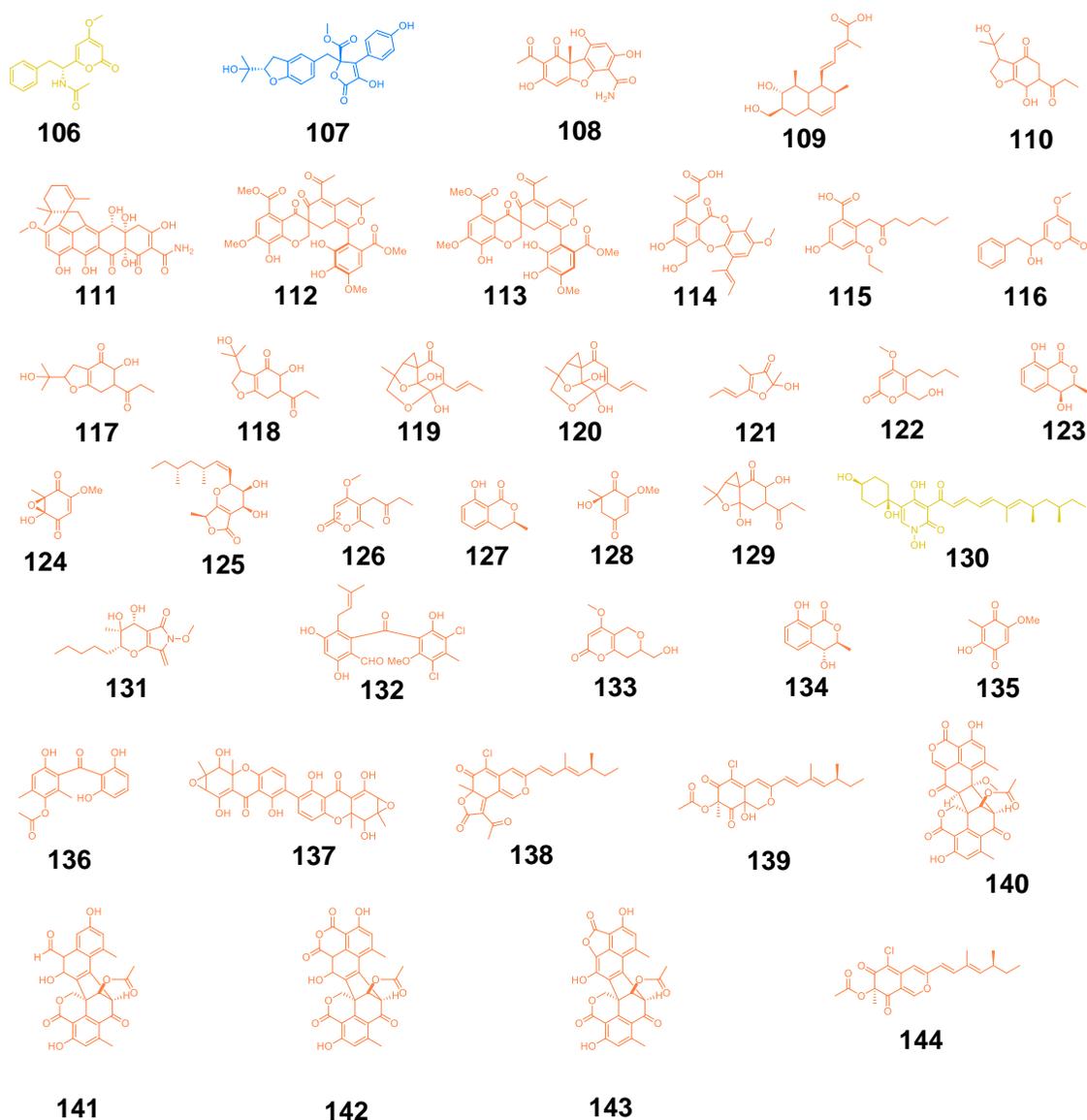


Figura 13. Estructura y clasificación de las moléculas incluidas en la base de datos. (106-144) Meroterpenoides (azul), policétidos (naranja) y biogénesis mixta (dorado). ⁷⁴

7.4 Estudios de acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional que predice la interacción de dos moléculas, generando un modelo de unión.⁵⁶ Entre sus diversas aplicaciones, facilita las tareas involucradas en el descubrimiento de moléculas prototipo para el desarrollo de fármacos, identificando las determinantes estructurales necesarios para la unión eficiente ligando-receptor.⁵⁶ Los enfoques pueden clasificarse en métodos basados en ligando o basados en estructura.⁵⁶ Estos últimos se apoyan de información que se deriva del conocimiento de la estructura 3D del blanco de interés, y permite priorizar el estudio de

Los resultados teóricos de la energía de afinidad obtenidos para cada ligante son una predicción de la fuerza de interacción intermolecular resultado de la reacción $P + L \rightleftharpoons PL$; que da lugar a la formación del complejo ligando-proteína.⁵⁶ La energía de afinidad que se obtiene como resultado del acoplamiento molecular hace referencia a la energía libre de Gibbs de la misma reacción, donde un valor negativo corresponde a una reacción más estable y espontánea.⁵⁶

En este proyecto los valores obtenidos para cada acoplamiento permitieron asignar un orden de prioridad y seleccionar los posibles ligantes de *AbFtsZ*. Sin embargo, fue necesario establecer una referencia como punto de partida. Con este propósito se utilizó la energía de unión del acoplamiento con la berberina (**I-8, Figura 3**) un inhibidor experimental de FtsZ en otras especies,^{75,76} que, además, se ha utilizado en estudios de acoplamiento molecular, donde se identificó que el sitio de unión teórico es el sitio de unión a nucleótidos sobre *MtbFtsZ*.¹⁷

El acoplamiento *AbFtsZ*-berberina (**I-8**) arrojó como resultado que el sitio de interacción es muy cercano al asa T7 con una energía de unión de -7.5 Kcal/mol. (**Figura 15**), Las fuerzas que gobiernan la interacción son interacciones de Van der Waals y puentes carbono-hidrogeno. Los aminoácidos que participan en el acoplamiento son: Asn₁₂, Asp₁₃, Asn₁₅, Gly₁₆, Gln₁₇, Ala₁₈, Arg₁₉, Ap₁₀₃, Asp₂₁₅, Val₂₀₆ Val₂₀₇ Arg₂₀₉ Ala₂₁₇ Lys₂₂₀, Phe₂₁₆.

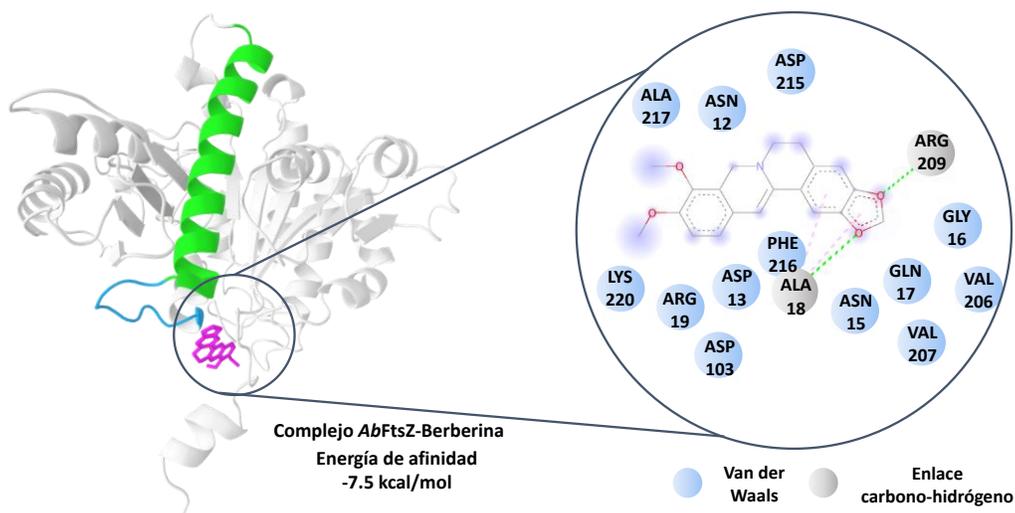


Figura 15. Complejo proteico formado entre berberina (rosa) y *AbFtsZ*, se destacan los aminoácidos y el tipo de interacciones en el sitio de unión. Adicionalmente se resalta en la enzima la hélice H7 (verde), el asa T7 (azul) y la región de C-terminal en naranja.

Para el modelado molecular de los ligantes contenidos en la base de datos se realizó un *docking* ciego en una caja con dimensiones $x = y = z = 126$ puntos separados por 0.325 \AA para asegurar la completa cobertura de la proteína. Tras los estudios de acoplamiento se identificaron cuatro zonas de interacción señaladas con los números 1, 2, 3 y 4 (**Figura 16**) entre los 144 ligantes y la enzima. Las zonas de las que ya se tiene reporte previo en la literatura son el sitio de unión a GTP o también conocido como sitio de unión a nucleótidos⁵ y la hendidura interdominio ubicada entre la hélice H-7 y las hojas β del amino terminal.⁵

Cabe destacar que en estudios previos se ha reportado la importancia de la cola C-terminal en actividades biológicas relevantes en la enzima,²⁰ se sabe que el dominio C-terminal tiene un bajo grado de conservación y corresponde con una estructura corta y crucial para establecer interacciones con otras proteínas del divisoma e interacciones laterales entre los protofilamentos del anillo Z,^{19,20} entre las diferentes zonas que componen la cola C-terminal se encuentran la zona desordenada, también denominada “linker” que varía ampliamente en su longitud (2-330),²⁰ y dos zonas en la región final del C-terminal una de las regiones es la conservada con una longitud aproximada de 15 aminoácidos²⁴ y la otra es la variable y se encuentra entre los últimos 12 aminoácidos.²⁶

El rol que cumple la cola C-terminal en las actividades biológicas de la enzima se destacó en estudios previos realizados sobre FtsZ de *Caulobacter crescentus* donde específicamente la región denominada linker demostró su importancia en la regulación de la estructura y dinámica del polímero *in vitro*.²⁰ Por su parte la región C-terminal conservada se ha destacado por la interacción con reguladores positivos y negativos en la polimerización de FtsZ entre los que participan ZipA y FtsA como reguladores positivos que a través de la cola C-terminal unen los polímeros de FtsZ a la membrana,^{8,23} MinC actúa como un regulador negativo que inhibe la división celular a través de la despolimerización del anillo Z uniéndose en la misma zona.²⁴

Los resultados de energía de interacción se analizaron considerando la clasificación de los ligantes. Las mejores predicciones de unión la obtuvieron los derivados semisintéticos, las dicetopiperazinas y los indolterpenoides, con energías de afinidad media menor a -9.5 Kcal/mol (**Figura 17**), mientras que los policétidos mostraron un intervalo de energía más grande, que oscila entre -5.4 Kcal/mol y -10.3 Kcal/mol . Es importante destacar que este grupo es el más abundante en la base de datos. Por otro lado, las energías de unión calculadas para los meroterpenoides, alcaloides, péptidos no ribosomales, lipopéptidos, el ligante derivado del ácido antranílico (**43**) y el ligante derivado de biogénesis mixta (**130**)

fueron menores o iguales a la de berberina y se consideraron como *hits*, sin embargo, las bases nitrogenadas y los peptaiboles se descartaron en el cribado virtual (**Figura 17**).

