



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

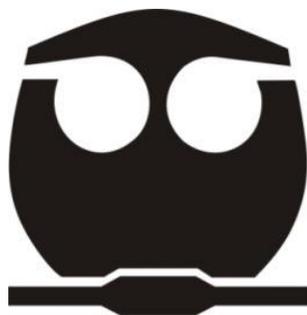
**Estudio computacional de un modelo del posible sitio de
unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y
protozoarios**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Rodrigo Aguayo Ortiz



MÉXICO, D.F.

Año 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:	María Alicia Hernández Campos
VOCAL:	J. Eleazar Martínez Barajas
SECRETARIO:	Francisco Hernández Luis
1er. SUPLENTE:	Elena Guadalupe Ramírez López
2° SUPLENTE:	Vanessa Rebeca Maya Ampudia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 122, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María Alicia Hernández Campos

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Oscar Méndez Lucio

SUSTENTANTE:

Rodrigo Aguayo Ortiz

A mis padres (Estela y Benjamín)

Gracias por ser unos padres excepcionales, por apoyarme y motivarme a cumplir todas mis metas y propósitos, así como por todo el amor que siempre me han brindado. Este trabajo es por ustedes y para ustedes. Los amo.

A mis hermanos (Estíbaliz y Alejandro)

Gracias por las risas, las pláticas e incluso las peleas, por apoyarme en todo lo que hacía o me proponía, y por estar siempre a mi lado. Gracias por ser mis hermanos. Los quiero.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por haberme brindado la oportunidad de ser parte de ella y formarme en el ámbito profesional y personal.

A la M. en C. Alicia Hernández Campos, por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por el apoyo en la realización de esta tesis y por permitirme seguir mis sueños. También quiero agradecerle por haber soportado mi carácter, por su confianza, por haberme escuchado en los momentos difíciles, y por enseñarme que la formación personal es parte importante de la formación profesional. Muchas gracias.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por haberme permitido ser parte del Laboratorio 122, así como por los consejos personales y académicos que me motivaron a continuar esforzándome para alcanzar mis metas.

Al M. en C. Oscar Méndez Lucio, por las enseñanzas, regaños y presiones que me motivaron a iniciar y concretar este trabajo y, porque a pesar de la distancia y la diferencia de horarios, sigue apoyándome en cada proyecto que me propongo. Por ello y más, agradezco que sea mi maestro y amigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada en el proyecto 80093 para la realización de esta tesis.

Al colegio de profesores de la Facultad de Química por el apoyo económico brindado para la realización e impresión de este trabajo de tesis, al otorgarme la cátedra “Raúl Cetina Rosado” (semestre 2012-2).

Al la DGSCA – UNAM, por las claves otorgadas, a nombre del Dr. Rafael Castillo Bocanegra, para el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 4000 (KanBalam).

A los miembros del jurado por sus valiosas correcciones y observaciones al presente trabajo de tesis.

A Jessica Granados Pineda, por haber estado conmigo durante toda la carrera y por ser mí mejor amiga.

A Nayeli López Balbiaux, por haberme llevado al Laboratorio 122, el que ahora es mi segundo hogar, por ser una profesora excepcional y una entrañable amiga.

A la Dra. Perla Castañeda López, por haberme apoyado, consolado y escuchado a lo largo de toda mi carrera.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia, por las grandes aportaciones realizadas durante el planteamiento y desarrollo del presente manuscrito.

A la M. en C. Silvia P. Melchor Doncel de la Torre, por haberme permitido involucrarme en este tema de investigación y por su valiosa amistad.

Un agradecimiento especial al Q.F.B. Pedro Trejo Soto y a los M. en C. Carlos Méndez Cuesta, Antonio Romo Mancillas y Jaime Pérez Villanueva, por su intervención en la realización del presente trabajo, por sus enseñanzas y regaños, bajándome puntos y diciéndome “lo estás haciendo mal”, y por ser un claro ejemplo de que en esta universidad hay personas brillantes y dignas de ser admiradas.

A mis compañeros de laboratorio 122: Berenice, Paulina, Pedro G. P., Eduardo, Miguel, Armando, Rodrigo A. T., Rodrigo P. H., por su compañerismo y amistad. Quiero agradecer en especial a Nayeli González, Lucía Cano y Carlos Carvente, por haberme permitido asesorarlos en sus proyectos, enriqueciendo enormemente mi formación.

A todos mis amigos, especialmente a Fabiola, Tania Berrocal, Itzel, Francisco Vera y Grisela, por su amistad, que fue una pieza clave para la culminación de mis estudios.

A todos aquellos profesores y compañeros de la Facultad de Química que contribuyeron directa o indirectamente a mi formación personal y profesional.

“Memoria selectiva para recordar lo bueno, prudencia lógica para no arruinar el presente,
y optimismo desafiante para encarar el futuro”

Isabel Allende

“When I was 5 years old, my mother always told me that happiness was the key to life.
When I went to school, they asked me what I wanted to be when I grew up. I wrote down
'happy'. They told me I didn't understand the assignment, and I told them they didn't
understand life”

John Lennon

“The most important motive for work in school and in life is pleasure in work, pleasure in
its result, and the knowledge of the value of the result to the community”

Albert Einstein

“Computers are incredibly fast, accurate, and stupid. Human beings are incredibly slow,
inaccurate, and brilliant. Together they are powerful beyond imagination”

Leo Cherne / Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS GENERALES	i
ABREVIATURAS DE COMPUESTOS	iii
ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS.....	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Enfermedades parasitarias y tratamiento	2
2.2. Bencimidazoles: derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo	2
2.2.1. Características estructurales	4
2.2.2. Farmacocinética	5
2.2.3. Farmacodinámica	7
2.3. Los microtúbulos	8
2.3.1. Mecanismo de polimerización y despolimerización	9
2.3.2. Moléculas que se unen a la tubulina.....	11
2.3.2.1. Inhibición competitiva con la colchicina.....	13
2.3.3. Modelos teóricos del sitio de unión de bencimidazoles	14
2.3.3.1. Modelo de Louisa M. MacDonald.....	14
2.3.3.2. Modelo de Mark W. Robinson.....	15
2.3.3.3. Modelo de Om Prakash Sharma.....	15
2.4. Resistencia a fármacos antiparasitarios.....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. Objetivo General	20
5.2. Objetivos Particulares	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1. Identificación y alineamiento de secuencias	21
6.2. Construcción de los modelos de β -tubulina.....	23
6.2.1. Modelado por homología	24
6.2.1.1. Validación de los modelos.....	24
6.2.2. Modelado por reemplazo de residuos.....	24

6.3. Estudio de acoplamiento molecular.....	25
6.3.1. Preparación de las proteínas.....	25
6.3.2. Preparación de los ligandos.....	25
6.3.3. Acoplamiento molecular.....	26
6.4. Dinámica molecular.....	26
6.5. Propuestas para el diseño de fármacos.....	27
6.5.1. Diseño de fármacos asistido por computadora.....	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1. Identificación y alineamiento de secuencias.....	28
7.2. Construcción del modelo de β -tubulina.....	33
7.2.1. Modelado por homología.....	37
7.3. Acoplamiento molecular.....	42
7.3.1. Acoplamiento molecular con modelos silvestres.....	42
7.3.2. Acoplamiento molecular con mutaciones de resistencia.....	56
7.3.3. Inhibición competitiva con la colchicina.....	62
7.4. Dinámica molecular.....	63
7.4.1. Evaluación de modelos sin ligandos.....	63
7.4.2. Evaluación del modelo WT de <i>T. spiralis</i> con ligandos.....	66
7.4.3. Evaluación de los modelos con ligandos.....	71
7.5. Propuestas para el diseño de fármacos.....	76
7.5.1. Propuestas para los modelos silvestres.....	77
7.5.2. Propuestas para el modelo con la mutación E198A.....	77
7.5.2.1. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC).....	78
8. CONCLUSIONES.....	87
9. PERSPECTIVAS.....	90
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÉNDICE 1. Fundamentos teóricos.....	101
APÉNDICE 2. Principales derivados bencimidazólicos.....	115
APÉNDICE 3. Identificación de las secuencias de las isoformas de β-tubulina.....	117
APÉNDICE 4. Selección del servidor para generar los modelos de β-tubulina.....	120
APÉNDICE 5. Validación de los modelos.....	121

ABREVIATURAS GENERALES

AA	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADT	AutoDock Tools
AFS	acoplamiento fuera del sitio
AM	acoplamiento molecular
APH	grupos aceptores de puentes de hidrógeno
BLAST	Del inglés: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BT	isoforma de β -tubulina
BZ	bencimidazol
CS	Del inglés: <i>Cluster size</i>
$\Delta G_{\text{unión}}$	energía libre de Gibbs de unión
DM	dinámica molecular
DOPE	Del inglés: <i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DPH	grupos donadores de puentes de hidrógeno
E198A	mutación en la posición 198 de un ácido glutámico por una alanina
E_{Coul}	energía de Coulomb
E_{int}	aproximación de la energía de interacción
E_{LJ}	energía de Lennard-Jones
Eg	<i>Echinococcus granulosus</i>
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
Em	<i>Echinococcus multilocularis</i>
ERig	enlaces rígidos
ERot	enlaces rotables
F167Y	mutación en la posición 167 de una fenilalanina por una tirosina
F200Y	mutación en la posición 200 de una fenilalanina por una tirosina
Fh	<i>Fasciola hepatica</i>
GDP	guanosín difosfato
Gi	<i>Giardia intestinalis</i>
GROMACS	Del inglés: <i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>

GTP	guanosín trifosfato
ID	porcentaje de identidad
K	Kelvin
kcal/mol	kilocalorías por mol
logP	coeficiente de partición octanol-agua
M	molaridad
Mex	<i>Moniezia expansa</i>
MM	mecánica molecular
MT	mutación
NCBI	Del inglés: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanómetro (s)
NPH	número de puentes de hidrógeno
ns	nanosegundo (s)
Oa	<i>Ovis aries</i>
OEt	etoxilo
OMe	metoxilo
PDB	Del inglés: <i>Protein Data Bank</i>
PM	peso molecular
PME	partículas en malla de Ewald
ps	picosegundo (s)
R	resistente
RMSD	Del inglés: <i>Root Mean Square Deviation</i>
S	susceptible
SAR	Del inglés: <i>Structure-Activity Relationship</i>
SNPs	polimorfismos de un solo nucleótido
tPSA	superficie polar del espacio topológico
Ts	<i>Trichinella spiralis</i>
Tso	<i>Taenia solium</i>
UniProt	Del inglés: <i>Universal Protein Resource</i>
WT	silvestre

ABREVIATURAS DE COMPUESTOS

ABZ	albendazol
ABZSO	sulfóxido de albendazol
CBZ	carbendazim
FBZ	fenbendazol
FBZSO	sulfóxido de fenbendazol
FPA1	[5-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]metilcarbamato de metilo
FPA2	1-metil-5-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo
GNV-ABZ	1-metil-5-(propiltio)-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol
GNV-MBZ	[1-metil-2-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-il]fenilmetanona; <i>5-benzoil-1-metil-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol</i>
G2N	[(2 <i>R</i>)-5amino-2-metil-3-fenil-1,3-dihidropirido[3,4- <i>b</i>]pirazin-7-il]carbamato de etilo
LBZ	luxabendazol
MBZ	mebendazol
NZ	nocodazol
OBZ	oxibendazol
PBZ	parbendazol
TBZ	tiabendazol
TCBZ	triclabendazol

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

1 Letra	3 letras	Aminoácido
A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr	tirosina

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias, causadas por helmintos y protozoarios, ocupan el onceavo lugar en la lista del *Tropical Disease Research* (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), afectando principalmente a países en vía de desarrollo y en menor grado a países desarrollados. Actualmente, varios de los parásitos responsables de dichas enfermedades han generado resistencia a los fármacos de elección, principalmente a bencimidazoles, por lo cual surge la necesidad de desarrollar nuevas moléculas con actividad antiparasitaria capaces de eludir dichos mecanismos de resistencia.

Hoy en día existen reportes de varios estudios que demuestran que los bencimidazoles, principalmente los derivados del carbendazim (bencimidazol-2-il carbamato de metilo), actúan inhibiendo el mecanismo de polimerización de los microtúbulos al unirse a nivel del monómero β de la subunidad heterodimérica de tubulina que conforman a estas estructuras; por lo que la inhibición de este mecanismo se pondera como un posible blanco para el diseño de antiparasitarios.

La problemática actual del estudio de la β -tubulina de parásito, para el diseño de nuevos fármacos, recae en el hecho de que no existen registros acerca de la estructura tridimensional de alguna tubulina de helminto o protozario en las bases de datos disponibles, por ejemplo *Protein Data Bank* (PDB). Por esta razón, durante este estudio fue necesario recurrir a técnicas de predicción de estructuras macromoleculares para proponer la estructura tridimensional de la β -tubulina de algunos parásitos. Basados en estas estructuras se logró identificar un posible sitio de unión que nos permitió correlacionar los resultados de actividad, resistencia e inhibición competitiva de registros anteriores. Para poder corroborar la validez del sitio de unión propuesto, se implementaron técnicas computacionales tales como el acoplamiento molecular (*docking*) y cálculos de dinámica molecular, los cuales permitieron identificar las características estructurales necesarias para la actividad antiparasitaria. Adicionalmente, se propuso una nueva molécula, como posible estructura líder, fundamentada en el análisis estructural y en un estudio de *screening* virtual.