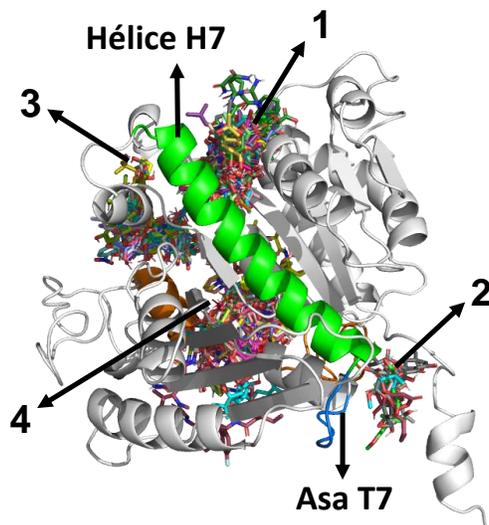


Figura 16. Acoplamiento molecular de los 144 ligantes de la base de datos y *AbFtsZ*. Se enumeran las principales zonas de interacción, y se resaltan la hélice H7 (verde) y el asa T7 (azul). 1) Corresponde al sitio de unión a nucleótidos, las demás zonas 2-4 no tienen registros previos en la literatura.

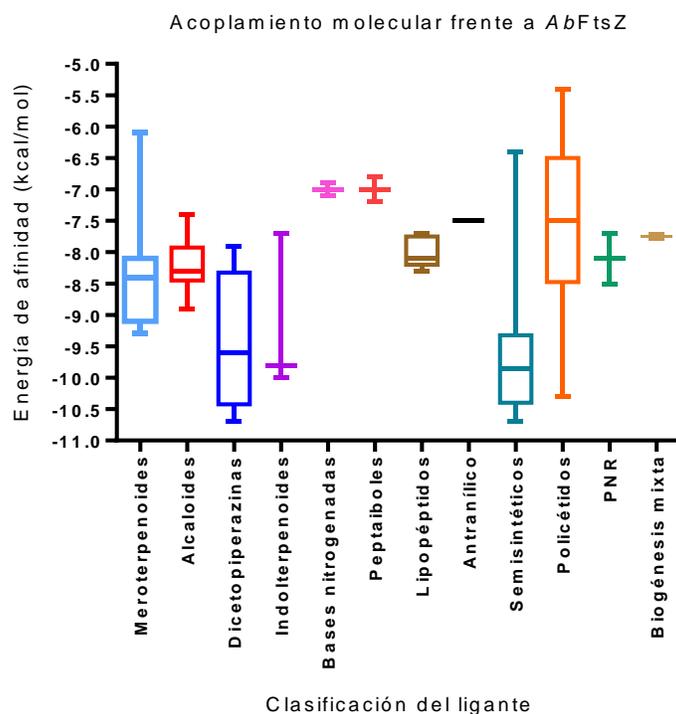


Figura 17. Resultados teóricos del acoplamiento molecular Ligando-*AbFtsZ*, la media de las energías de unión de cada clasificación se muestra al centro de las cajas.

El cribado virtual arrojó un total de 100 *hits* con energías de unión menores a las de berberina (-7.5 Kcal/mol) descartando 44 moléculas de la base de datos.

De las moléculas seleccionadas por acoplamiento molecular, se eligieron ocho policétidos tanto de origen natural como derivados semisintéticos (52, 53, 56, 58, 66, 97, 142, 143) y un meroterpenoide (15), para realizar las evaluaciones experimentales *in vitro*. El criterio de selección obedece a que estas moléculas se unen en la región del C-terminal que es crucial para establecer interacciones con otras proteínas del divisoma, posiblemente impidiendo la formación del anillo Z. Estas moléculas se encuentran en el top 45 de las mejores predicciones (Figura 18).

45 mejores predicciones en acoplamiento proteína ligando frente a *AbFtsZ*

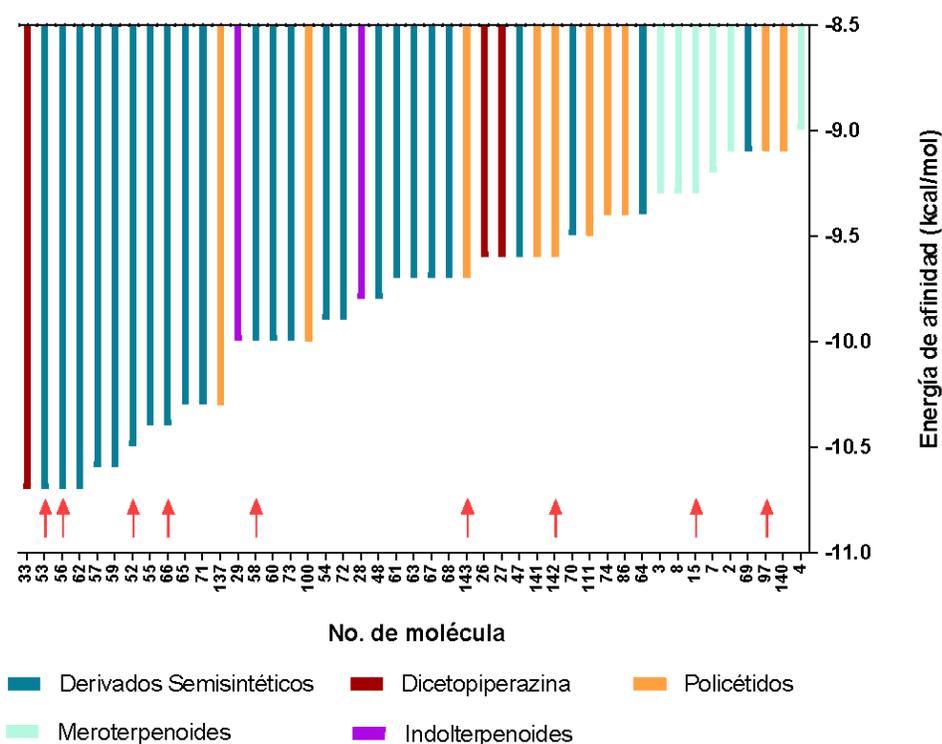


Figura 18. Clasificación y energía de afinidad de las 45 mejores predicciones obtenidas en acoplamiento molecular con *AbFtsZ*, se destacan las moléculas (*hits*) seleccionadas para su evaluación (en ensayos *in vitro*).

7.5 Evaluación de la inhibición de la actividad GTPasa de *AbFtsZ* y actividad antibacteriana frente a *A. baumannii*.

Para las evaluaciones *in vitro* de las nueve moléculas seleccionadas como *hits* (Figura 19), se emplearon dos ensayos, primero se comenzó evaluando la alteración de la actividad

GTPasa de *AbFtsZ* utilizando el ensayo de inhibición de actividad enzimática. Este ensayo es altamente sensible para Pi^{77} y se basa en la formación de un complejo colorido entre el molibdato acidificado y el colorante verde malaquita (**Esquema 1**).⁷⁸ La reacción (**Esquema 1**) se lleva a cabo a pH 7.0, donde el colorante verde malaquita forma el complejo que se estabiliza con detergentes como Tween 20⁷⁹ y finalmente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.^{38,79}

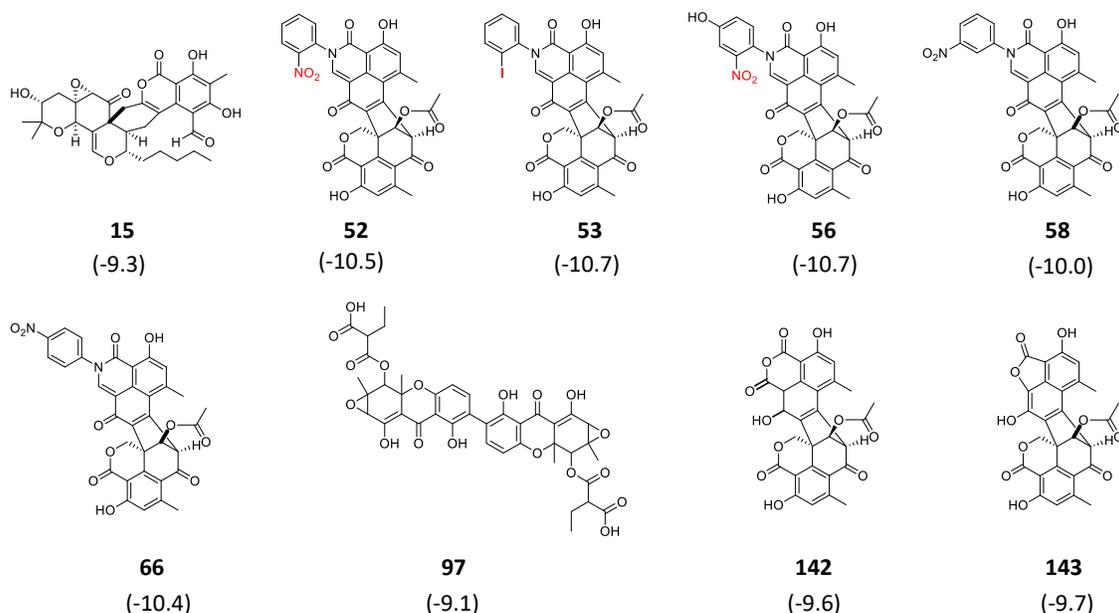
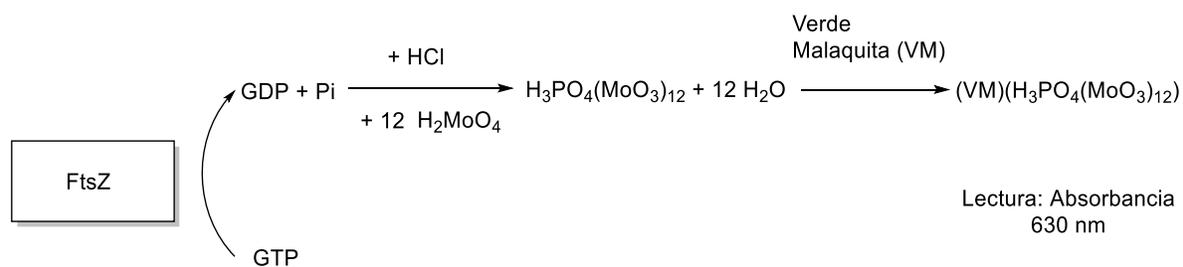


Figura 19. Estructuras de los *hits* seleccionados a partir de acoplamiento molecular frente a *AbFtsZ* en paréntesis se muestra la energía de unión en Kcal/mol, en rojo se muestra los grupos en sustitución en *orto* en el anillo aromático.