La información generada de este estudio será una herramienta valiosa para optimizar el diseño de fármacos antiparasitarios activos inclusive contra algunas cepas resistentes de helmintos y protozoarios.

2. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades parasitarias y tratamiento

Las infecciones parasitarias causadas por helmintos y protozoarios constituyen un problema médico y sanitario tanto en humanos como en animales, siendo la principal causa de pérdidas económicas en producción de ganado. Por esta razón, se han desarrollado diferentes estrategias para contrarrestar el efecto nocivo de los parásitos (medidas sanitarias, control biológico, selección de animales resistentes, etc.); sin embargo, la quimioterapia continúa siendo una herramienta fundamental para los productores en la lucha contra la parasitosis. Actualmente existen tres grupos de fármacos antihelmínticos de amplio espectro para el tratamiento de las parasitosis. En el Grupo 1 se encuentran los bencimidazoles (BZ); en el Grupo 2, los imidazotiazoles (ej. levamisol) y tetrahidropirimidinas (pirantel/morantel), y al Grupo 3 pertenecen las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas); cada grupo posee un mecanismo de acción muy diferente. El uso intensivo y la administración inadecuada de estos grupos de fármacos, en épocas y grupos de rumiantes no apropiados, han contribuido al desarrollo de resistencia hacia éstos, principalmente a los fármacos que constituyen el Grupo 1. En esta clasificación se encuentran los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (carbendazim, CBZ), los cuales son los más comunes en el mercado, por lo que la resistencia de los parásitos hacia estos derivados ha generado un alto impacto a nivel global.^{1,2}

2.2. Bencimidazoles: derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria ha propiciado el descubrimiento de un gran número de moléculas orgánicas, principalmente derivados del bencimidazol. El núcleo de bencimidazol se considera una estructura privilegiada puesto que posee características químicas que favorecen su efecto a nivel biológico. Por esta razón, varios investigadores continúan ensayando modificaciones a su estructura con el fin de optimizar la bioactividad de la misma.³ El desarrollo de bencimidazoles como fármacos antihelmínticos inició en 1961 cuando Brown descubrió el tiabendazol (TBZ) y su uso en el tratamiento de parásitos gastrointestinales, el cual sustituyó a la fenotiacina al poseer un amplio espectro y baja toxicidad. A partir del TBZ se sintetizaron nuevos compuestos de mayor espectro y potencia que actúan contra nematodos (gastrointestinales y pulmonares),

cestodos y trematodos. Algunos derivados también han sido utilizados como antiprotozoarios, antifúngicos y antibacterianos.⁴

Los compuestos bencimidazólicos de mayor interés para el tratamiento de las parasitosis son derivados del CBZ, también denominados bencimidazol-2-carbamatos o carbamatos bencimidazólicos. Las diferencias entre los compuestos de este grupo radican en la modificación de la sustitución del carbono 5 del núcleo de bencimidazol, lo cual da lugar a diferencias en la farmacocinética y espectro de los mismos (Apéndice 2).¹ Varios de estos derivados han sido empleados para el tratamiento de las parasitosis de humano y ganado, y su eficiencia depende del organismo al cual se intente erradicar (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Fármacos bencimidazólicos más empleados contra las parasitosis⁵

Grupo	Parásito	Bencimidazol
Nematodos	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Albendazol, mebendazol, albendazol + ivermectina*, albendazol + dietilcarbamazina*, mebendazol + levamisol*, mebendazol + pirantel*
	<i>Trichuris trichiura</i>	
	<i>Trichinella spiralis</i>	
	<i>Necator americanus</i>	
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	
	<i>Enterobius vermiculairs</i>	Albendazol
	<i>Haemonchus contortus</i>	Fenbendazol, oxfendazol, albendazol, mebendazol, sulfóxido de albendazol
	<i>Cooperia</i> spp.	
	<i>Nematodirus</i> spp.	
	<i>Trichostrongylus</i> spp.	
Cestodos	<i>Taenia solium</i>	Albendazol
	<i>Taenia saginata</i>	
	<i>Echinococcus</i> spp.	Albendazol, mebendazol
	<i>Moniezia expansa</i>	Albendazol, sulfóxido de albendazol, fenbendazol, oxfendazol, mebendazol
Trematodos	<i>Fasciola hepatica</i>	Triclabendazol**, compuesto Alfa** (ABZ, únicamente en la etapa adulta)
	<i>Fasciola gigantica</i>	
	<i>Paragonimus</i> spp.	Triclabendazol**

Notas: (*) Fármacos, no bencimidazólicos, utilizados en terapias combinatorias. (**) Bencimidazoles no carbamatos de metilo.

Los principales grupos de helmintos causantes de enfermedades parasitarias (helminiosis) son los nematodos, cestodos y trematodos. Más de la mitad de la población mundial se encuentra infectada por estos parásitos. Actualmente las helminiosis no pertenecen a las principales causas de muerte en humanos, sin embargo, su alta incidencia en la población presenta efectos crónicos dañinos para el hospedero, al reducir su calidad de vida. Los nematodos gastrointestinales y sistémicos son los principales causantes de dichas enfermedades en humanos, dentro de los primeros se encuentran las infecciones por *Ascaris* spp. (ascariasis), *Taenia solium* (cisticercosis y teniasis) y *Trichinella spiralis* (trichinellosis), mientras que las infecciones sistémicas son causadas por *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti* (filariasis). Otro grupo importante son los causantes de las enfermedades zoonóticas, como *Fasciola hepatica* (fasciolosis) y *Echinococcus* spp. (hidatidosis). Los fármacos utilizados para el tratamiento de estas parasitosis se enlistan en la Tabla 2.1.⁵

Los derivados del CBZ también han demostrado tener actividad contra algunos protozoarios tales como *Giardia intestinalis* (también conocida como *G. lamblia* o *G. duodenalis*) y *Trichomonas vaginalis*, pero no así contra *Entamoeba histolytica*, *Leishmania* spp. y *Acanthamoeba polyphaga*, en los cuales presentan baja o nula actividad.⁶ Actualmente, se han diseñado nuevos derivados bencimidazólicos que poseen mayor actividad contra estos organismos, en varios de los cuales se modifica el grupo carbamato de metilo por un trifluorometilo (-CF₃) o un dimetilaminoetiltilio [-S(CH₂)₂N(CH₃)₂]. De la misma manera, se realizan modificaciones en la posición 4, 5 y/ó 6 del bencimidazol por halógenos (Cl y Br).^{5,7}

2.2.1. Características estructurales

Varios autores han reportado diferencias en la actividad antiparasitaria al haber realizado pequeñas modificaciones al núcleo de bencimidazol. Estos resultados han permitido llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés) que indican la importancia de la modificación estructural para potenciar o atenuar la actividad biológica, varias de las cuales se reportan en la Tabla 2.2 del presente trabajo. También brindan información importante para determinar las posibles características que posee el sitio donde se une el derivado bencimidazólico, y las futuras propuestas de modificación para aumentar dicha actividad.

Tabla 2.2. Requerimientos estructurales en bencimidazoles para poseer actividad antihelmíntica ^{3,8,9}

Región	Cambios Estructurales	Comentarios
A	R ₂ = OMe, OEt, Me, Et, etc.	Los compuestos con OMe presentan mayor actividad. Si se sustituye el hidrógeno del nitrógeno del carbamato por un grupo alquilo, la actividad disminuye.
B	Sustitución de uno de los nitrógenos con: O, S o CH	La presencia del grupo guanidino es esencial para la actividad antihelmíntica.
C	R ₁ = H, Me, COR, Arilo, etc.	La presencia del H es esencial. La sustitución por un alquilo conlleva a la pérdida de la actividad.
D	Inserción de un nitrógeno en el anillo bencénico	La sustitución disminuye la actividad.
E	X= O, S, SO, SO ₂ , CO, etc.	Son espaciadores farmacofóricos esenciales que determinan la selectividad y afinidad del fármaco por el sitio de unión. Se tiene una óptima actividad cuando X= O, CO, S y SO.
F	R ₃ = alquilos, cicloalquilos, alquenos, arilos y heteroarilos	Determina el perfil de afinidad del bencimidazol por el sitio de unión.

2.2.2. Farmacocinética

Los fármacos antiparasitarios son eficaces cuando logran alcanzar concentraciones tóxicas, y por un periodo lo suficientemente prolongado, en el sitio donde se localiza el parásito, sin que se afecte al hospedero.¹⁰ Los derivados bencimidazólicos generalmente presentan un

tiempo corto de vida-media, puesto que poseen una alta susceptibilidad a ser biotransformados por reacciones metabólicas de fase I y II, las cuales facilitan su eliminación al incrementar su solubilidad.³ Actualmente se sabe que el pasaje a través de la capa transtegumentaria-transcuticular es el mecanismo más importante de absorción de fármacos en helmintos, por lo que su solubilidad es indispensable para que ocurra dicha absorción.¹¹ Estudios recientes han demostrado que la baja solubilidad de los carbamatos bencimidazólicos afecta su eficacia en infecciones sistémicas humanas, haciendo de la absorción y biotransformación factores importantes a considerar durante el diseño de este tipo de compuestos. Con base en esto se ha encontrado que los principales productos metabólicos del albendazol y del fenbendazol son el sulfóxido de albendazol (ABZSO) [también conocido como ricobendazol (RBZ)], el sulfóxido de fenbendazol (FBZSO) [también conocido como oxfendazol (OFZ)], y sus respectivos derivados sulfonados (ABZSO₂ y FBZSO₂). La oxidación de ambos fármacos se encuentra mediada por la actividad de los sistemas enzimáticos flavin-monooxigenasa y citocromo P450, cuyo primer metabolito de oxidación, el sulfóxido, presenta alta actividad antiparasitaria, mientras que el segundo metabolito de oxidación, la sulfona, es inactivo. El átomo de azufre presente en las estructuras del ABZ y el FBZ actúa como centro pro-quiral, por lo que durante el proceso de oxidación se puede obtener a las especies enantioméricas correspondientes (Figura 2.1).^{12,13}

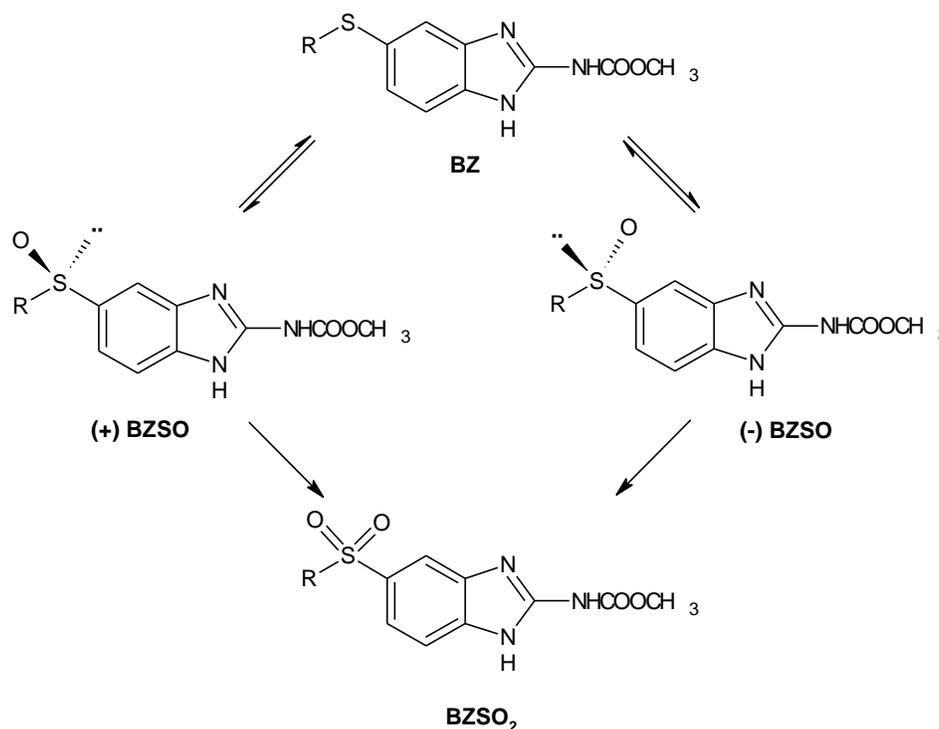


Figura 2.1. Ruta metabólica del albendazol (R: CH₃CH₂CH₂-) y fenbendazol (R: C₆H₅-).¹⁴

Los estudios indican que la primera oxidación de estos fármacos permite un aumento en la solubilidad y eficacia contra parásitos susceptibles, pero también se ha observado que disminuye su difusión al incrementar la susceptibilidad a ser oxidados a la sulfona correspondiente. Reportes existentes sobre la biotransformación estereoselectiva de estos fármacos indican que el (+)-ABZSO podría ser el entantiómero con mayor actividad antiparasitaria, principalmente contra los nematodos *T. spiralis*, *H. contortus* y *Ascaris* spp., mientras que el entantiómero (-)-ABZSO resulta ser el principal sustrato para la producción del ABZSO₂. Es posible que las diferencias de actividad antihelmíntica de los enantiómeros se deban al tipo de difusión pasiva y a la afinidad por las proteínas citosólicas. En el caso del OFZ no se indica el metabolito enantiomérico prioritario para la actividad, pero sí se sabe que éste podría no ser el principal metabolito de eliminación del FBZ.¹⁴⁻¹⁶