Esquema 1

En el ensayo de inhibición de la actividad GTPasa de *AbFtsZ* (*Act_{GTPasa}*), el control (+) fue la berberina, un inhibidor enzimático de FtsZ en otras especies.⁸⁰ La berberina inhibió la actividad enzimática de *AbFtsZ* en un 53 % a una concentración de 500 μM (**Figura 20**).

Los resultados de este ensayo mostraron que algunos *hits* seleccionados interactúan con *AbFtsZ* como ligantes potencializadores de la actividad enzimática, **52** (237 ± 10 %), **53** (153 ± 11 %) y **142** (140 ± 10 %) (**Figura 20**).

Es importante destacar que la mayoría de los ligantes ya reportados para esta proteína actúan como inhibidores de la actividad GTPasa y son pocos los reportes de activadores como es el caso de la curcumina (**I-8**), que, de acuerdo con un estudio realizado en 2008, incrementa la actividad GTPasa de FtsZ de *E. coli* e inhibe el crecimiento de *B. subtilis* y *E. coli* de forma dependiente de la concentración.²⁵ Además, en ese estudio se describe que el mecanismo de acción es a través de la desestabilización del ensamblaje de los protofilamentos del anillo Z.²⁵

Por su parte en el ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano se observó que tres moléculas, **53** (48 ± 3 %), **56** (45 ± 3 %) y **142** (38 ± 3 %) (**Figura 20**) presentaron mayor actividad antibacteriana, sin embargo, sólo dos de ellas, **53** y **142** interactuaron con *AbFtsZ* en el ensayo de inhibición de la actividad enzimática.

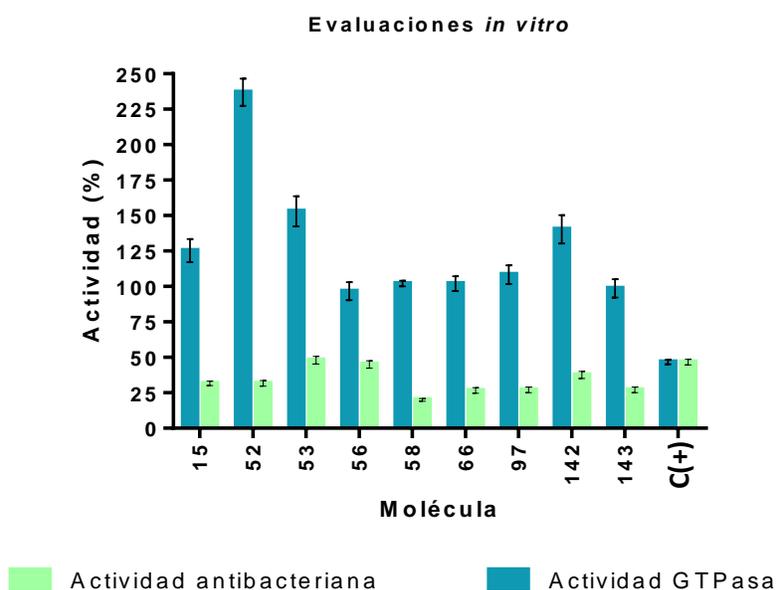


Figura 20. Actividad GTPasa de *AbFtsZ* y actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de *Acinetobacter baumannii* frente a los *hits* seleccionados, evaluados a 500 μ M y 50 μ M, respectivamente.

Es importante destacar que este es el primer trabajo en el que se estudia el efecto de las moléculas (**52**, **53**, **56**, **58** y **66**) sobre la actividad enzimática de *AbFtsZ* y en el crecimiento bacteriano de *A. baumannii*. Previamente Quezada⁷³ reportó la semisíntesis de **52**, **53**, **56**,

58 y 66 (Figura 19) a partir de duclauxina, además de su efecto sobre la actividad de *hPTP1B*₁₋₄₀₀, una enzima relevante en el desarrollo y búsqueda de fármacos contra la diabetes.⁷³

La duclauxina es una oxafenalenona dimérica que se aisló por primera vez en 1965 de *Penicillium duclauxii*,⁸¹ esta molécula más tarde se evaluó como agente antitumoral, trabajo en el cual Fuska y colaboradores⁸² determinaron que su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de ATP en las mitocondrias.⁸² En el grupo de las oxafenalenonas diméricas se engloba tanto a la duclauxinas, como la bacillisporina, la xenoclauxina (**142**) y la talaromicesona (**143**).⁸³ Estos metabolitos son producidos por hongos microscópicos de los géneros *Talaromyces* spp. y *Penicillium* spp.,⁸⁴ entre los que se resaltan nueve especies *T. duclauxii*, *T. aculeatus*, *T. stipitatus*, *T. bacillisporus*, *T. verruculosus*, *T. macrosporus*, *P. herquei* y *P. manginii*, de los cuales se han reportado cerca de 36 análogos.⁸⁴

Se han evaluado actividades biológicas de las duclauxinas demostrando su potencial antitumoral frente a líneas celulares de cáncer de pulmón (H-460), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer en el sistema nervioso central (SF-268),⁸⁵ además en 2017 se evaluaron como inhibidores enzimáticos de alfa-glucosidasa⁸⁶ y como inhibidores de la actividad enzimática de la proteína tirosina fosfatasa humana *hPTP1B*₁₋₄₀₀ en 2020,⁷¹ en otro estudio se reportó su actividad antipalúdica frente a *Plasmodium falciparum*.⁸⁷ Por su parte, la xenoclauxina (**142**) se estudió como citotóxico contra células patológicas en la leucemia murina, ensayo en el cual exhibió actividad inhibitoria a 20 μ M.⁸⁸

7.6 Análisis del sitio y del tipo de interacciones para las moléculas con potencial antibacteriano

A través de la interfaz gráfica PyMOL y utilizando el software Discovery Studio se analizó el sitio de interacción teórico para las moléculas evaluadas. A continuación, se muestran los resultados para las moléculas evaluadas.

La molécula **15** incrementó la actividad GTPasa de AbFtsZ a 125 ± 8 % e inhibió el crecimiento de *A. baumannii* A564 en un 32 ± 2 % (**Figura 20**). El acoplamiento molecular mostró que la mayoría de las interacciones entre este compuesto y la proteína son de tipo Van der Waals y puentes de hidrogeno, y un enlace π -catión con Lys₃₈₃. Los aminoácidos que participan en la interacción son: Ala₁₆₂, Asp₁₆₅, Ser₁₆₆, Leu₁₆₇, Gly₂₂₇, Tyr₂₂₈, Arg₃₂₄, Arg₃₇₂, Asn₃₅₈, Ala₃₅₉, Glu₃₆₀, Asn₃₆₅, Arg₃₇₂, Gln₃₇₉, Asn₃₈₄, Gln₃₈₅ y Arg₃₈₇, el sitio de interacción corresponde a la región desordenada del carboxilo terminal (**Figura 21**).

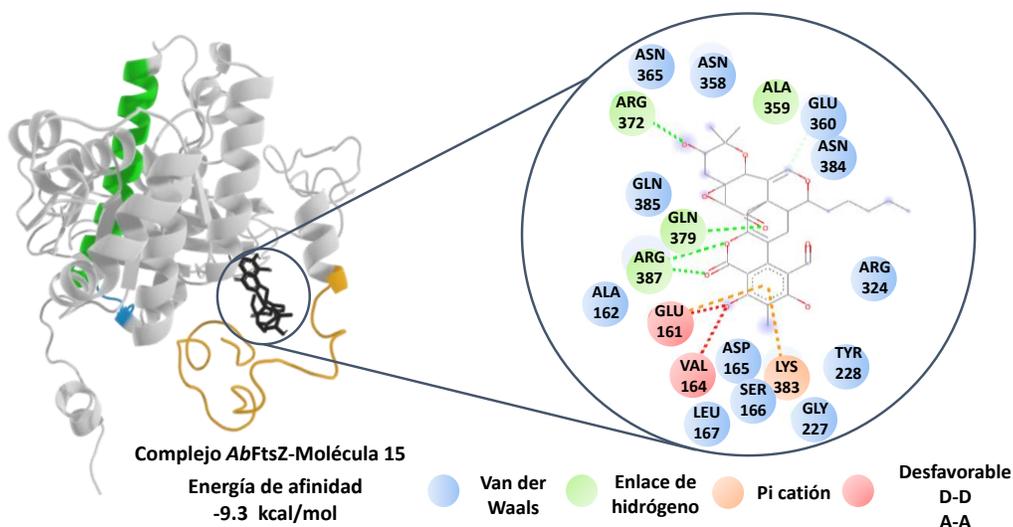


Figura 21. Complejo *AbFtsZ*-Molécula 15 con energía de afinidad -9.3 Kcal/mol. Se muestra el tipo de interacciones: Van der Waals (azul), enlace de hidrógeno (verde), enlace Pi catión (naranja) y los enlaces desfavorables (rojo). Además, se destaca en la estructura proteica verde la hélice H7 (verde), el asa T7 (azul) y la región del C-terminal (naranja) y la molécula 15 (negro).

La molécula 52 presentó una actividad potencializadora como ligante de *AbFtsZ*, incrementando la actividad en un 237 ± 10 % e inhibiendo en un 32 ± 7 % el crecimiento bacteriano (**Figura 20**). En este caso los aminoácidos que participan en la interacción fueron la Arg₃₂₄, Arg₃₅₈, Ala₃₅₉, Asp₃₆₂, Glu₃₆₀, Lys₃₈₈, Ala₃₆₆, Asn₃₆₅, Arg₃₇₂, Gln₃₈₆, Gln₃₈₅, Asn₃₈₄, Gln₃₇₉, Lys₃₈₃, Glu₁₆₁ y la Arg₃₈₇, el sitio de interacción corresponde a la región desordenada del carboxilo terminal (**Figura 22**).