Una metodología empleada para mejorar la distribución de los carbamatos bencimidazólicos, es la formación de probencimidazoles como el febantel y el netobimin. Estas moléculas son profármacos inactivos que se convierten enzimáticamente en carbamatos bencimidazólicos una vez que son absorbidos por el parásito.¹

2.2.3. Farmacodinámica

El mecanismo de acción de un fármaco permite determinar la causa del efecto antiparasitario y el riesgo para el desarrollo de resistencia a ese grupo de fármacos.² Inicialmente se había propuesto a la inhibición de la captura de glucosa y del almacenamiento de glicógeno como posibles mecanismos de acción de los bencimidazoles. Tiempo después Borgers demostró, mediante estudios ultraestructurales, que el principal efecto del mebendazol sobre *Ascaris suum* era la desintegración de las estructuras microtubulares, por lo que concluyó que el mecanismo prioritario de acción era a través de la inhibición de la polimerización de la tubulina del parásito.⁴ Actualmente existen reportes de estudios que se han enfocado en correlacionar las bases moleculares de resistencia con el mecanismo de acción, con el fin de localizar el sitio de unión de los bencimidazoles y las causas por las que modificaciones en el mismo, disminuyen la actividad antiparasitaria de los inhibidores.¹⁷ Varios autores encontraron que las principales mutaciones que proveen de resistencia a los parásitos contra los bencimidazoles, se encuentran en uno de los monómeros que conforman a la unidad básica heterodimérica del microtúbulo, la β -tubulina.¹⁸⁻²⁰ Vale la pena mencionar que existen otros derivados del bencimidazol que no pertenecen al grupo de los carbamatos

bencimidazólicos y que poseen el mismo mecanismo de acción, tales como el triclabendazol y el compuesto Alfa; sin embargo, se cree que tienen sitios de unión diferentes debido a que presentan actividad contra parásitos diferentes a los susceptibles a los carbamatos bencimidazólicos.⁵

2.3. Los microtúbulos

Son estructuras filamentosas de aproximadamente 25 nm de diámetro y longitud variada, los cuales adquieren su estructura cilíndrica a partir de la asociación de protofilamentos. Estos a su vez se componen de una serie alternada de dos unidades monoméricas altamente relacionadas y conservadas, la α - y la β -tubulina, que se encuentran asociadas a nucleótidos de guanina (GTP/GDP) e iones de Mg^{2+} . Los microtúbulos se encuentran involucrados en mecanismos de mantenimiento (citoesqueleto), división (principal componente del huso mitótico) y motilidad celular (cilios y flagelos). Por éstas y otras razones, los microtúbulos son considerados estructuras de gran importancia para la supervivencia de la célula. Es probable que el mayor efecto antihelmíntico se tenga a nivel del transporte citoplasmático.^{5,21}

Los microtúbulos en trematodos y cestodos están constituidos, al igual que en mamíferos, por 13 protofilamentos, a diferencia de los nematodos los cuales están constituidos por 11. El estudio del comportamiento y composición de la tubulina de parásitos multicelulares se ha llevado a cabo mediante el empleo del nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo. Reportes de estudios en este parásito han permitido determinar el mecanismo por el cual funciona la tubulina, así como también ha permitido formular una serie de hipótesis y cuestionamientos acerca del diseño y administración de bencimidazoles como fármacos antihelmínticos.⁵ A diferencia de la tubulina de mamífero, hasta el momento no se ha registrado la resolución de alguna estructura cristalográfica correspondiente a la tubulina de algún helminto o protozoario, es por esto que su estudio es de alta complejidad.²¹ Varios autores han empleado estructuras de mamífero como *plantilla* para la construcción de modelos de tubulina de parásito, basándose en la alta homología de la secuencia nucleotídica y, por tanto, aminoacídica de algunos helmintos (ej. *H. contortus*, *B. malayi*, etc.) comparadas con las de mamíferos (ej. *Ovis aries*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*).²¹⁻²⁴ Es interesante mencionar que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la polimerización y despolimerización de los microtúbulos sigue el mismo principio en parásitos que en mamíferos.

2.3.1. Mecanismo de polimerización y despolimerización

Los microtúbulos tienen la capacidad de asociarse (polimerización) y disociarse (despolimerización) de forma reversible para llevar a cabo varios procesos celulares (Figura 2.2). En el dímero de tubulina la subunidad α siempre mantiene la molécula de GTP, por lo que es denominado como sustrato no-intercambiable (sitio-N), mientras que el nucleótido asociado a la subunidad β (sitio-E) puede ser intercambiado libremente. Inicialmente, la subunidad β intercambia la molécula de GDP por una de GTP para posteriormente desfosforilarla y que pueda unirse al extremo terminal del microtúbulo (extremo +) durante el crecimiento de éste (Figura 2.2a). El microtúbulo con tubulina unida a GDP es más inestable que el que posee GTP, debido a la débil unión que este heterodímero presenta con las subunidades vecinas, de tal manera que al terminar la polimerización éste se ve forzado a desensamblarse, reduciendo el tamaño del microtúbulo. A esta alternancia se le conoce como inestabilidad dinámica (Figura 2.2b).²⁵

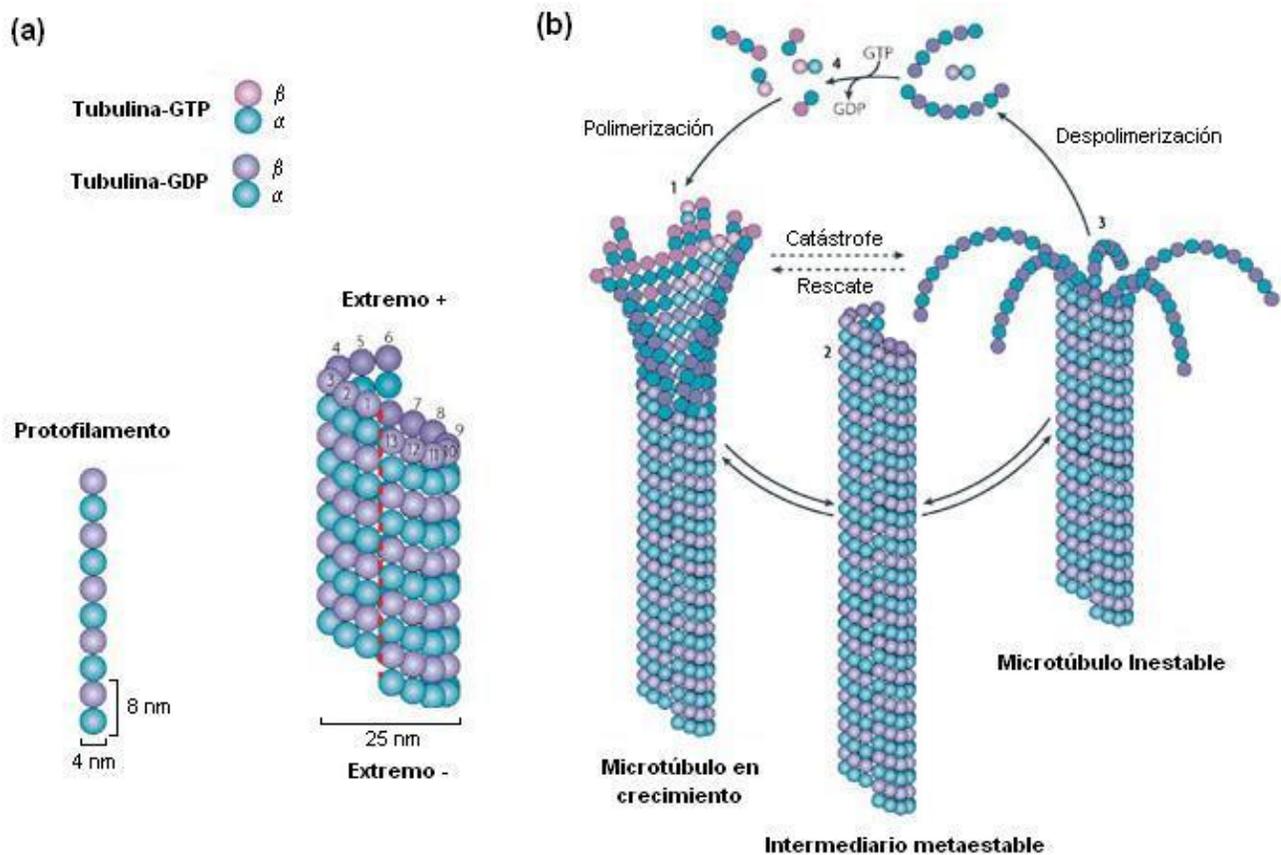


Figura 2.2. (a) Composición estructural y dimensional de los microtúbulos; (b) Ciclo de inestabilidad dinámica de un microtúbulo.²⁶

Los monómeros de tubulina se asocian para conformar el heterodímero de α/β -tubulina, unidad básica de los microtúbulos, la cual es una estructura con alta estabilidad y solubilidad que permite formar a los microtúbulos mediante un mecanismo de polimerización y despolimerización. Cada uno de los monómeros puede llegar a tener más de dos isoformas, las cuales se encuentran codificadas por diferentes genes en un mismo organismo y cuya incidencia depende del tipo de célula y de las condiciones en las que esta se encuentre. Para que el heterodímero de tubulina pueda formarse, es necesario que se lleve a cabo el mecanismo representado en la Figura 2.3: en un primer paso los monómeros biosintetizados son estabilizados por chaperonas específicas que rodean a las subunidades α y β por separado, los cuales posteriormente son liberados para ser capturados y estabilizados por los cofactores B y E, para la α -tubulina, y A y D, para la β -tubulina, mientras que a cada una de las subunidades se le adhiere una molécula de GTP. Los complejos diméricos αE y βD interactúan con el cofactor C para crear un supercomplejo pentamérico que permitirá la liberación del dímero al presentarse la hidrólisis del GTP de la subunidad β durante la construcción de los microtúbulos.²⁵⁻²⁸

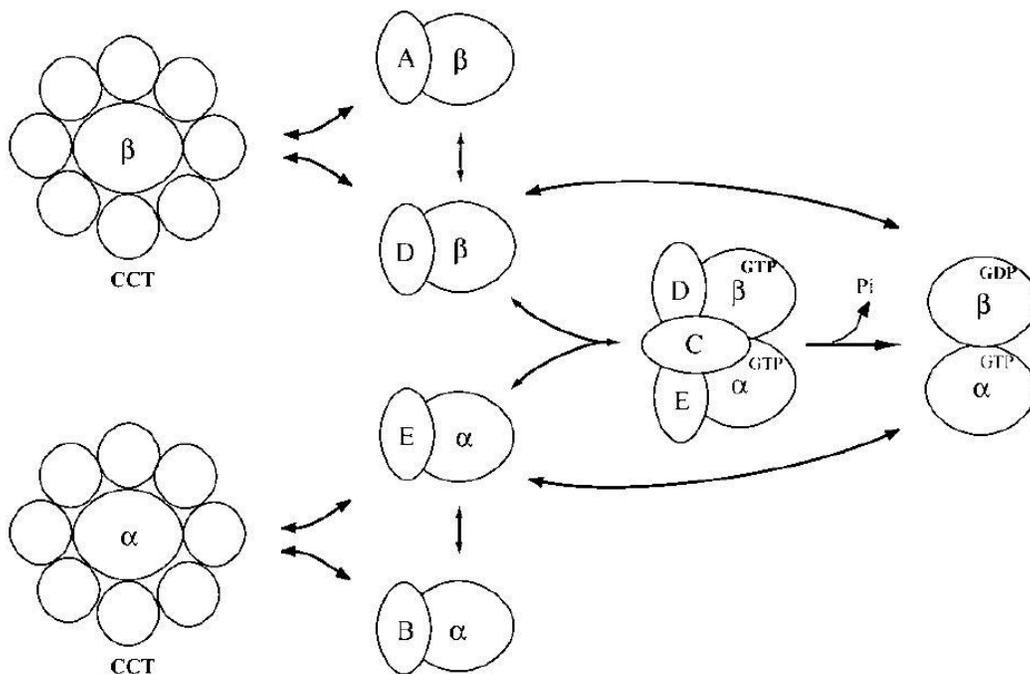


Figura 2.3. Representación esquemática del mecanismo para la formación del heterodímero de α - y β -tubulina, en donde se muestra la importancia de la presencia de las chaperonas y cofactores para la formación de un heterodímero funcional.²⁷

Durante el ciclo de polimerización/despolimerización de los microtúbulos el dímero de tubulina sufre cambios estructurales, uno de los cuales es la transición de la forma curvada (soluble) a la forma recta (conformación que adquiere en el microtúbulo). Nawrotek y colaboradores demostraron que este cambio se debe principalmente al movimiento de un asa (*loop*) presente en el sitio de unión de GTP del monómero de β -tubulina. Dicho movimiento permite la estabilización de la estructura con otro dímero para realizar el mecanismo de polimerización, el cual sólo puede llevarse a cabo si ocurre la transición de la forma curvada a la recta.²⁹

2.3.2. Moléculas que se unen a la tubulina

Además del GTP/GDP existen tres clases de moléculas que se sabe interactúan directamente con la tubulina, principalmente con el monómero β , y son: vincas, taxanos y análogos de la colchicina. En la Figura 2.4 se puede observar que el sitio de unión de cada una de estas moléculas se encuentra localizado en un lugar diferente del heterodímero, lo que a su vez les confiere un mecanismo de acción diferente entre ellas.²⁵

- a) **El sitio de las vincas (V):** El compuesto representativo de este grupo es la vinblastina, la cual está identificada como un inhibidor de la formación de microtúbulos durante la división celular, y se caracteriza por unirse a un sitio cercano al de GDP e interactuar con el monómero α del heterodímero vecino.
- b) **El sitio de los taxanos (T):** El sitio se encuentra localizado próximo al asa-M, la cual es una estructura importante encontrada en ambos monómeros que permite la unión del dímero de tubulina con el alfa-hélice de la tubulina lateral. El taxol, el principal fármaco de este grupo, favorece la estabilización de los microtúbulos mediante la formación de dicha interacción intermacromolecular.
- c) **El sitio de la colchicina (C):** La colchicina es un fármaco que actúa inhibiendo la polimerización y promoviendo la despolimerización de los microtúbulos. Este sitio es característico ya que se une de manera bifásica a una región de alta afinidad entre los monómeros α y β , interactuando principalmente con este último, lo que le confiere la capacidad inhibitoria.