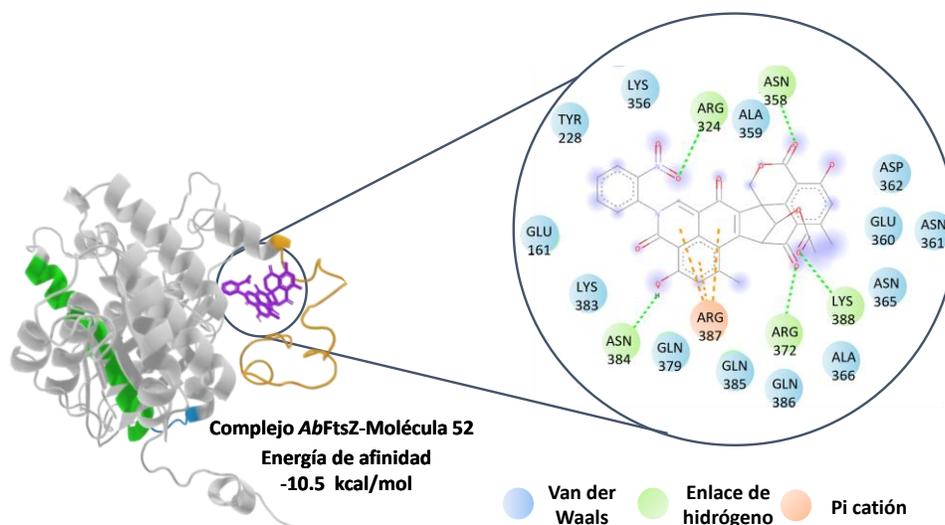


Figura 22. Complejo *AbFtsZ*-Molécula 52 con energía de afinidad -10.5 Kcal/mol. Se muestra el tipo de interacciones: Van der Waals (azul), enlace de hidrógeno (verde), enlace Pi catión (naranja).

Además se destaca en la estructura proteica verde la hélice H7 (verde), el asa T7 (azul) y la región del C-terminal (naranja) y la molécula **52** (morado).

La molécula **53** incrementó en la actividad GTPasa mostrando una actividad enzimática total de 153 ± 11 % y una inhibición del crecimiento bacteriano de 48 ± 3 % (**Figura 20**). El tipo de fuerzas teóricas fueron principalmente de fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno, además, presenta enlaces π -catión con la Lys₃₅₅, Arg₃₈₇ y el Asp₃₆₂. Los aminoácidos que participaron en el sitio de interacción fueron Glu₁₆₁, Tyr₂₂₈, Arg₃₂₄, Asn₃₅₈, Asn₃₆₅, Ala₃₆₆, Glu₃₆₀, Ala₃₆₁, Lys₃₈₈, Ala₃₆₆, Asn₃₆₅, Arg₃₇₂, Gln₃₇₉, Lys₃₈₃, Asn₃₈₄, Gln₃₈₅ y Gln₃₈₆ (**Figura 22**).

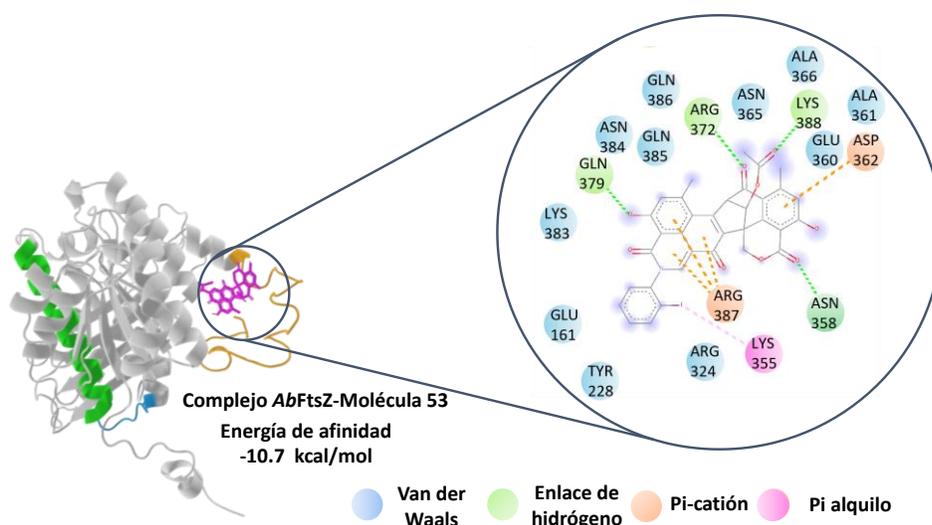


Figura 23. Complejo *AbFtsZ*-Molécula **53** con energía de afinidad -10.7 Kcal/mol. Se muestra el tipo de interacciones Van der Waals (azul), enlace de hidrógeno (verde), enlace Pi catión (naranja) y enlace pi alquilo (rosa). Además, se destaca en la estructura proteica verde la hélice H7 (verde), el asa T7 (azul) y la región del C-terminal (naranja) y la molécula **53** (rosa).

La molécula **142**, potencializó la actividad GTPasa y el porcentaje fue de 140 ± 10 % y su actividad antibacteriana de 38 ± 3 % (**Figura 20**). El tipo de interacción principal fueron las fuerzas de Van der Waals seguido por los enlaces de hidrógeno, presenta una interacción desfavorable en Gln₃₈₆ y un enlace pi catión con Arg₃₈₇, el resto de los aminoácidos que participan son: Glu₁₆₁, Ala₁₆₂, Asn₃₅₈, Ala₃₅₉, Glu₃₆₀, Asn₃₆₁, Asp₃₆₂, Lys₃₈₃, Gln₃₇₉, Asn₃₆₅, Ala₃₆₆, Pro₃₆₇, Pro₃₇₁, Arg₃₇₂, Asn₃₈₄, Gln₃₈₅ y Lys₃₈₈ (**Figura 24**).

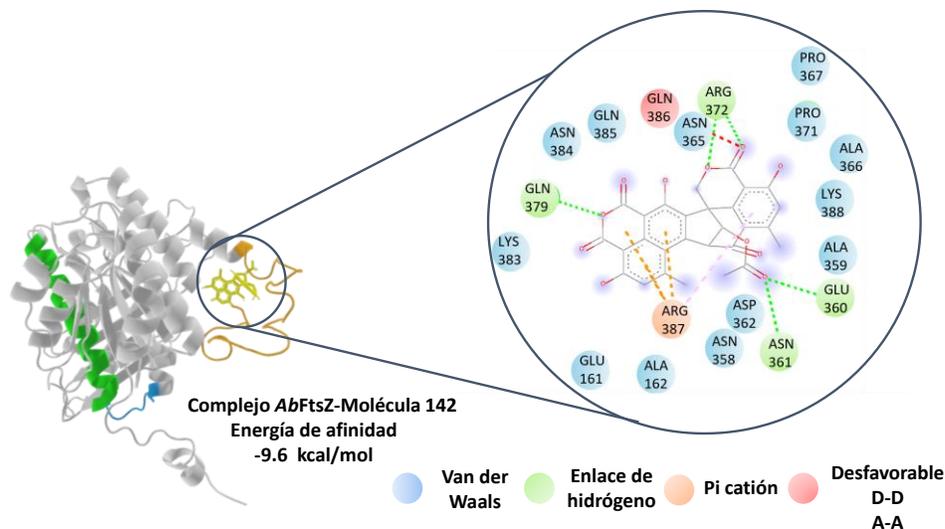


Figura 24. Complejo *AbFtsZ*-Molécula **142** con energía de afinidad -9.6 Kcal/mol. Se muestra el tipo de interacciones Van der Waals (azul), enlace de hidrógeno (verde), enlace Pi catión (naranja). Además se destaca en la estructura proteica verde la hélice H7 (verde), el asa T7 (azul) y la región del C-terminal (naranja) y la molécula **142** (amarilla).

En general, las moléculas que presentaron actividad (**52**, **53**, **56** y **142**) adoptan poses semejantes en la región del C-terminal de la proteína, en un sitio constituido por los aminoácidos Asp₃₆₂, Glu₃₆₀, Lys₃₈₈, Ala₃₆₆, Asn₃₆₅, Arg₃₇₂, Gln₃₈₆, Gln₃₈₅, Asn₃₈₄, Gln₃₇₉, Lys₃₈₃, Glu₁₆₁ y Arg₃₈₇. Previamente se ha estudiado la importancia de la región C-terminal durante el ensamblaje de protofilamentos FtsZ en la división celular al participar con proteínas como ZipA, FtsA y ZapA, por otro lado, también se ha identificado su interacción con reguladores negativos como es el caso de MinC y ErzA en *B. subtilis*.⁸

Dicha regulación se da mediante interacciones proteicas con la cola C-terminal de FtsZ, la cual está altamente conservada en bacterias, y en *E. coli* se compone de los últimos 15 residuos (**Figura 2**): DYLDIPAFLRKQAD.²⁴ En *AbFtsZ* esta secuencia correspondería con: DYLKNQQRK. Del análisis de las interacciones con los ligandos estudiados, cabe señalar que los residuos Lys₃₈₃, Asn₃₈₄ y Lys₃₈₈ se encuentran en un segmento conservado de la cola C-terminal (**Figura 25**). Interesantemente, esta región está implicada en la unión de las proteínas FtsA y ZipA, de las cuales se ha demostrado que se desempeñan como reguladores positivos del ensamblaje de FtsZ *in vivo*.²³

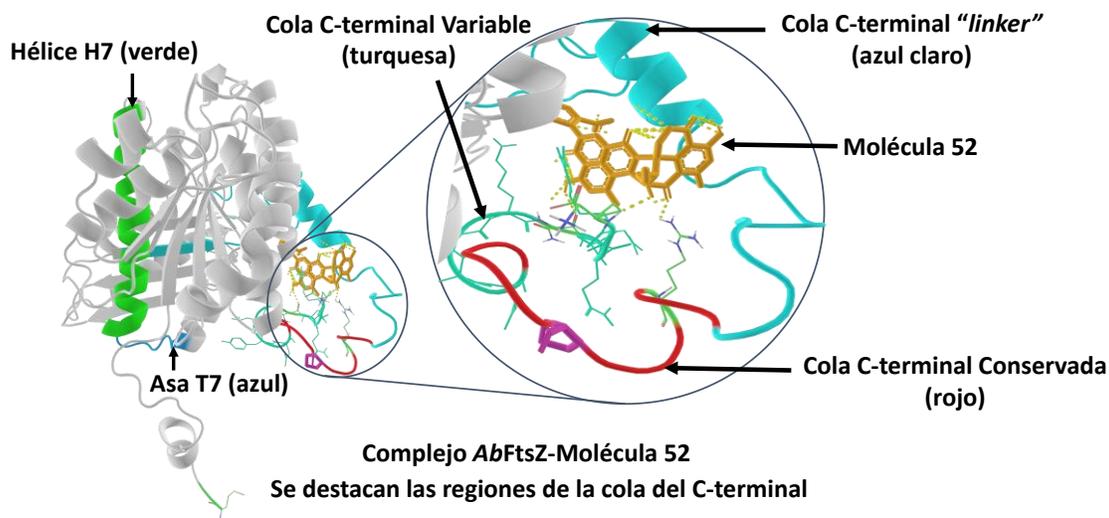


Figura 25. Interacción de la molécula **52** con la cola del C-terminal se destacan el “*linker*” (azul claro), la zona conservada (rojo) y la variable (turquesa).