Se cree que los bencimidazoles pertenecen al último grupo y por lo tanto presentarían un mecanismo de inhibición similar al de la colchicina puesto que también inhiben la

polimerización de los microtúbulos en mamíferos y parásitos, e inhiben competitivamente la unión de ésta al sitio, algunos de los estudios que comprueban este mecanismo se encuentran descritos en el punto 2.3.2.1 del presente trabajo.

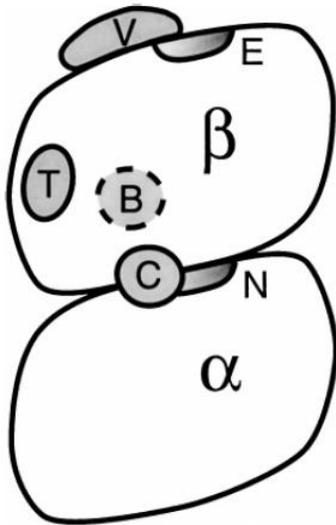


Figura 2.4. Representación esquemática de los sitios de unión de fármacos al dímero de tubulina.

- (T) – Taxol
- (C) – Colchicina
- (V) – Vinblastina
- [B] – Posible sitio de unión de bencimidazoles

Sitios de unión del Nucleótido Intercambiable [E] y del Nucleótido No Intercambiable [N].²⁵

En los últimos años se han registrado nuevas estructuras cristalográficas de heterotetrámeros de tubulina de mamífero, en su mayoría, co-cristalizadas con inhibidores de la polimerización, varios de los cuales están acoplados en el sitio de unión de la colchicina. Con estos resultados Barbier y colaboradores demostraron que el mecanismo de inhibición de estas moléculas es a través del impedimento dinámico de la estabilización del heterodímero de la forma rígida a la flexible (Figura 2.5). En el mismo trabajo, también se reportó la formación de un interdominio al cual se introducen varias de dichas moléculas debido al desplegamiento de una de las asas próximas al sitio.^{30,31}

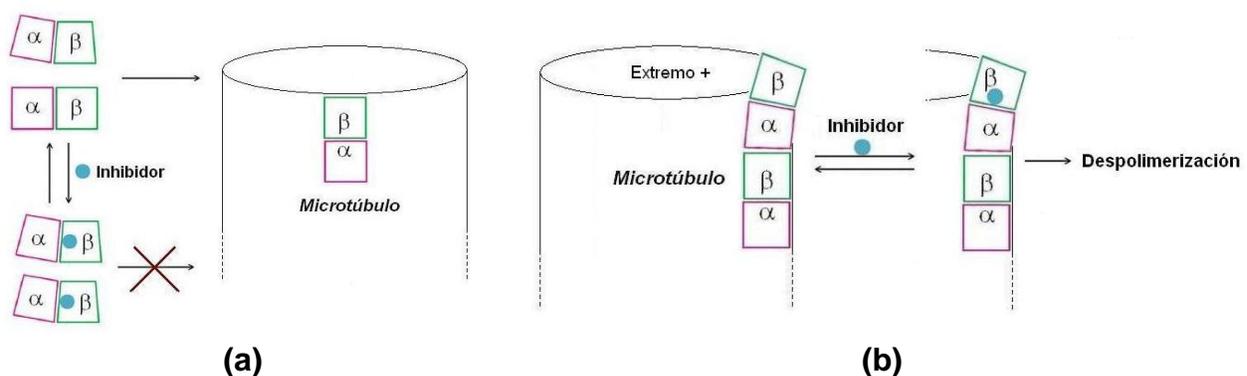


Figura 2.5. Representaciones esquemáticas de los mecanismos de inhibición de formación de microtúbulos. (a) Inhibición de la polimerización y (b) despolimerización de microtúbulos.³⁰

Actualmente, se ha demostrado que el equilibrio dinámico entre la forma rígida y la flexible del heterodímero se puede ver afectado por una gran cantidad de moléculas que se acoplan selectivamente al sitio de unión de la colchicina. Este acoplamiento inhibe el mecanismo de transición de la forma curvada a la rígida, por tanto sólo se forman pequeños protofilamentos que no pueden llegar a constituir un microtúbulo (Figura 2.5).^{30,31}

2.3.2.1. Inhibición competitiva con la colchicina

Durante mucho tiempo se supo que los bencimidazoles se unen al sitio o a un sitio próximo al de la colchicina, pero no fue sino hasta que se realizaron estudios sobre tubulina aislada, tal como lo hicieron Russell y Lacey que utilizaron MBZ marcado, que se demostró la existencia de una mayor afinidad del fármaco por la tubulina de organismos susceptibles (*H. contortus* y *T. columbriformis*) que por aquellas que presentaban mutaciones de resistencia en el monómero de β -tubulina.³² Otro grupo de investigadores, Jiménez-González y colaboradores, realizaron un estudio de inhibición empleando tubulina aislada de *T. spiralis* en el que reportan que los carbamatos bencimidazólicos, como el MBZ, ABZ, FBZ OBZ, inhiben competitivamente la unión de la colchicina. Adicionalmente, demuestran que la afinidad de estos bencimidazoles es mayor por la tubulina de parásito que por la de mamífero (tubulina de cerebro de cerdo).³³ En la Tabla 2.3 se enlistan algunos de los estudios de inhibición competitiva realizados a tubulina de mamífero, en los cuales se utilizaron tratamientos con carbamatos bencimidazólicos.

Tabla 2.3. Estudios de Inhibición competitiva

Tubulina Empleada	Moléculas que compiten con la colchicina por el sitio	Referencias
De cerebro de rata	mebendazol y nocodazol	- Laclette <i>et al.</i> (1980) ³⁴ - Russell <i>et al.</i> (1995) ³⁵ - Tahir <i>et al.</i> (2000) ³⁶
De cerebro de bovino	oxibendazol y fenbendazol	- Friedman & Platzer (1978) ³⁷

Investigaciones recientes sobre la búsqueda de inhibidores competitivos del sitio de la colchicina para el tratamiento de cáncer, han realizado varios estudios computacionales que

emplean el modelo del farmacóforo para tratar de explicar la posible forma de unión de algunos fármacos, entre ellos los bencimidazoles NZ y MBZ, al sitio de unión de la colchicina en la tubulina, exponiendo así una posible correlación estructural entre la colchicina y estos fármacos que pudiera justificar dicha competitividad. Adicionalmente, se realizaron estudios sobre tubulina de mamífero que demuestran, que a pesar de que todos los carbamatos bencimidazólicos poseen la estructura base del CBZ, éste no se une al mismo sitio que sus derivados, puesto que no inhibe la unión de la colchicina a la tubulina. Winder y colaboradores observaron que este fármaco inhibe competitivamente la unión del GTP intercambiable del monómero β , por lo que la unión se da en una etapa diferente a la de sus derivados.³⁸⁻⁴¹

2.3.3. Modelos teóricos del sitio de unión de bencimidazoles

La problemática actual del estudio de la tubulina de parásito recae en el hecho de que no existen registros acerca de la estructura tridimensional de alguna tubulina de helminto o protozoario en las bases de datos disponibles, por ejemplo el *Protein Data Bank* (PDB). Es debido a esto que existen varias propuestas acerca del sitio de unión de los carbamatos bencimidazólicos a la β -tubulina, fundamentadas en estudios de modelado molecular con los cuales varios autores han intentado correlacionar las bases moleculares de resistencia con el mecanismo de inhibición de la polimerización de la tubulina de parásito. Todo esto se ha hecho con el fin de localizar el sitio de unión de los bencimidazoles a esta proteína y entender las casusas por las que modificaciones en la misma disminuyen la actividad antiparasitaria de los inhibidores.²¹⁻²⁴ A continuación se describen brevemente algunos de estos estudios y su aportación (Figura 2.6).

2.3.3.1. Modelo de Louisa M. MacDonald

El modelo se creó, empleando la técnica de modelado por homología con el servidor Swiss-Model, a partir de la secuencia de aminoácidos del monómero de β -tubulina de *G. intestinalis*. En este modelo, la búsqueda del sitio se realizó con base en las características estructurales, hidrofóbicas y dimensionales de los carbamatos bencimidazólicos, así como de la proximidad de los aminoácidos de resistencia. El análisis estructural se realizó de forma bidimensional, por lo que la autora presenta la disposición del sitio basado en distancias moleculares.²⁰

2.3.3.2. Modelo de Mark W. Robinson

Robinson y colaboradores construyeron su modelo del monómero de β -tubulina empleando la técnica de modelado por remplazo de residuos, validada por la alta similitud entre las secuencias aminoacídicas del mamífero (*Sus scrofa*) y el parásito (*H. contortus*). Posteriormente, identificaron los aminoácidos de resistencia de helmintos y hongos, y expusieron el sitio modificando el ángulo ψ de algunos enlaces de los aminoácidos estructurales hasta lograr un máximo de solvatación de la estructura. Finalmente, acoplaron al sulfóxido de albendazol con su proteína modelada y procedieron a regenerar la estructura mediante una minimización de energía. El modelo permite correlacionar la conformación del fármaco acoplado con la proximidad de los aminoácidos de resistencia.²²

2.3.3.3. Modelo de Om Prakash Sharma

Este modelo, construido por Sharma y colaboradores, se obtuvo por la técnica de modelado por homología de la secuencia de aminoácidos de la β -tubulina del nematodo *Brugia malayi* con la estructura de *Ratus norvegicus* (PDB: 1SA0). Emplearon el modelo final para realizar un estudio de acoplamiento molecular topográfico (*docking ciego* o *blind docking*) cuyo resultado mostró que la mayoría de las estructuras bencimidazólicas tienen una alta probabilidad de acoplarse al sitio del GTP intercambiabile, por lo que explican que dicho fenómeno pudiera ser el causante de la despolimerización de los microtúbulos. El modelo permite conocer los posibles sitios de unión de bencimidazoles, así como los diferentes conformeros estructurales de los mismos. Cabe a mencionar que ninguno de los carbamatos bencimidazólicos estudiados se aproximó a los aminoácidos de resistencia comunes.²⁴

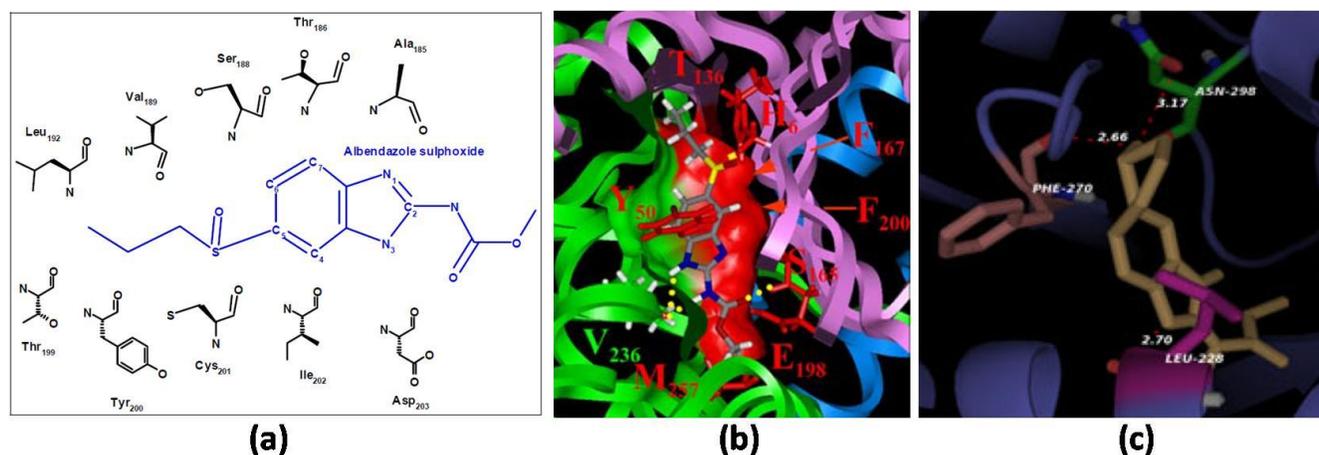


Figura 2.6. Visualización del acoplamiento del sulfóxido de albendazol en los diferentes modelos de: (a) Louisa M. MacDonald, (b) Mark W. Robinson y (c) Om Prakash Sharma.

2.4. Resistencia a fármacos antiparasitarios

Se sabe que las isoformas de tubulina de parásito pueden tener receptores de alta afinidad o de baja afinidad por bencimidazoles. Los nematodos, cestodos, hongos y protozoarios presentan mayoritariamente receptores de alta afinidad, los cuales se encuentran localizados en el grupo amino terminal del monómero de β -tubulina. Los bencimidazoles se unen tanto al monómero α como al β con una estequiometría de 1:1, y al heterodímero α/β con una estequiometría 2:1. La diferencia radica en que el mecanismo de resistencia a bencimidazoles ocurre, para varias especies de parásitos, involucrando modificaciones estructurales a las isoformas de la β -tubulina, pero no en las isoformas de la α -tubulina. La resistencia ocurre cuando los genes que codifican para la β -tubulina sufren mutaciones, lo cual genera la pérdida de afinidad del receptor por los bencimidazoles.² Desde la aparición de los bencimidazoles como fármacos antihelmínticos se han estado reportando aumentos en la incidencia de resistencia en parásitos, principalmente nematodos (ej. *Haemonchus contortus*).

La resistencia a fármacos antiparasitarios es el estado en el que una alta frecuencia de individuos en una población parasitaria no es susceptible o presenta baja susceptibilidad al efecto de una concentración determinada de fármaco, la cual propiciaba la inhibición del crecimiento o muerte celular en parásitos susceptibles. Esta resistencia puede ser *intrínseca*, cuando el parásito es innatamente insensible al efecto del fármaco, o *adquirida*, cuando poblaciones inicialmente susceptibles dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables (mutaciones). En el caso de la resistencia adquirida se ha observado que el aumento de la frecuencia de genotipos resistentes se debe principalmente a la constante exposición de la población parasitaria al fármaco. Esto propicia la iniciación de un mecanismo de selección en el cual se ve disminuida la proporción de parásitos susceptibles, lo que a su vez permite que aquellos parásitos que presentaron una modificación genética que les otorgó resistencia, puedan sobrevivir al tratamiento y heredar el genotipo de resistencia a la progenie. El parásito puede presentar un genotipo homocigoto (RR) o heterocigoto (RS), siendo el alelo de resistencia de carácter dominante en muchos de los casos, por lo que existe una baja o nula frecuencia de reversión de la mutación. Esto último es de gran relevancia debido a que varios parásitos poseen un periodo de gestación corto y alta fecundidad, lo que les permite un rápido incremento y propagación de la nueva población con el genotipo en cuestión.

La mutación es un proceso en el cual el ADN de una célula susceptible sufre una alteración que puede inducir modificaciones en la estructura o función, y que es heredable. Las mutaciones puntuales son aquellas en las que la modificación se lleva a cabo por transición, transversión, inserción o deleción de un sólo nucleótido, también llamados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), lo que propicia modificaciones estructurales capaces de alterar la afinidad de un ligando por el sitio de unión.^{2,42}

Hasta la fecha se han reportado que las principales mutaciones de aminoácidos del monómero de β -tubulina, por las cuales adquieren resistencia los helmintos, son: la fenilalanina 200 (Phe200), el ácido glutámico 198 (Glu198) y la fenilalanina 167 (Phe167). Estas mutaciones son resultado de una transversión de un nucleótido en la cadena de ADN que los codifica.^{45,51} En la Tabla 2.4 se enlistan los organismos en los cuales se ha reportado la incidencia de estas mutaciones, así como el aminoácido generado por la mutación puntual.

Tabla 2.4. Mutaciones de resistencia a bencimidazoles en la β -tubulina de helmintos

Número de Aminoácido	Mutación	Organismo	Referencia
167	Phe → Tyr	<i>Haemonchus contortus</i>	Silvestre & Cabaret (2002) ⁴³
	Phe → Tyr	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	
198	Glu → Ala	<i>Haemonchus contortus</i>	Ghisi <i>et al.</i> (2007) ⁴⁴ ; Rufener <i>et al.</i> (2009) ⁴⁵ ; Kotze <i>et al.</i> (2012) ⁴⁶
200	Phe → Tyr	<i>Trichuris trichiura</i>	Diawara <i>et al.</i> (2009) ⁴⁷
	Phe → Tyr	<i>Ascaris lumbricoides</i> ^a	Wang <i>et al.</i> (2011) ⁴⁸
	Phe → Tyr	<i>Haemonchus contortus</i>	Kwa <i>et al.</i> (1994) ⁴⁹
	Phe → Tyr	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Shayan <i>et al.</i> (2007) ⁵⁰ ; Silvestre <i>et al.</i> (2009) ⁵¹
	Phe → Tyr	<i>Trichostrongylus axey</i>	Palcy <i>et al.</i> (2008) ⁵²
	Phe → Tyr	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Roos <i>et al.</i> (1995) ⁵³
	Phe → Tyr	<i>Wuchereria bancrofti</i>	Schwab <i>et al.</i> (2005) ⁵⁴

Nota: (a) Resistencia no confirmada.

ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los carbamatos bencimidazólicos no son los fármacos de primera elección para el tratamiento de las protozoosis y trematodosis, por lo que existen pocos registros acerca de la resistencia de estos parásitos a bencimidazoles. Sin embargo, en un estudio realizado a una cepa resistente a bencimidazoles de *Giardia duodenalis*, Upcroft y colaboradores no detectaron mutaciones en la secuencia del gen que codifica para la β -tubulina de este organismo, por lo que, en el caso de protozoarios, la resistencia se puede deber a otro mecanismo.⁵⁵ Aunque existen otros estudios realizados sobre *Vittaforma corneae* en los cuales explican que la posible resistencia que posee este protozoario puede deberse a la presencia del aminoácido glutamina en la posición 198 de la secuencia del monómero β , en lugar de ácido glutámico.⁵⁶ En los trematodos la afinidad de la β -tubulina por los carbamatos bencimidazólicos es baja, posiblemente a causa de las diferencias estructurales o secuenciales.²³ Para el caso de los cestodos existen pocos estudios acerca de las secuencias del monómero, sin embargo, el reporte más reciente realiza un estudio de las isoformas de β -tubulina de algunos parásitos cuyos genomas están en proceso de secuenciación, como es el caso de *Hymenolepis microstoma*, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis*. Este reporte explica que la baja afinidad de la β -tubulina puede deberse a la sobreexpresión de la isoforma 2, la cual presenta el aminoácido tirosina (Tyr) en las posiciones 167 y 200.⁵⁷ Por último, en los hongos se han reportando una serie de mutaciones en los codones 6, 50, 134, 165, 167, 198, 200 y 241, los cuales se encuentran asociados a la resistencia a carbamatos bencimidazólicos.^{22,58,59}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud en el mundo, por lo que el desarrollo de moléculas para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos microorganismos es de gran importancia. Aunado a esto, el actual incremento en la aparición de resistencia a fármacos antihelmínticos de tipo carbamatos bencimidazólicos ha propiciado la necesidad de desarrollar nuevos análogos capaces de eludir dichos mecanismos o de buscar nuevas alternativas estructurales para lograr el efecto antiparasitario. Los derivados del CBZ son los fármacos antihelmínticos de elección para el tratamiento de enfermedades causadas por helmintos y protozoarios, cuyo mecanismo de acción principal es la despolimerización de microtúbulos. Estudios recientes señalan que la resistencia generada a estos derivados bencimidazólicos se debe principalmente a mutaciones puntuales en los

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

genes que codifican para la estructura del monómero β de la tubulina. La actual falta de registros cristalográficos de dicha proteína de parásito ha limitado los estudios para la búsqueda del sitio de unión, por lo que varios investigadores se han visto en la necesidad de implementar técnicas computacionales de modelado molecular para la generación de la posible estructura tridimensional. Con base en estos modelos han surgido varias hipótesis acerca del posible sitio de unión de bencimidazoles a dicho monómero, varios de los cuales se enfocan en correlacionar el sitio propuesto con los aminoácidos de resistencia reportados, así como también se ha buscado explicar el mecanismo por el cual ocurre la despolimerización de los microtúbulos; sin embargo, hasta hoy no ha sido posible describir este proceso con precisión.

La implementación de técnicas computacionales, como el modelado de macromoléculas, el acoplamiento molecular (*docking*) y la dinámica molecular, para la identificación del sitio de unión de los carbamatos bencimidazólicos a la β -tubulina de parásitos, son de vital importancia, ya que nos permiten conocer las características estructurales y conformacionales necesarias para la unión de estas moléculas a la proteína, así como conocer el comportamiento de las mismas en el sitio de unión.

Con base en reportes anteriores y al uso de técnicas computacionales, fue posible identificar un posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios que nos permitió correlacionar los resultados de actividad, resistencia e inhibición competitiva, así como las posibles diferencias de afinidad presentes en los algunos organismos.

4. HIPÓTESIS

La β -tubulina de helmintos y protozoarios podrá ser modelada a partir de sus secuencias aminoacídicas reportadas, mediante técnicas computacionales como son el modelado de macromoléculas, el acoplamiento molecular y la dinámica molecular. La estructura tridimensional nos permitirá identificar un posible sitio de unión de bencimidazoles, del tipo 2-carbamato de metilo, a la β -tubulina. Si el modelo de unión es congruente con los reportes de actividad, resistencia e inhibición competitiva, entonces se podrá confirmar la confiabilidad del sitio propuesto y, por tanto, se podrán diseñar nuevas moléculas con base en el análisis estructural.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Encontrar un posible sitio de unión de los derivados del carbendazim a la β -tubulina de helmintos y protozoarios que permita correlacionar los reportes de actividad, resistencia, inhibición competitiva y mecanismo de inhibición reportados.

5.2. Objetivos Particulares

- Recopilar, seleccionar y clasificar la información existente acerca de la actividad, resistencia e inhibición competitiva de bencimidazoles a la β -tubulina de parásitos, con el fin de justificar el sitio de unión propuesto.
- Emplear técnicas de bioinformática para realizar un análisis secuencial que permita caracterizar las posibles diferencias en la afinidad de los bencimidazoles a la β -tubulina de mamíferos, helmintos, protozoarios y cepas resistentes.
- Generar y validar modelos de la estructura tridimensional de la β -tubulina de algunos parásitos mediante la implementación de técnicas computacionales de predicción de estructuras proteicas.
- Emplear los modelos generados para realizar estudios de acoplamiento molecular (*docking*) que permitan identificar un posible sitio de unión de los derivados bencimidazólicos.
- Predecir y validar, con los modelos de unión generados, el comportamiento de los bencimidazoles en el sitio de unión propuesto mediante estudios de dinámica molecular.
- Realizar un análisis estructural de los derivados bencimidazólicos con el fin de conocer las características estructurales necesarias para la interacción con la β -tubulina.
- Proponer modificaciones al anillo de bencimidazol que permitan aumentar la afinidad por la β -tubulina de cepas resistentes.

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 122 del edificio E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM. Para el estudio de dinámica molecular se emplearon los equipos proporcionados por la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Computación, con la cuenta solicitada por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, para el proyecto: “Estudio de dinámica molecular en proteínas de parásitos como posibles blancos terapéuticos”.

En el siguiente apartado se describen los procedimientos computacionales empleados para la identificación del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de parásito, y cuyos fundamentos teóricos se encuentran descritos en el Apéndice 1 del presente trabajo.

6.1. Identificación y alineamiento de secuencias

Los organismos a estudiar se seleccionaron con base en los registros existentes de susceptibilidad y resistencia al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos (Tabla 6.1). Las secuencias de aminoácidos de las isoformas de β -tubulina de los diferentes organismos se obtuvieron de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁶⁰ y del servidor UniProt⁶¹, donde se identificaron los números de acceso e isotipos correspondientes, los cuales se encuentran reportados en el Apéndice 3 del presente trabajo. Las secuencias previamente identificadas se almacenaron en formato FASTA para ser evaluadas durante el análisis comparativo de identidad al utilizar la herramienta *Blastp* del NCBI. Este análisis permitió seleccionar a aquellas isoformas de mamíferos que poseían una mayor similitud con las isoformas reportadas de los organismos con mutaciones de resistencia, así como de aquellos que poseían una sola isoforma registrada. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple utilizando el módulo *Align* de UniProt, almacenando el resultado en el formato de *ClustalO* (.txt). El resultado del alineamiento se ingresó al servidor *Mobylye* del *Institut Pasteur*⁶², en el módulo *Computation of distance* de la sección *Phylogeny* para hacer uso del programa *Protdist* de PHYLIP. En esta sección se introdujo la secuencia *Culstalo* y se realizó un *Bootstrap* antes del análisis, así como también se solicitaron 100 réplicas con una generación de 99 números aleatorios. Este resultado se usó en la opción *neighbor* de PHYLIP, en la sección *Phylogeny* del módulo *Distance Matrix Method Programs*, en donde se llevó a cabo un análisis *Data sets* múltiple, incorporando 100 conjuntos de datos

con 99 números aleatorios para la generación del árbol filogenético (*Consensus tree*). Con el mismo alineamiento, se procedió a identificar las diferencias aminoacídicas entre los organismos resistentes y los susceptibles, basando la búsqueda principalmente en los aminoácidos de resistencia.