Aunque el anillo Z se forme con la ayuda de ZipA o FtsA, éste no es funcional, ya que también se requiere que se coloque con precisión en la mitad de la célula para asegurar la producción de progenie celular de igual tamaño; posicionamiento llevado a cabo por los reguladores negativos.^{23,24} De este modo, se explica que incluso una mayor polimerización de *AbFtsZ* no tenga como consecuencia una mayor tasa de reproducción celular, sino por el contrario, resulte letal.

Cabe destacar que las moléculas **52**, **53** y **56** se obtienen por semisíntesis, a través del acoplamiento de una anilina con el producto natural duclauxina. Estos productos tienen en común una sustitución en *orto* en el anillo de la anilina acoplado (**Figura 19**).

Un análisis de la influencia de la posición de los sustituyentes (*orto*, *meta* y *para*) en la energía de interacción con *AbFtsZ*, reveló para la serie de compuestos **52**, **58** y **66** (que únicamente difieren en la posición de sustitución de un grupo $-NO_2$ sobre el anillo de benceno), que la sustitución en *orto* origina el complejo más estable, con una energía de afinidad de -10.5 Kcal/mol, mientras que los compuestos con sustitución en *meta* y en *para* tienen una energía mayor (**Figura 26**). La interacción que favorecen la formación de este complejo (derivado *orto*- NO_2) es la formación de un enlace de hidrógeno entre el $-NO_2$ y el residuo Arg₃₂₄.

Por otra parte, el producto **56** (**Figura 19**, una azafenalona sustituida con un residuo de anilina con sustituyentes en posición *orto*) presentó una buena actividad antibacteriana ($45 \pm 3\%$), pero no actuó como ligante frente a *AbFtsZ*. Estos hallazgos infieren que la inhibición del crecimiento bacteriano se presenta por un mecanismo alterno.

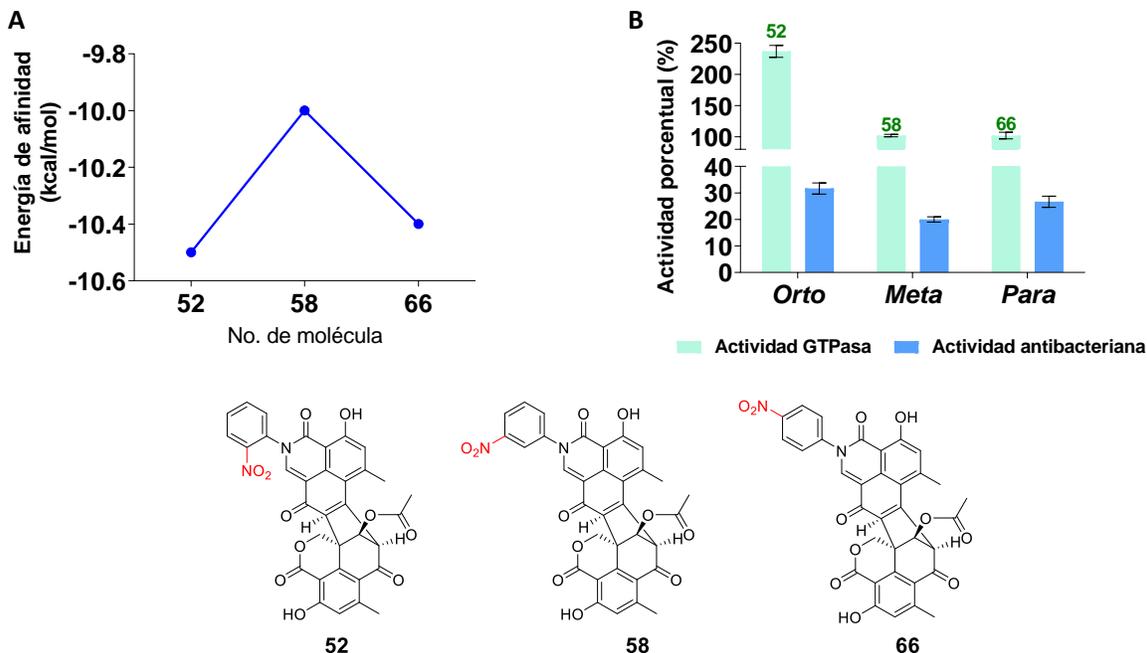


Figura 26. a) Predicciones de energías de afinidad entre los ligandos **52**, **58** y **66** frente *AbFtsZ*. b) Análisis por comparación de la actividad porcentual GTPasa de *AbFtsZ* y la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, de las moléculas **52** (*orto*), **58** (*meta*) y **66** (*para*).

En resumen:

- La aplicación del acoplamiento molecular utilizando como blanco molecular la enzima *AbFtsZ* permitió priorizar 9 *hits* a partir de una colección de 144 moléculas, de las cuales **15**, **52**, **53**, **56**, y **142** mostraron actividad antimicrobiana potencial y alteración de la actividad de la enzima *AbFtsZ* en ensayos *in vitro*.
- Se identificó que la incorporación de un anillo aromático sustituido en la posición *orto* en los derivados de duclauxina, favorecen la actividad antimicrobiana sobre *A. baumannii* multirresistente.
- Los ligandos **52** y **53** demostraron alterar la actividad GTPasa de la enzima en un $237 \pm 10 \%$ y $153 \pm 11 \%$, respectivamente.
- Se propone a los ligandos **52** y **53** como moléculas líderes dirigidas hacia *AbFtsZ* para su investigación y desarrollo como antibióticos de nueva generación con mecanismos de acción novedosos.

8.- CONCLUSIONES

En conclusión, este trabajo de investigación permitió identificar un esqueleto carbonado distinto (oxafenalenona dimérica) como ligante de la proteína AbFtsZ con propiedades antibacterianas moderadas, empleando herramientas tanto informáticas como experimentales (*in vitro*), destacando la importancia de la integración de ambas en el descubrimiento de prototipos estructurales para el desarrollo de antimicrobianos de nueva generación con un mecanismo de acción distinto a los convencionales.

9.- PERSPECTIVAS

- Evaluar los cambios morfológicos de *A. baumannii* por la exposición a los antibacterianos putativos, utilizando microscopía.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y el efecto en la actividad GTPasa, de un conjunto mayor de ligantes derivados de fenalenonas con la incorporación de anilinas *orto*-sustituidas.

10. REFERENCIAS

1. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: Final Report and recommendations the review on antimicrobial resistance chaired by Jim O'Neill. Published online May 2016:1-85. Accessed May 2, 2023. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
2. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Published online February 17, 2017. Accessed June 13, 2023. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
3. Tripathy S, Sahu SK. FtsZ inhibitors as a new genera of antibacterial agents. *Bioorg Chem.* 2019;91. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103169
4. Kusuma KD, Payne M, Ung AT, et al. FtsZ as an Antibacterial Target: Status and Guidelines for Progressing This Avenue. *ACS Infect Dis.* 2019;5(8):1279-1294. doi:10.1021/acsinfecdis.9b00055
5. Andreu JM, Huecas S, Araújo-Bazán L, et al. The Search for Antibacterial Inhibitors Targeting Cell Division Protein FtsZ at Its Nucleotide and Allosteric Binding Sites. Published online 2022. doi:10.3390/biomedicines10081825
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83(3):770-803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
7. Newman DJ. Natural products and drug discovery. *Natl Sci Rev.* 2022;9(11). doi:10.1093/nsr/nwac206
8. Adams DW, Errington J. Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(9):642-653. doi:10.1038/nrmicro2198
9. Alope C, Achilonu I. Coping with the ESKAPE pathogens: Evolving strategies, challenges and future prospects. *Microb Pathog.* 2023;175. doi:10.1016/j.micpath.2022.105963
10. Plan Universitario de control de la Resistencia Antimicrobiana, UNAM. *Estado Actual de La Resistencia Antimicrobiana México 2018.*; 2019. Accessed April 4, 2023. www.puis.unam.mx
11. Vanegas-Múnera J, Roncacio-Villamil G, Jiménez-Quinceno J. Acinetobacter baumannii: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *CES Med.* 2014;28(2):233-246.