Tabla 6.1. Organismos susceptibles y resistentes al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos

Grupo	Organismos	
	Susceptibles	Resistentes
Mamíferos	-	<i>Homo sapiens</i>
	-	<i>Bos taurus</i>
	-	<i>Ovis aries</i>
	-	<i>Mus musculus</i>
Nematodos	<i>Trichinella spiralis</i>	-
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	-
	<i>Haemonchus contortus</i>	F200Y; E198A; F167Y
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	F200Y; F167Y
	<i>Brugia malayi</i> ^a	-
	<i>Trichuris trichiura</i>	F200Y
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	F200Y ^b
Trematodo	<i>Fasciola hepatica</i> (etapa adulta)	<i>Fasciola hepatica</i>
Cestodos ^c	<i>Echinococcus multilocularis</i>	-
	<i>Moniezia expansa</i>	-
Protozoarios	<i>Giardia intestinalis</i>	-
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
	-	<i>Leishmania mexicana</i>
	-	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	-	<i>Toxoplasma gondii</i>
	-	<i>Entamoeba histolytica</i>

Notas:

- (a) Se sustituyó por *Wuchereria bancrofti* debido a que no hay registros de secuencias completas.
- (b) Resistencia no confirmada.⁴⁵
- (c) Secuencias incompletas de: *Hymenolepis microstoma* y *Echinococcus granulosus*.

6.2. Construcción de los modelos de β -tubulina

Para este estudio se seleccionaron como modelos de estudio a *T. spiralis*, *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *E. multilocularis* y *F. hepatica* como representantes de cada grupo (Tabla 6.1). Se trazó un diagrama de flujo (Figura 6.1) que permitiera escoger la técnica más indicada para la generación del modelo de la estructura tridimensional de la β -tubulina de parásito. En esta figura se encuentra enmarcado en líneas punteadas la ruta seguida.

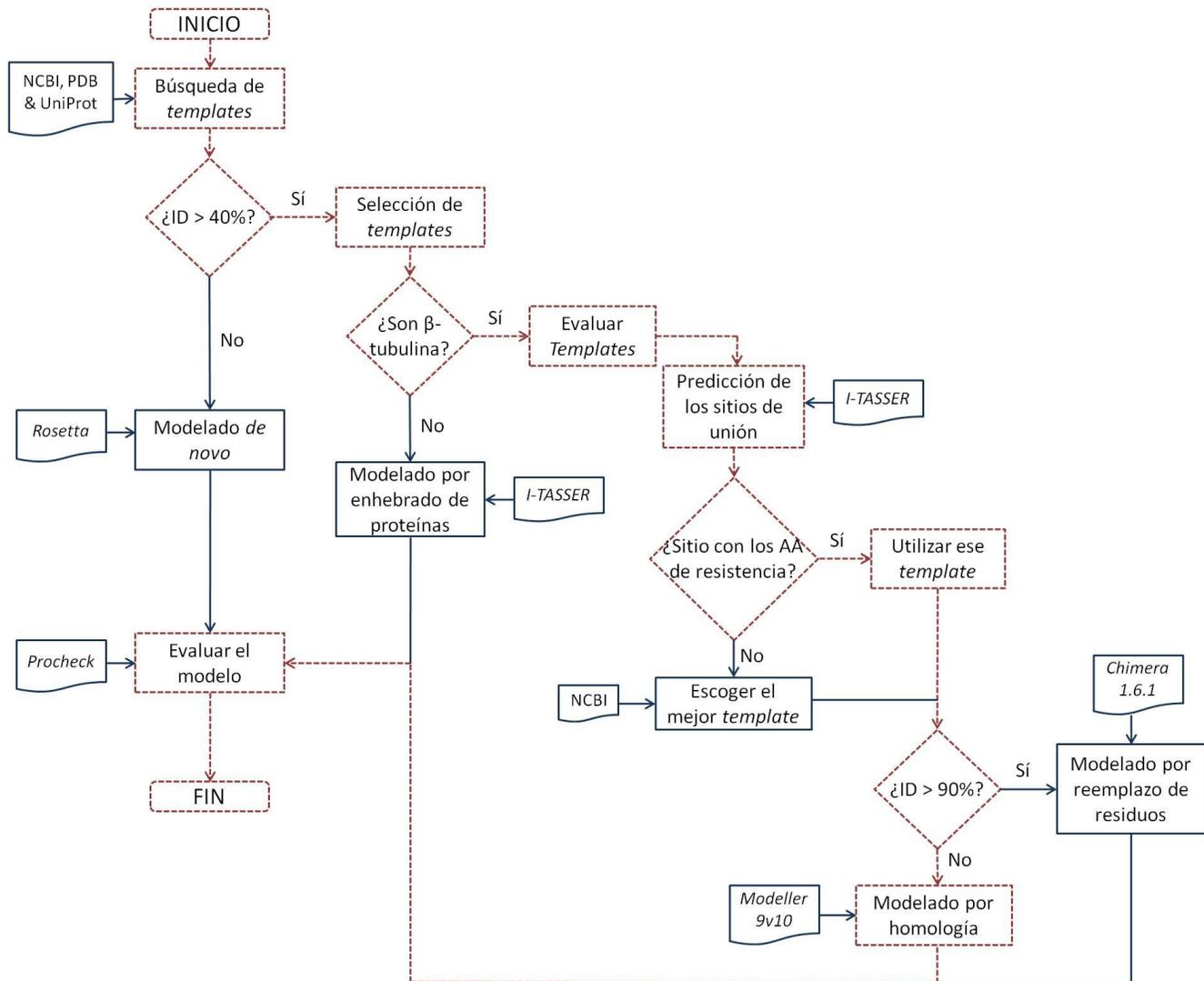


Figura 6.1. Diagrama de flujo para la selección de la técnica de modelado.

Para la búsqueda de las posibles *plantillas* (*templates*) se emplearon las herramientas *Blastp* de NCBI, *Sequence* de PDB⁶³ y *Blast* de UniProt. Una vez identificadas todas las posibles *plantillas*, se alinearon con las secuencias de parásitos utilizando la herramienta *Blastp* de NCBI. Se seleccionaron aquellas estructuras que poseían una identidad mayor al 40%, a las cuales se analizó su origen buscando en el PDB. Adicionalmente, se realizó un estudio de

predicción del sitio de unión empleando el servidor I-TASSER⁶⁴ con la secuencia de *T. spiralis*, cuyos resultados se correlacionaron con las *plantillas* anteriormente identificadas. La evaluación de la estructura seleccionada indica que la técnica más adecuada para generar los modelos de estudio es el modelado por homología.

Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo a nivel secuencial y estructural de la β -tubulina de *Prostheco bacter de jonegii* (PDB: 2BTQ) para comprobar la conservación estructural de dicho monómero en los diferentes organismos y para incluir otro punto de validación a la selección de la técnica de modelado por homología.

6.2.1. Modelado por homología

Se utilizó el programa *Modeller 9v10*⁶⁵ para la construcción de los modelos de β -tubulina de los diferentes parásitos. Se realizó un primer alineamiento ingresando las secuencias hasta el aminoácido 428, debido a que es el número máximo de aminoácidos que presenta la estructura de la *plantilla*, y posteriormente se calculó el modelo tridimensional con base en el alineamiento y en las coordenadas de los átomos de la *plantilla*.

6.2.1.1. Validación de los modelos

Para cada parásito se generaron cinco modelos, de los cuales se seleccionó el mejor con base en los parámetros de validación que proporciona el servidor *PROCHECK*⁶⁶ tomando en cuenta el grado de exposición del sitio de unión. Para evaluar este último parámetro, primero se corrigieron las estructuras con las herramientas *Complete a structure* y *Remove bumps from a structure*, del servidor WHAT-IF⁶⁷, para posteriormente realizar una optimización de la geometría de las proteínas con el programa GROMACS 4.5.3⁶⁸, empleando el campo de fuerza GROMOS96 43a1. Con las estructuras optimizadas se procedió a desplegar la superficie electrostática de la proteína con el programa PyMOL⁶⁹, el cual nos permitió analizar si el sitio identificado se encontraba expuesto o cerrado, de tal forma que se descartaron a todas aquellas estructuras en las cuales se encontraba cerrado.

6.2.2. Modelado por reemplazo de residuos

Se empleó la herramienta *Structure editing* del programa *UCSF Chimera v1.6.1*⁷⁰ para la construcción de los modelos de *T. spiralis* con las mutaciones puntuales en los aminoácidos 200 (F→Y), 198 (E→A) y 167 (F→Y).

6.3. Estudio de acoplamiento molecular

6.3.1. Preparación de las proteínas

Los modelos proteicos previamente seleccionados y optimizados se prepararon con la interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4*⁷¹, en el cual se agregaron los hidrógenos polares y se corrigieron las cargas de los aminoácidos. Adicionalmente se prepararon, siguiendo la misma metodología, los modelos de *T. spiralis* con las mutaciones F167Y, E198A y F200Y.

6.3.2. Preparación de los ligandos

Los ligandos enlistados en la Tabla A2.1 del Apéndice 2 del presente trabajo se optimizaron usando un campo de fuerza MMFF94x, con el programa *Spartan'02*⁷², reteniendo las cargas y la quiralidad de las estructuras. Posteriormente, se utilizó el programa *AutoDock 4.2*⁷³ para agregar los hidrógenos polares y detectar automáticamente los centros de torsión y los enlaces rotables, a excepción del enlace amida, el cual se consideró rígido en todas las estructuras. Los ligandos se construyeron con base en las siguientes consideraciones:

- Isomería: el grupo amida del carbamato puede adquirir la conformación *cis*, donde el ángulo diedro entre los átomos H-N-C-O es 0°, o *trans*, en el que al ángulo diedro entre estos átomos es 180°.
- Tautomería: debido al efecto resonante que se presenta entre el par electrónico del N en la posición 1 y el N en posición 3, en el núcleo del bencimidazol, existe la posibilidad de hallar al sustituyente sobre el anillo de benceno en la posición 5 ó 6; de tal manera que se pueden tener los tautómeros 1,5 y 1,6 en relación al H de la posición 1 y el sustituyente en 5 ó 6.

A partir de las consideraciones anteriores se crearon cuatro grupos de estudios, los cuales fueron evaluados de forma independiente (Figura 6.2). Para el caso de los sulfóxidos se tomaron en cuenta los enantiómeros (+) y (-) en cada grupo.

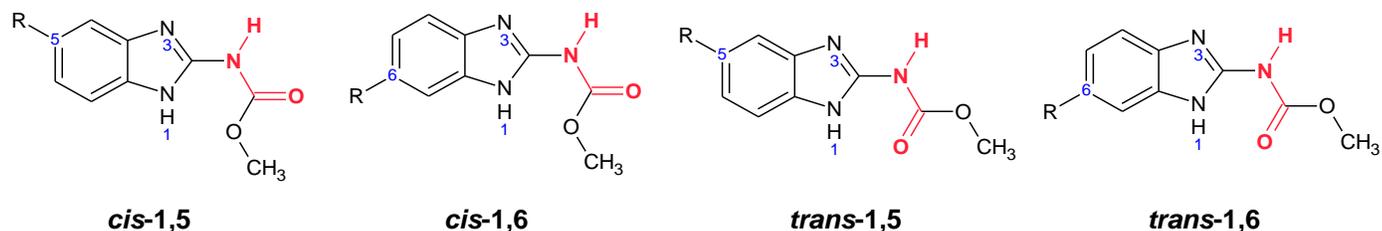


Figura 6.2. Grupos conformacionales considerados para el estudio de acoplamiento molecular.

6.3.3. Acoplamiento molecular

Utilizando las proteínas preparadas se determinó una caja de búsqueda (*Grid*) en cada modelo utilizando el módulo *Autogrid* de *AutoDock Tools 1.5.4*. Las cajas se centraron en el aminoácido 200 de cada modelo, con una dimensión de 80 x 80 x 80 Å. Posteriormente, se realizó el cálculo del acoplamiento molecular de todos los ligandos, en cada uno de los modelos, utilizando *AutoDock 4.2*, empleando un algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 estructuras con 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Finalmente, se realizó el análisis de los resultados obtenidos para cada uno de los grupos generados, seleccionando aquel grupo que presentara las conformaciones más favorecidos energéticamente (menor $\Delta G_{\text{unión}}$).

6.4. Dinámica molecular

Se realizó el estudio de dinámica molecular al modelo silvestre (WT) y a los modelos con las mutaciones de resistencia pertenecientes al parásito *Trichinella spiralis*. Se evaluaron los modelos con y sin ligandos, mediante la implementación del programa GROMACS 4.5.3⁶⁸. Para validar el acoplamiento molecular se evaluaron a todos los carbamatos bencimidazólicos estudiados en el modelo silvestre. De manera similar, para los modelos con las mutaciones se seleccionaron únicamente a tres de los ligandos que presentaron la menor energía de acoplamiento y a tres con la mayor energía de acoplamiento. Los parámetros de los ligandos fueron calculados con el servidor PRODRGv2⁷⁴ mediante la implementación del campo de fuerza de GROMOS, solicitando se mantuvieran las cargas y las configuraciones estructurales. Las proteínas y sus complejos (proteína-ligando) fueron solvatados con moléculas de agua en una caja cúbica continua. Posteriormente, se adicionaron átomos de Na⁺ y Cl⁻ de forma aleatoria con el fin de neutralizar la carga del sistema y llevar al mismo a una concentración 0.15 M. Todas las simulaciones fueron realizadas a 1 bar de presión y a 300 K de temperatura.

Una vez preparado el sistema, se procedió a realizar una minimización de la energía empleando un campo de fuerza GROMOS96 43a1, con una carga puntual en el disolvente y un tiempo de 0.002 ps. Se calcularon las cargas electrostáticas implementando el método de partículas en malla de Ewald (PME, por sus siglas en inglés) a partir del método de la suma de Ewald, y el cálculo de las interacciones tipo Lennard-Jones con un radio de 0.9 nm. Después de la minimización de energía, se procedió a equilibrar el sistema con una dinámica

de 20 ps con restricciones en la posición de la proteína, permitiendo la relajación de las moléculas del disolvente. Finalmente, se realizó una dinámica molecular de 10 ns a los cuatro modelos sin ligando con el fin de comprobar la estabilidad de los mismos y el tiempo de exposición del sitio de unión. De igual manera se realizó una dinámica de 3 ns a los complejos proteína-ligando para evaluar el comportamiento del ligando en el sitio y su correlación con los resultados del acoplamiento original.

6.5. Propuestas para el diseño de fármacos

Con base en los resultados obtenidos de acoplamiento molecular y dinámica molecular, se realizó una selección de los modelos de β -tubulina que podrían ser empleados para el diseño de nuevos fármacos.

6.5.1. Diseño de fármacos asistido por computadora

Se realizó el estudio de *screening* virtual evaluando la biblioteca de moléculas de EDULISS⁷⁵ con el servidor LIDAEUS⁷⁶, estudiando más de 4 millones de compuestos provenientes de 27 bases de datos diferentes. El servidor LIDAEUS permitió calcular la distribución superficial del potencial electrostático para la formulación de un mapa farmacofórico representado por átomos de nitrógeno, oxígeno y carbono, denominados *puntos de sitio* (*site points*). Posteriormente, se analizó la base de datos de *EDULISS 2 Unique*, almacenando sólo los 5,000 mejores acoplamientos con una tolerancia de desviación de 0.5 Å de los *puntos de sitio*.

Del resultado obtenido con el servidor LIDAEUS se seleccionaron 50 de las moléculas que poseían como estructuras base al bencimidazol, benzotiazol, indol e indazol. Adicionalmente, se buscaron análogos de dichas estructuras en la base de datos ZINC⁷⁷ para ampliar la biblioteca a 500 moléculas. Las estructuras fueron optimizadas usando el campo de fuerza MMFF94x, para realizar un estudio de acoplamiento molecular empleando el programa *AutoDock 4.0*⁷⁸, en el cual se utilizó un algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 estructuras con 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas, sobre los modelos seleccionados. Al final del estudio se seleccionaron las moléculas con menor energía de unión para el modelo con la mutación, realizando una comparación con las energías obtenidas en el modelo silvestre. Las moléculas con los mejores acoplamientos fueron identificadas en ZINC, a fin de seleccionar aquellas estructuras que no presentaran toxicidad en mamíferos. Finalmente, con base en el análisis anterior, se propuso un compuesto líder, al cual se le evaluaron sus propiedades ADMET con el servidor *FAF-Drugs2*⁷⁹.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación y alineamiento de secuencias

En la Tabla 7.1 se muestran los porcentajes de identidad (ID) provenientes de la comparación de las isoformas de β -tubulina de mamíferos con respecto a las de los diferentes parásitos. Se seleccionaron las isoformas de mamíferos que presentaron un alto ID con la mayoría de las secuencias, esto con la finalidad de minimizar el número de isoformas de trabajo, así como para facilitar la identificación de las diferencias durante el estudio del alineamiento múltiple.

Tabla 7.1. Porcentaje de identidad secuencial de mamíferos vs parásitos

Mamíferos		Parásitos					
Organismo/ Isotipo		<i>Trichinella spiralis</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
		-	BT1	BT2	BT1	-	-
H. sapiens	BT1	80%	77%	80%	71%	76%	55%
	BT2A	95%	89%	97%	78%	88%	55%
	BT2B	95%	89%	97%	78%	88%	55%
	BT2C	96%	91%	98%	78%	88%	55%
	BT3	93%	86%	93%	77%	85%	56%
	BT4	93%	86%	93%	76%	85%	56%
	BT5	95%	90%	97%	79%	87%	55%
B. taurus	BT2B	95%	89%	97%	78%	88%	55%
	BT2C	96%	91%	98%	78%	88%	55%
	BT3	93%	86%	93%	77%	85%	56%
	BT4	94%	90%	97%	79%	87%	57%
	BT5	95%	90%	97%	79%	87%	55%
	BT6	92%	87%	93%	77%	86%	57%
M. musculus	BT1	80%	79%	80%	73%	76%	54%
	BT2	95%	89%	97%	78%	88%	55%
	BT3	93%	86%	93%	76%	85%	55%
	BT6	92%	86%	92%	77%	85%	56%
O. aries		95%	89%	97%	78%	88%	55%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El árbol filogenético presentado en la Figura 7.1 permite analizar las relaciones existentes entre los organismos con base en la similitud secuencial de la β -tubulina. En este diagrama se puede observar una división entre las clases de parásitos, donde algunas de ellas se encuentran muy próximas a las de mamíferos, como es el caso de *F. hepatica*, *T. spiralis* y *T. trichiura*. Estas relaciones nos permiten comprobar la existencia de una relación evolutiva entre las secuencias de β -tubulina con nematodos y trematodos. Por otro lado, los protozoarios se encuentran más alejados debido al aumento en las diferencias de los aminoácidos; sin embargo, se siguen considerando como secuencias homólogas.

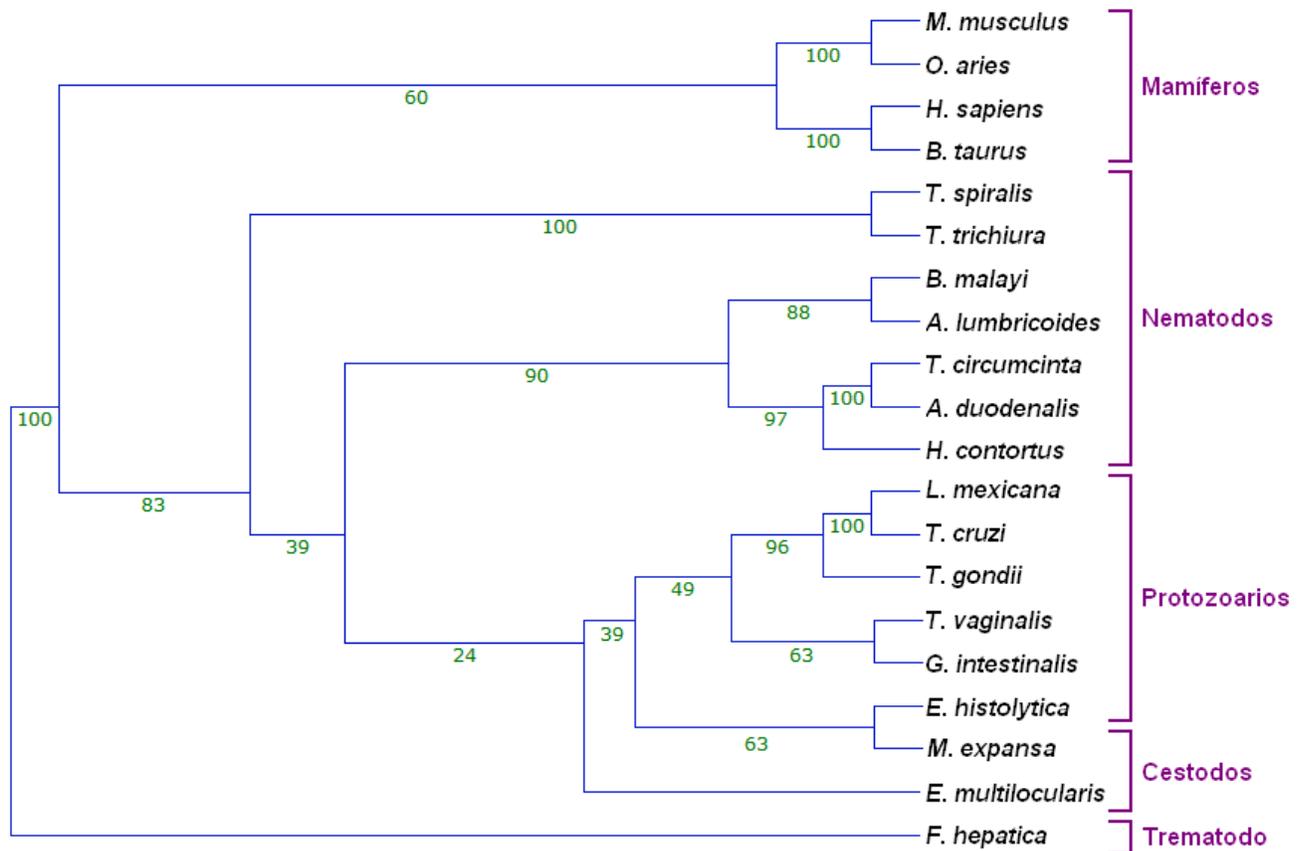


Figura 7.1. Árbol filogenético basado en la similitud secuencial de la β -tubulina.

El alineamiento múltiple utilizado para la generación del árbol filogenético fue empleado para analizar las diferencias secuenciales que podrían estar modificando la afinidad de los bencimidazoles a ciertas isoformas de la β -tubulina. Para esto se dividieron a los grupos de acuerdo a su resistencia o susceptibilidad a los bencimidazoles, y enfocamos la selección en los principales aminoácidos de resistencia (F167Y, E198A y F200Y), como se muestra en la Figura 7.2.

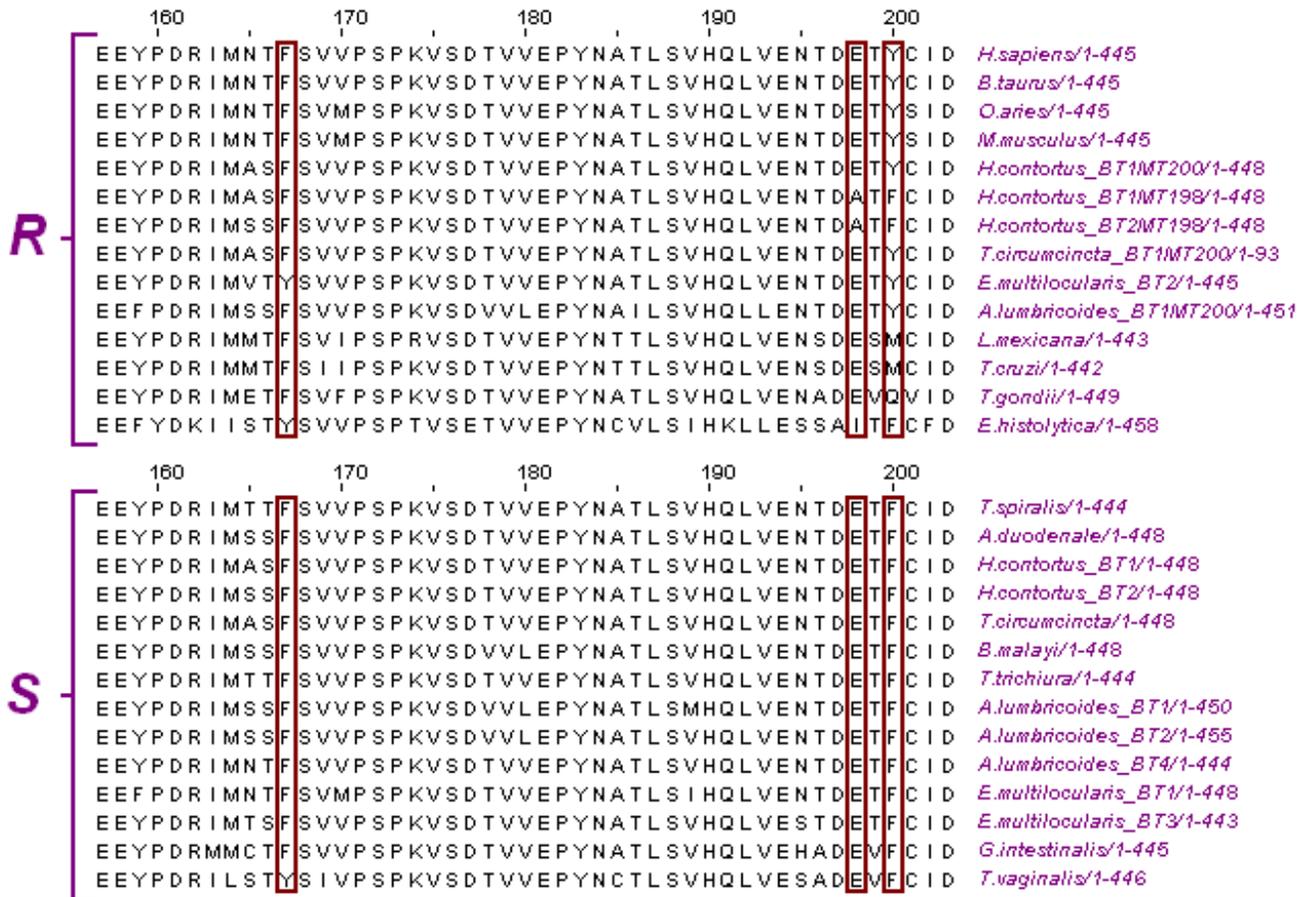


Figura 7.2. Comparación del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas entre los organismos susceptibles (S) y los resistentes (R).