12. Campos A, Lopes M, Carvalheira A, et al. Survival of clinical and food *Acinetobacter* spp. isolates exposed to different stress conditions. *Food Microbiol.* 2019;77:202-207. doi:10.1016/j.fm.2018.09.009
13. Jo J, Kwon KT, Ko KS. Multiple heteroresistance to tigecycline and colistin in *Acinetobacter baumannii* isolates and its implications for combined antibiotic treatment. *J Biomed Sci.* 2023;30(1). doi:10.1186/s12929-023-00914-6
14. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
15. Stricker J, Maddox P, Salmon ED, Erickson HP. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):3171-3175. doi:10.1073/pnas.052595099
16. Vaughan S, Wickstead B, Gull K, Addinall SG. Molecular Evolution of FtsZ Protein Sequences Encoded Within the Genomes of Archaea, Bacteria, and Eukaryota. *J Mol Evol.* 2004;58(1):19-39. doi:10.1007/s00239-003-2523-5
17. Akinpelu OI, Kumalo HM, Mhlongo SI, et al. Identifying the analogues of berberine as promising antitubercular drugs targeting Mtb-FtsZ polymerisation through ligand-based virtual screening and molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Recognition.* 2022;35(2). doi:10.1002/jmr.2940
18. Chan FY, Sun N, Neves MAC, et al. Identification of a new class of FtsZ inhibitors by structure-based design and in vitro screening. *J Chem Inf Model.* 2013;53(8):2131-2140. doi:10.1021/ci400203f
19. Haeusser DP, Margolin W. Splitsville: Structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(5):305-319. doi:10.1038/nrmicro.2016.26
20. Sundararajan K, Goley ED. The intrinsically disordered C-terminal linker of FtsZ regulates protofilament dynamics and superstructure in vitro. *Journal of Biological Chemistry.* 2017;292(50):20509-20527. doi:10.1074/jbc.M117.809939
21. Rivas G, López A, Mingorance J, et al. *Magnesium-Induced Linear Self-Association of the FtsZ Bacterial Cell Division Protein Monomer THE PRIMARY STEPS FOR FtsZ ASSEMBLY**. Vol 275.; 2000. <http://www.jbc.org>

22. Attrill H, Imamura A, Sharma RS, et al. Siglec-7 undergoes a major conformational change when complexed with the $\alpha(2,8)$ -disialylganglioside GT1b. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(43):32774-32783. doi:10.1074/jbc.M601714200
23. Singh JK, Makde RD, Kumar V, Panda D. A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtSZ. *Biochemistry*. 2007;46(38):11013-11022. doi:10.1021/bi700710j
24. Shen B, Lutkenhaus J. The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinCC/MinD. *Mol Microbiol*. 2009;72(2):410-424. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06651.x
25. Rai D, Singh JK, Roy N, et al. Curcumin inhibits FtsZ assembly: An attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal*. 2008;410(1):147-155. doi:10.1042/BJ20070891
26. Casiraghi A, Suigo L, Valoti E, et al. Targeting bacterial cell division: A binding site-centered approach to the most promising inhibitors of the essential protein FtsZ. *Antibiotics*. 2020;9(2). doi:10.3390/antibiotics9020069
27. Du S, Lutkenhaus J. At the Heart of Bacterial Cytokinesis: The Z Ring. *Trends Microbiol*. 2019;27(9):781-791. doi:10.1016/j.tim.2019.04.011
28. Dzoyem JP, Kechia FA, Kuete V, et al. Phytotoxic, antifungal activities and acute toxicity studies of the crude extract and compounds from *Diospyros canaliculata*. *Nat Prod Res*. 2011;25(7):741-749. doi:10.1080/14786419.2010.531392
29. Stuhldreier F, Schmitt L, Lenz T, et al. The mycotoxin viriditoxin induces leukemia- and lymphoma-specific apoptosis by targeting mitochondrial metabolism. *Cell Death Dis*. 2022;13(11). doi:10.1038/s41419-022-05356-w
30. Domadia P, Swarup S, Bhunia A, et al. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(6):831-840. doi:10.1016/j.bcp.2007.06.029
31. Yuan H, Li W, Chen C, et al. The role of bacterial nanocellulose mats encapsulated with cinnamaldehyde on chilled meat preservation. *Int J Food Sci Technol*. 2023;58(2):880-889. doi:10.1111/ijfs.15732
32. Lu X, Zhu C, Zhang C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3-aryl-7-hydroxy scopoletin derivatives as autophagy activators against tumorigenesis. *Eur J Med Chem*. 2022;244. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114805

33. Kim MB, O'Brien TE, Moore JT, et al. The synthesis and antimicrobial activity of heterocyclic derivatives of totarol. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(10):818-822. doi:10.1021/ml3001775
34. Beuria TK, Santra MK, Panda D. Sanguinarine Blocks Cytokinesis in Bacteria by Inhibiting FtsZ Assembly and Bundling †. Published online 2005. doi:10.1021/bi050767
35. Domadia PN, Bhunia A, Sivaraman J, et al. Berberine targets assembly of Escherichia coli cell division protein FtsZ. *Biochemistry.* 2008;47(10):3225-3234. doi:10.1021/bi7018546
36. Zhao N, Isguven S, Evans R, et al. Berberine disrupts staphylococcal proton motive force to cause potent anti-staphylococcal effects in vitro. *Biofilm.* 2023;5. doi:10.1016/j.biofilm.2023.100117
37. Attin T, Becker K, Hannig C, et al. Suitability of a malachite green procedure to detect minimal amounts of phosphate dissolved in acidic solutions. *Clin Oral Investig.* 2005;9(3):203-207. doi:10.1007/s00784-005-0313-8
38. Geladopoulos TP, Sotiroidis TG, Evangelopoulos AE. *A Malachite Green Calorimetric Assay for Protein Phosphatase Activity.* Vol 192.; 1991.
39. Soyenkoff B. A micromethod of phosphate determination. *Journal of Biological Chemistry.* 1947;168(2):447-457. doi:10.1016/S0021-9258(17)30905-5
40. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol.* 1981;147(1):195-197. doi:10.1016/0022-2836(81)90087-5
41. Wiltgen M. Algorithms for Structure Comparison and Analysis: Homology Modelling of Proteins. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics.* 2019;1-3:38-61. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20484-6
42. David A, Islam S, Tankhilevich E, Sternberg MJE. The AlphaFold Database of Protein Structures: A Biologist's Guide. *J Mol Biol.* 2022;434(2). doi:10.1016/j.jmb.2021.167336
43. Zheng W, Zhang C, Bell EW, Zhang Y. I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Future Generation Computer Systems.* 2019;99:73-85. doi:10.1016/j.future.2019.04.011
44. Yang J, Yan R, Roy A, et al. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods.* 2014;12(1):7-8. doi:10.1038/nmeth.3213

45. Zheng W, Zhang C, Li Y, et al. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*. 2021;1(3):100014. doi:10.1016/J.CRMETH.2021.100014
46. Zhou X, Zheng W, Li Y, et al. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 2022;17(10):2326-2353. doi:10.1038/s41596-022-00728-0
47. Ramachandran GN, Illinois C, Sasisekharan V. Conformation of Polypeptides and Proteins. In: Anfisen C, Anson M, Edsall JT, Richards FM, eds. *Advances in Protein Chemistry*. Vol 23. ; 1968:283-437. Accessed March 3, 2023. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60402-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60402-7).
48. Hovmöller S, Zhou T, Ohlson T. Conformations of amino acids in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002;58(5):768-776. doi:10.1107/S0907444902003359
49. An X, Zhang W, Rong C, Liu S. Understanding Ramachandran plot for dipeptide: A density functional theory and information-theoretic approach study. *Journal of the Chinese Chemical Society*. Published online March 1, 2022. doi:10.1002/jccs.202200444
50. Hooft RWW, Sander C, Vriend G. *Objectively Judging the Quality of a Protein Structure from a Ramachandran Plot*. Vol 13.; 1997. <http://swift.embl->
51. Elsliger MA, Wilson IA. Structure validation and analysis. In: *Comprehensive Biophysics*. Vol 1. Elsevier Inc.; 2012:116-135. doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00110-7
52. Wang H, Avnir D, Tuvi-Arad I. Chiral Ramachandran Plots II: General Trends and Protein Chirality Spectra. *Biochemistry*. 2018;57(45):6395-6403. doi:10.1021/acs.biochem.8b00974
53. De Groot BL, Van Aalten DMF, Scheek RM, Amadei A, Vriend G, Berendsen HJC. Prediction of protein conformational freedom from distance constraints. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 1997;29(2):240-251. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(199710)29:2<240::AID-PROT11>3.0.CO;2-O
54. Baruch-Shpigler Y, Wang H, Tuvi-Arad I, Avnir D. Chiral Ramachandran Plots I: Glycine. *Biochemistry*. 2017;56(42):5635-5643. doi:10.1021/acs.biochem.7b00525
55. Eid S, Zalewski A, Smieško M, et al. A molecular-modeling toolbox aimed at bridging the gap between medicinal chemistry and computational sciences. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):684-700. doi:10.3390/ijms14010684

56. Rudrapal M, Chetia D. Virtual Screening, Molecular Docking and QSAR Studies in Drug Discovery and Development Programme. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2020;10(4):225-233. doi:10.22270/jddt.v10i4.4218
57. Straniero V, Suigo L, Casiraghi A, et al. Benzamide derivatives targeting the cell division protein ftsz: Modifications of the linker and the benzodioxane scaffold and their effects on antimicrobial activity. *Antibiotics*. 2020;9(4). doi:10.3390/antibiotics9040160
58. Prieto-Martínez FD, Arciniega M, Medina-Franco JL. Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2018;21. doi:10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143
59. Mukherjee A, Lutkenhaus J. *Dynamic Assembly of FtsZ Regulated by GTP Hydrolysis*. Vol 17.; 1998.
60. Quan A, Robinson PJ. Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Methods Enzymol*. 2005;404:556-569. doi:10.1016/S0076-6879(05)04049-8
61. Martín-García F, Salvarelli E, Mendieta-Moreno JI, et al. Molecular dynamics simulation of GTPase activity in polymers of the cell division protein FtsZ. *FEBS Lett*. 2012;586(8):1236-1239. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.042
62. Xu J, Zhang Y. How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics*. 2010;26(7):889-895. doi:10.1093/bioinformatics/btq066
63. *AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR**. Vol 8.; 1996. <http://www-nmr.chem.ruu.nl/users/rull/>
64. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*. 1993;2(9):1511-1519. doi:10.1002/pro.5560020916
65. Bernardini S, Tiezzi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat Prod Res*. 2018;32(16):1926-1950. doi:10.1080/14786419.2017.1356838
66. Kathleen Crawford B, Heatley NG, Boyd PF, et al. *Antibiotic Production by a Species of Cephalosporium.*; 1952.
67. Chakravarti R, Sahai V. Compactin - A review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64(5):618-624. doi:10.1007/s00253-003-1553-7
68. Gil-Alonso S, Quindós G, Cantón E, et al. Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* species complex:

- Evaluation of the fungicidal activity. *Rev Iberoam Micol.* 2019;36(1):24-29. doi:10.1016/j.riam.2018.12.001
69. Van Den Heever JP. *Fumagillin and Dicyclohexylamine in Apiculture*. University of Alberta; 2015. Accessed July 20, 2023. <https://era.library.ualberta.ca/items/bde1f0ca-b408-4301-9667-19b77b9cdf18>
70. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem.* 2011;46(10):4769-4807. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.057
71. Jiménez-Arreola BS, Aguilar-Ramírez E, Cano-Sánchez P, et al. Dimeric phenalenones from *Talaromyces* sp. (IQ-313) inhibit hPTP1B1-400: Insights into mechanistic kinetics from in vitro and in silico studies. *Bioorg Chem.* 2020;101. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103893
72. Rivera-Chávez J, Zacatenco-Abarca J, Morales-Jiménez J, et al. Cuautepetalorin, a 7,8-Dihydrochromene–Oxoisochromane Adduct Bearing a Hexacyclic Scaffold from *Pestalotiopsis* sp. IQ-011. *Org Lett.* 2019;21(10):3558-3562. doi:10.1021/acs.orglett.9b00962
73. Quezada CD. *Diseño y Síntesis Parcial de Azafenalenonas Basadas En Duclauxina y Su Actividad Frente HPTP1B(1-400)*. UNAM; 2023.
74. Rivera-Chávez J, Raja HA, Graf TN, et al. Biosynthesis of Fluorinated Peptaibols Using a Site-Directed Building Block Incorporation Approach. *J Nat Prod.* 2017;80(6):1883-1892. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00189
75. Boberek JM, Stach J, Good L. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. *PLoS One.* 2010;5(10). doi:10.1371/journal.pone.0013745
76. Park HC, Gedi V, Cho JH, et al. Characterization and in vitro inhibition studies of *Bacillus anthracis* FtsZ: A potential antibacterial target. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;172(6):3263-3270. doi:10.1007/s12010-014-0752-2
77. Hohenwallner W, Wimmer E. The malachite green micromethod for the determination of inorganic phosphate. *Clinica Chimica Acta.* 1973;45(2):169-175. doi:10.1016/0009-8981(73)90406-3
78. Feng J, Chen Y, Pu J, et al. An improved malachite green assay of phosphate: Mechanism and application. *Anal Biochem.* 2011;409(1):144-149. doi:10.1016/j.ab.2010.10.025
79. Veloria J, Shin M, Devkota AK, et al. Developing Colorimetric and Luminescence-Based High-Throughput Screening Platforms for Monitoring the GTPase Activity of

- Ferrous Iron Transport Protein B (FeoB). *SLAS Discovery*. 2019;24(5):597-605. doi:10.1177/2472555219844572
80. Sun N, Chan FY, Lu YJ, et al. Rational design of berberine-based FtsZ inhibitors with broad-spectrum antibacterial activity. *PLoS One*. 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0097514
 81. Shibata S, Ogrhara Y, Tokutake N, Tanaka O. *Duclauxin, a Metabolite of Penicillium Duclauxii (Delacroix)*. Pergamon press Ltd; 1965. doi:10.1016/s0040-4039(00)77197-8
 82. Fуска J, Kuhr I, Nemeč P, Fusková A. Antitumor antibiotics produced by penicillium stipitatum thom. *J Antibiot (Tokyo)*. 1974;(2).
 83. Dramae A, Intaraudom C, Bunbamrung N, et al. Heptacyclic oligophenalenones from the soil fungus Talaromyces bacillisporus BCC17645. *Tetrahedron*. 2020;76(9). doi:10.1016/j.tet.2020.130980
 84. Shahid H, Cai T, Wang Y, et al. Duclauxin Derivatives From Fungi and Their Biological Activities. *Front Microbiol*. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.766440
 85. Dethoup T, Manoch L, Kijjoa A, et al. Bacillisporins D and E, New Oxyphenalenone Dimers from Talaromyces bacillisporus. *Planta Med*. 2006;72(10):957-960. doi:10.1055/s-2006-947188
 86. Huang H, Liu T, Wu X, et al. A new antibacterial chromone derivative from mangrove-derived fungus Penicillium aculeatum (No. 9EB). *Nat Prod Res*. 2017;31(22):2593-2598. doi:10.1080/14786419.2017.1283498
 87. Chaiyosang B, Kanokmedhakul K, Sanmanoch W, et al. Bioactive oxaphenalenone dimers from the fungus Talaromyces macrosporus KKU-1NK8. *Fitoterapia*. 2019;134:429-434. doi:10.1016/j.fitote.2019.03.015
 88. Kawai K, Shiojiri H, Nakamaru T, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of xenoclauxin and desacetyl duclauxin from Penicillium duclauxii (Delacroix). *Cell Biol Toxicol*. 1985;1(2):1-10. doi:10.1007/BF00717786

11.ANEXOS.

Figura AI 1. Sitios de interacción de los ligantes en el complejo más estable predicho en el acoplamiento molecular ligante- <i>AbFtsZ</i> . Ligantes a) 15, b) 52, c) 53, d) 56, e) 58, f) 66, g) 97, h) 142, i) 143.....	57
Figura AI 2. Aminoácidos de <i>AbFtsZ</i> que interaccionan en el sitio de unión teórico ligante-proteína, de acuerdo con el complejo más estable predicho en el acoplamiento molecular. Ligantes (a)15, (b)52, (c)53, (d) 56, (e) 58, (f) 66, (g) 97, (h) 142, (i) 143.	58
Figura AI 3. Cartel. Simposio 2022 del Instituto de Química, UNAM.....	59
Figura AI 4. Reconocimiento del Simposio 2022 del Instituto de Química.	60

LISTA DE TABLAS (ANEXO 1

Tabla A 1. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -8.5 Kcal/mol).....	54
Tabla A 2. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)	55
Tabla A 3. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a <i>AbFtsZ</i> . (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)	56

No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)	No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)
33	-10.7	47	-9.6
53	-10.7	141	-9.6
56	-10.7	142	-9.6
62	-10.7	70	-9.5
57	-10.6	111	-9.5
59	-10.6	74	-9.4
52	-10.5	86	-9.4
55	-10.4	64	-9.4
66	-10.4	3	-9.3
65	-10.3	8	-9.3
71	-10.3	15	-9.3
137	-10.3	7	-9.2
29	-10	2	-9.1
58	-10	69	-9.1
60	-10	97	-9.1
73	-10	140	-9.1
100	-10	4	-9
54	-9.9	138	-9
72	-9.9	23	-8.9
28	-9.8	91	-8.9
48	-9.8	99	-8.9
61	-9.7	12	-8.8
63	-9.7	80	-8.8
67	-9.7	98	-8.8
68	-9.7	87	-8.7
143	-9.7	5	-8.6
26	-9.6	11	-8.5
27	-9.6	36	-8.5

Tabla A 1. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a AbFtsZ. (Energía de afinidad \leq -8.5 Kcal/mol).

No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)	No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)
44	-8.5	104	-7.8
51	-8.5	106	-7.8
112	-8.5	114	-7.8
13	-8.4	132	-7.8
113	-8.4	30	-7.7
1	-8.3	37	-7.7
6	-8.3	38	-7.7
18	-8.3	45	-7.7
20	-8.3	85	-7.7
21	-8.3	90	-7.7
40	-8.3	130	-7.7
79	-8.3	120	-7.6
10	-8.2	43	-7.5
78	-8.2	49	-7.5
82	-8.2	105	-7.5
88	-8.2	108	-7.5
14	-8.1	109	-7.5
16	-8.1	119	-7.5
19	-8.1	9	-7.4
39	-8.1	22	-7.4
42	-8.1	75	-7.4
81	-8.1	76	-7.4
139	-8	83	-7.3
25	-7.9	84	-7.3
102	-7.9	17	-7.2
41	-7.8	35	-7.2
89	-7.8	31	-7.1
101	-7.8	116	-7

Tabla A 2. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a *AbFtsZ*. (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)

No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)	No. de molécula	Energía de Afinidad (Kcal/mol)
117	-7	131	-6.4
125	-7	134	-6.3
144	-7	77	-6.2
32	-6.9	96	-6.2
127	-6.9	95	-6.1
129	-6.9	107	-6.1
34	-6.8	126	-6.1
115	-6.8	136	-6.1
123	-6.7	133	-6
118	-6.6	92	-5.9
24	-6.5	93	-5.9
46	-6.5	121	-5.7
94	-6.5	124	-5.7
110	-6.5	122	-5.6
50	-6.4	135	-5.6
103	-6.4	128	-5.4

Tabla A 3. Energía de afinidad obtenida en acoplamiento molecular frente a *AbFtsZ*. (Energía de afinidad ≤ -7.0 Kcal/mol)

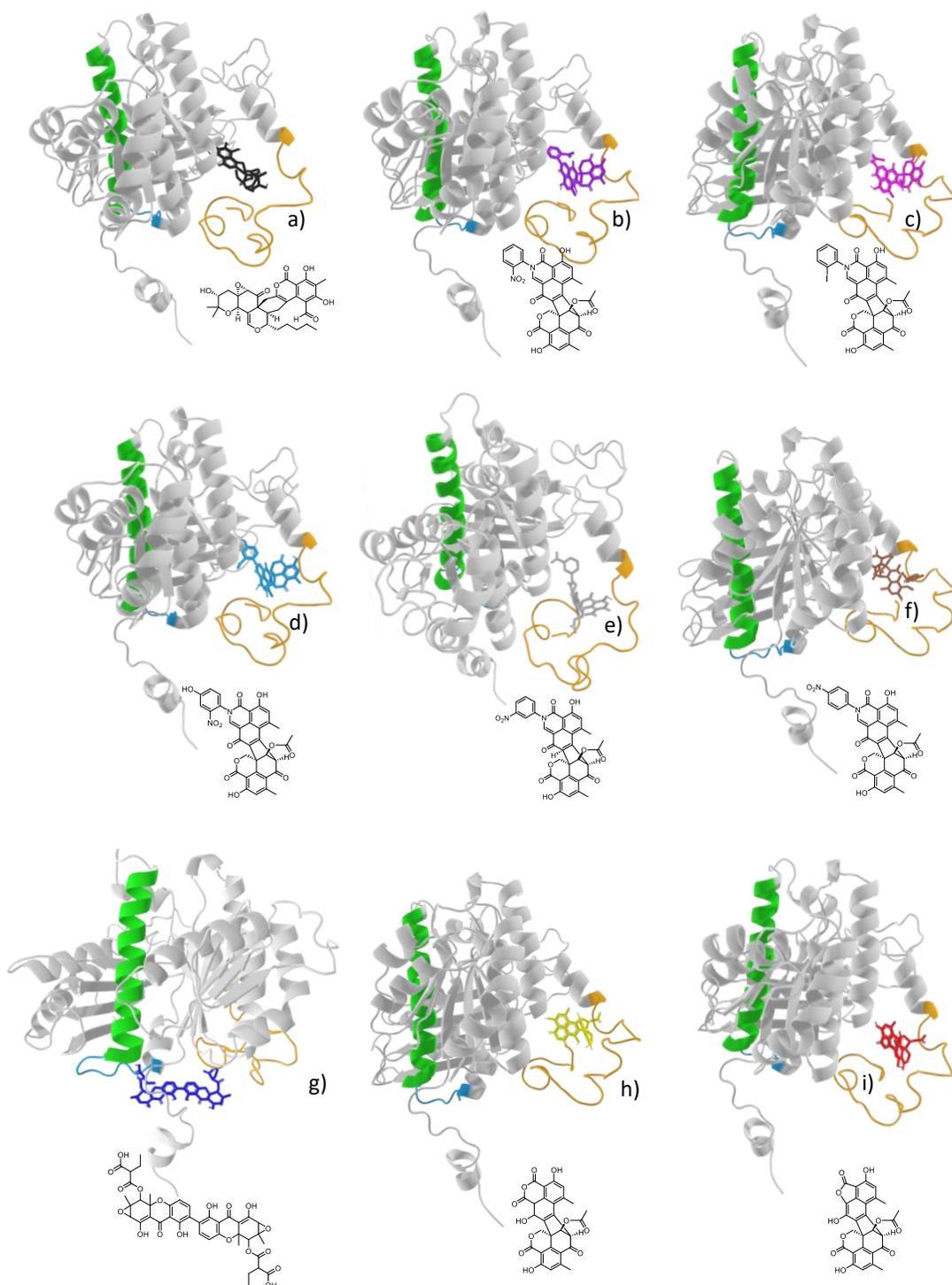


Figura AI 1. Sitios de interacción de los ligantes en el complejo más estable predicho en el acoplamiento molecular ligante-AbFtsZ. Ligantes a) 15, b) 52, c) 53, d) 56, e) 58, f) 66, g) 97, h) 142, i) 143.

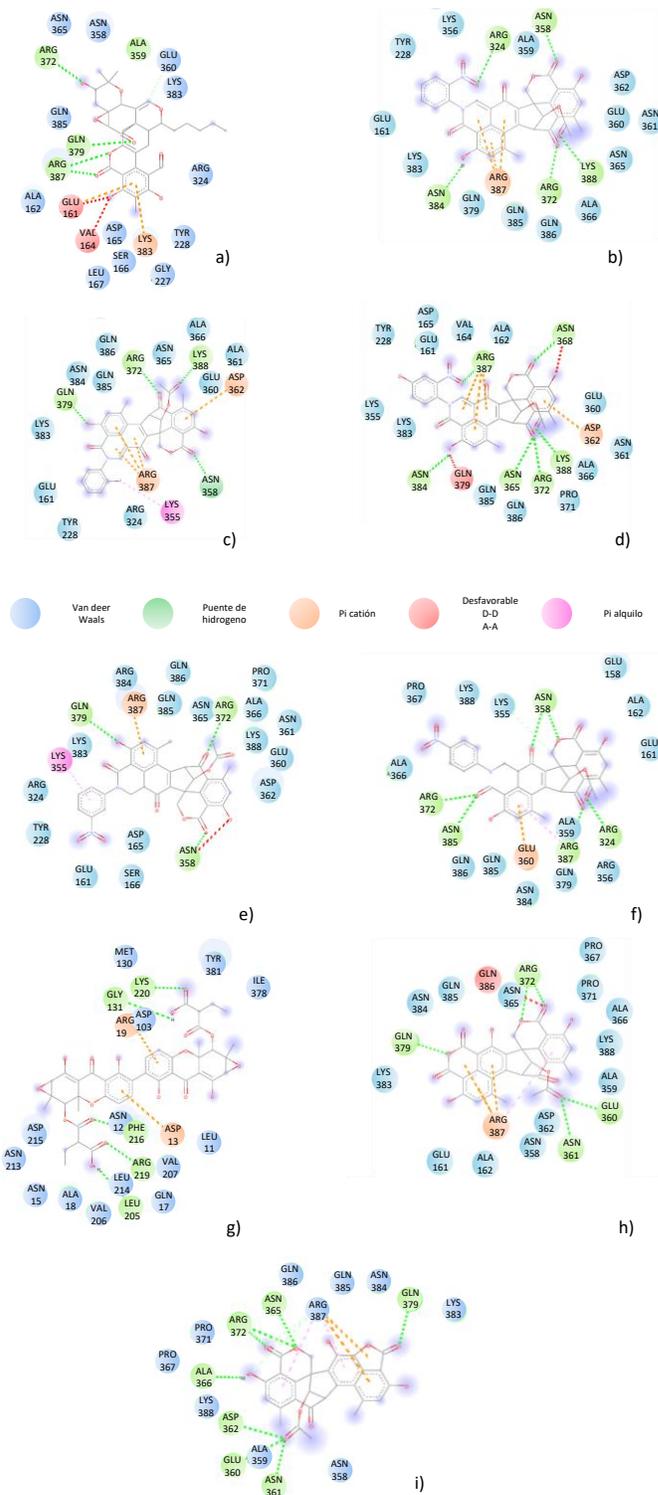


Figura A12. Aminoácidos de *AbFtsZ* que interaccionan en el sitio de unión teórico ligante-proteína, de acuerdo con el complejo más estable predicho en el acoplamiento molecular. Ligantes (a) 15, (b) 52, (c) 53, (d) 56, (e) 58, (f) 66, (g) 97, (h) 142, (i) 143.



Estudios teóricos de interacción ligante-proteína de metabolitos secundarios de origen fúngico con la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* y su evaluación *in vitro*

Marlen Parra Sánchez, Carlos Daniel Quezada Suaste, Karol Carrillo Jaimes, Enrique Aguilar Ramirez, José Rivera Chávez
 Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM.

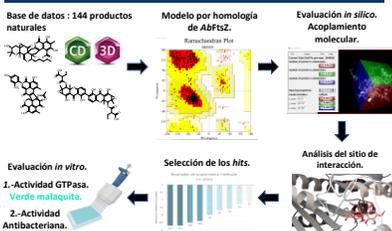
Resumen

Se estima que la resistencia a los antibacterianos podría causar la muerte de 10 millones de personas al año en 2050. En 2017, la OMS enumeró las bacterias con mayor relevancia clínica, destacando *Acinetobacter baumannii*. En este sentido, se seleccionó la proteína FtsZ de *A. baumannii* como blanco molecular (AbFtsZ) para la búsqueda de antimicrobianos de nueva generación con mecanismos de acción novedosos. El objetivo principal del proyecto fue identificar inhibidores de AbFtsZ mediante estudios de acoplamiento molecular y ensayos *in vitro* de interacción con la enzima e inhibición del crecimiento bacteriano. Se partió de una base de datos de 300 moléculas de origen fúngico y derivados semisintéticos, donde se obtuvieron 50 aciertos teóricos mediante tamizaje virtual y se evaluaron 8 moléculas *in vitro*, de estas dos interaccionan con FtsZ y muestran actividad antibacteriana.

Objetivo General

Descubrir ligandos para la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* (AbFtsZ) empleando estudios de acoplamiento molecular y una base de datos de moléculas de origen fúngico.

Metodología



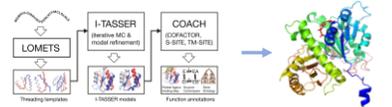
Ensayo de inhibición de la actividad de FtsZ



Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano



Obtención del Modelo de FtsZ de *A. baumannii* por Homología



Referencias

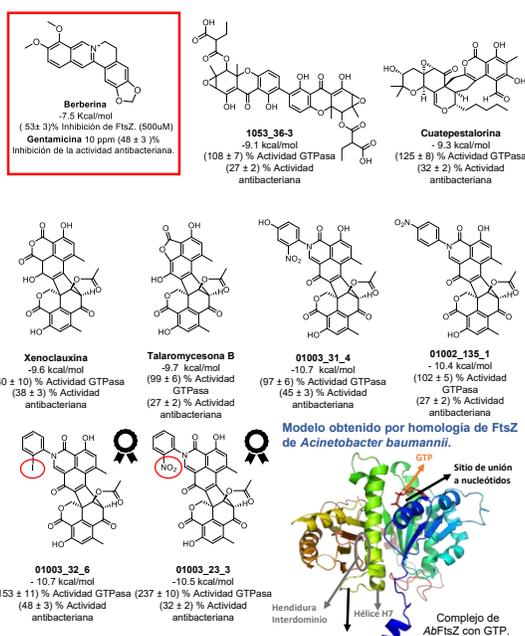
John Valoria, et al. Developing Colorimetric and Luminescence-Based High-Throughput Screening Platforms for Monitoring the GTPase Activity of Ferrous Ion Transport Protein 5 (FtsZ). *SLAS Discovery*, 2019, pp. 595. Automation and Screening DOI: 10.1177/0429522918848472

Jun O. Nash. Talking drug-resistant infections globally. Final Report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance, 2017.

Organización Mundial de la Salud. OMS (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente antibióticos. Recuperado de 4 de mayo del 2022, <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-needed>

Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, Vol. 399 Issue 10235, pp.629-655. 27p. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00724-0. Database: Academic Search Ultimate

Resultados



Conclusión

La incorporación de un anillo aromático sustituido en orientación orto en las fenolenonas dimericas favoreció la inhibición del crecimiento bacteriano.

Con el acoplamiento molecular se seleccionaron 9 ligandos potenciales de FtsZ, de los cuales 2 tuvieron interacciones favorables en el ensayo *in vitro*.

FtsZ es un blanco molecular adecuado para la identificación de moléculas con potencial antimicrobiano.

El acoplamiento molecular es un método auxiliar efectivo en el descubrimiento de moléculas con actividad antibacteriana.

Agradecimientos

A CONACYT por el financiamiento del proyecto CF-2019-263977.
 A la UNAM por el financiamiento de los proyectos DGAPA-PAIIT IA207422 e IA203220.
 A la DGIC por las horas de cómputo otorgadas a través del proyecto LANCAD-UNAM-DGIC-374.



Figura AI 3. Cartel. Simposio 2022 del Instituto de Química, UNAM.



EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Marlen Parra Sánchez

POR PRESENTAR EL TRABAJO:

Estudios teóricos de interacción ligante-proteína de metabolitos secundarios de origen fúngico con la proteína FtsZ de *Acinetobacter baumannii* y su evaluación in vitro

**QUE RECIBIÓ EL RECONOCIMIENTO COMO UNO DE LOS
DOS MEJORES TRABAJOS DE LA CATEGORÍA DE:**

Licenciatura

entre los presentados en el Simposio 2022 del Instituto de Química,
que se llevó a cabo el martes 13 de diciembre de 2022.



Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
DIRECTOR

Figura AI 4. Reconocimiento del Simposio 2022 del Instituto de Química.