El resultado del alineamiento múltiple se dividió en dos grupos: Los organismos susceptibles (S) y los resistentes (R) al tratamiento con carbamatos bencimidazólicos. En estos alineamientos se enmarcaron las posiciones pertenecientes a los aminoácidos 167, 198 y 200, los cuales representan a los residuos con mayor tasa de mutaciones asociadas con resistencia a fármacos bencimidazólicos. Las principales diferencias y similitudes presentes en estos aminoácidos son las siguientes:

- Posición 200: para el caso de los organismos susceptibles se puede observar que el aminoácido fenilalanina (F) está conservado, mientras que en los organismos resistentes varios de ellos presentan en su secuencia una tirosina (Y). Este aminoácido estructuralmente es muy parecido a la fenilalanina, sin embargo, al presentar un grupo hidroxilo adquiere propiedades de polaridad e hidrofilia que le permiten funcionar como aceptor/donador de puentes de hidrógeno, a diferencia de la

fenilalanina, el cual es apolar e hidrofóbico. Robinson planteó la posibilidad de que la resistencia se debía a la formación de un puente de hidrógeno entre la Y200 y el N165, por lo que se dificulta la exposición del sitio de unión.²² Lo mismo podría suceder para el caso de la glutamina (Q) de *T. gondii*, sumando el posible impedimento en el acoplamiento dado el aumento en la libertad de movimiento que posee este aminoácido. En el caso de la metionina (M), presente en *L. mexicana* y *T. cruzi*, la resistencia se podría deber a la modificación en las dimensiones estructurales, así como el aumento en los grados de libertad.

- Posición 198: se observa una clara conservación del ácido glutámico (E) en ambos grupos; sin embargo, para el caso de las mutaciones de las isoformas BT1 y BT2 de *H. contortus* y en la secuencia de *E. histolytica*, se tiene la presencia de aminoácidos apolares neutros, a diferencia del residuo glutamato que posee una carga formal negativa. Esto nos indica la importancia de la presencia de un aminoácido con la capacidad para aceptar puentes de hidrógeno en la posición 198.
- Posición 167: esta posición es muy similar a la 200, puesto que se observa una alta conservación del aminoácido fenilalanina (F) en ambos grupos. La presencia de tirosina (Y) en la secuencia de *T. vaginalis* nos hace suponer que dicha modificación es poco relevante; sin embargo, hay que considerar que algunas de las mutaciones reportadas (sin registros en el NCBI) señalan a esta modificación como posible causa de resistencia. Otro caso es el de los nematodos de equinos (ID > 98% con respecto a *T. spiralis*), de los cuales no se conoce la causa de resistencia a bencimidazoles, pero se puede suponer que es debida a la presencia de tirosina en la posición 167 como en el caso de: *Cyathostomum catinatum* [AAT76621]; *Cylicocyclus nassatus* [AAT76622]; *Cylicostephanus longibursatus* [ABX39224]; *Cylicostephanus goldi* [ABX39235]; *Cyathostomum pateratum* [CAE17286]. Con base en esto podemos suponer que la modificación de la fenilalanina por tirosina (F167Y) presenta un efecto similar al propuesto por Robinson para el aminoácido 200, no obstante éste podría alterar en menor grado el mecanismo de apertura del sitio de unión.²²

En el caso de los platelmintos (trematodos y cestodos) existen algunas diferencias secuenciales que podrían ser la causa de la disminución en la afinidad de los bencimidazoles. En *F. hepatica* (Figura 7.3) se observa que las isoformas BT1, BT2, BT3 y BT5 presentan características aminoacídicas que podrían ser clasificadas como resistentes,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

según el análisis anterior, mientras que las isoformas BT4 y BT6 podrían ser susceptibles. Sin embargo, un estudio realizado por Chambers y colaboradores indica que la BT2 podría ser la que posee mayor afinidad por el ABZ. Cabe aclarar que la afinidad en general de *F. hepatica* por este tipo de estructuras es baja, actuando con poca eficiencia en la etapa adulta del parásito. Por esta razón se puede suponer que la causa inicial de las variaciones de afinidad es debida a los niveles de expresión de las isoformas durante el desarrollo parasitario.²²

```

      160           170           180           190           200
EEYPDRIMSTF SVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDEETFCID F.hepatica_BT1/1-436
EEYPDRIMNTF SVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDEETFCID F.hepatica_BT2/1-443
EEYPDRIMNTF SVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDEETFCID F.hepatica_BT3/1-444
EEYPDRIMNTF SVVPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDEETFCID F.hepatica_BT4/1-442
ESWPDRIVNTF SIFPSPKVSDVVVEPYNATLFTIDLLLSLSDETLVLD F.hepatica_BT5/1-431
EEYPDRIVCPF VAYPSPKVSDVVVEPYNALAGHQLVDLSDETLVLD F.hepatica_BT6/1-430

```

Figura 7.3. Comparación de secuencia de las isoformas de *F. hepatica*.

En cuanto a los cestodos, Olson y colaboradores reportaron recientemente algunos avances de los proyectos de secuenciación del genoma de estos parásitos, en el cual identifican a los aminoácidos 167 y 200 de las secuencias de las isoformas de β -tubulina.⁵⁷ En la Tabla 7.2 se observa que varias de las isoformas poseen tirosina en la posición 167 y/o 200, por lo que el autor menciona que tales modificaciones pudieran ser la causa de la baja afinidad a carbamatos bencimidazólicos. Esta baja afinidad también se podría deber al aumento en la expresión de la isoforma BT2, la cual, en el caso *E. multilocularis*, es la que posee los aminoácidos característicos de resistencia, a diferencia de las isoformas BT1 y BT3 del mismo parásito. También existe la posibilidad de que la diferencia de afinidad por los carbamatos bencimidazólicos entre trematodos, nematodos y cestodos se deba al mecanismo de distribución y metabolismo que sufren estos compuestos dentro del parásito.

Tabla 7.2. Aminoácidos presentes en las posiciones 167 y 200 para diferentes cestodos

Gen	Em167	Em200	Eg167	Eg200	Tso167	Tso200	Mex167	Mex200	Expr. (%)
<i>tub-1</i>	Phe	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	21
<i>tub-2</i>	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	100
<i>tub-3</i>	Phe	Phe	Phe	Tyr	Tyr	Phe	-	-	26

Abreviaturas: (Em) *E. multilocularis*; (Eg) *E. granulosus*; (Tso) *Taenia solium*; (Mex) *M. expansa*.

7.2. Construcción del modelo de β -tubulina

La búsqueda de la *plantilla* de β -tubulina permitió identificar una serie de estructuras con alto potencial de ser empleadas para la construcción de una estructura terciaria, varias de las cuales se enlistan en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Listado de estructuras que podrían ser utilizadas como *plantillas*

Organismo	Plantillas				
	PDB	Método	Res. (Å)	Subunidad	No. de AA
<i>Sus scrofa</i>	1FFX	Rayos-X	3.95	B/D	1 – 445
	1JFF	Rayos-X	3.50	B	1 – 445
	1TUB	Rayos-X	3.70	B	1 – 427
<i>Bos taurus</i>	1SA0	Rayos-X	3.58	B/D	1 – 445
	1SA1	Rayos-X	4.20	B/D	1 – 445
	1TVK	Rayos-X	2.89	B	1 – 427
	1Z2B	Rayos-X	4.10	B/D	1 – 445
	3DU7	Rayos-X	4.10	B/D	1 – 445
	3E22	Rayos-X	3.80	B/D	1 – 445
<i>Ovis aries</i>	3HKB	Rayos-X	3.65	B/D	1 – 445
	3HKC	Rayos-X	3.80	B/D	1 – 445
	3HKD	Rayos-X	3.70	B/D	1 – 445
	3HKE	Rayos-X	3.60	B/D	1 – 445
	3N2G	Rayos-X	4.00	B/D	1 – 445
	3N2K	Rayos-X	4.00	B/D	1 – 445

Nota: Algunas estructuras se descartaron debido a que provenían de modelos teóricos.

Todas las estructuras de los organismos reportados en la Tabla 7.3, a excepción de aquellas cuyo número de aminoácidos es menor a 445, presentaron altos valores de ID al ser comparadas con las secuencias de: *T. spiralis* (95.0%), *G. intestinalis* (88.0%), *E. histolytica* (56.0%), *E. multilocularis* BT1 (92.0%), y *F. hepatica* BT2 (97.0%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos IDs concuerdan con los reportados para las isoformas tipo 2 de los mamíferos reportados en la Tabla 7.1, los cuales se encuentran por arriba del 40% y pertenecen a estructuras cristalizadas del monómero de β -tubulina de algún mamífero, por lo que no fue necesario recurrir al modelado *de novo*, ni al modelado por enhebrado de proteínas. Con base en esta información, se decidió proceder a la búsqueda del sitio de unión con el servidor I-TASSER, el cual logró identificar a dos estructuras de β -tubulina. La primera de ellas fue el modelo creado por M.K. Robinson (PDB: 1OJ0²²), mientras que la segunda pertenece al mamífero *O. aries* (PDB: 3N2G³¹) que expone un sitio de unión particular, al presentar los principales aminoácidos de resistencia en helmintos (Figura 7.4). La estructura 3N2G mostró un ID menor al 90% con respecto a las secuencias de los parásitos, a excepción de *T. spiralis*, *E. multilocularis* y *F. hepatica*, por lo que se decidió emplear la técnica de modelado por homología para la generación de todos los modelos, utilizando a la subunidad D de la estructura 3N2G como *plantilla*. Es importante mencionar que esta estructura no es la única que expone un sitio de unión donde se encuentren los aminoácidos de resistencia; sin embargo, en las otras estructuras, 3HKB, 3HKC, 3HKD, 3HKE y 3N2K, el ingreso al sitio se encuentra más limitado, lo que podría interferir durante el estudio de acoplamiento.

Predicted Binding Site										
Template proteins with similar binding site:										
Rank	Cscore ^{LB}	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a	Cov.	BS-score	Lig. Name	Download	Predicted binding site residues in the model Complex
1	0.76	1sa0B	0.932	1.77	0.877	0.972	1.89	GDP	Download	10,11,12,99,138,140,141,142,143,144,175,177,181,204,222,226
2	0.47	3du7D	0.948	1.81	0.887	0.991	1.85	HOS	Download	175,176,208,219,220,221,222
3	0.46	3e22B	0.931	1.80	0.870	0.972	1.92	TZT	Download	11,15,72,175,176,177,220,221,222,223
4	0.46	3n2gD	0.949	1.79	0.875	0.991	1.79	G2N	Download	134,165,198,200,236,239,240,250,253,257,314,368
5	0.46	2hxfB	0.927	2.20	0.882	0.991	1.81	TA1	Download	23,26,27,227,228,231,234,270,272,273,274,276,358,359,360
6	0.46	3hkeB	0.934	1.75	0.870	0.972	1.76	T13	Download	239,243,245,246,352,353
7	0.45	1oj0A	0.904	2.59	0.868	0.995	1.77	ALW	Download	6,16,20,134,136,165,167,198,200,233,236,237,240,250,253,257
8	0.45	3hkeB	0.934	1.75	0.870	0.972	1.59	T13	Download	239,252,253,256,257,350,352
9	0.43	1sa0A	0.934	1.74	0.398	0.977	1.63	MG	Download	96,97,99,142,143
10	0.41	2btqB	0.871	1.76	0.370	0.911	1.71	SO4	Download	10,11,141,144

Figura 7.4. Identificación de los posibles sitios de unión.

Un aspecto interesante de la estructura 3N2G es que el ligando con el que se encuentra co-cristalizada (G2N), presente en el sitio de unión identificado, posee un grupo carbamato de etilo en su estructura. Esta similitud estructural con los carbamatos bencimidazólicos nos permite suponer la facilidad de ingresar al sitio por parte de este grupo y la posible conformación que podrían adquirir para favorecer la unión.

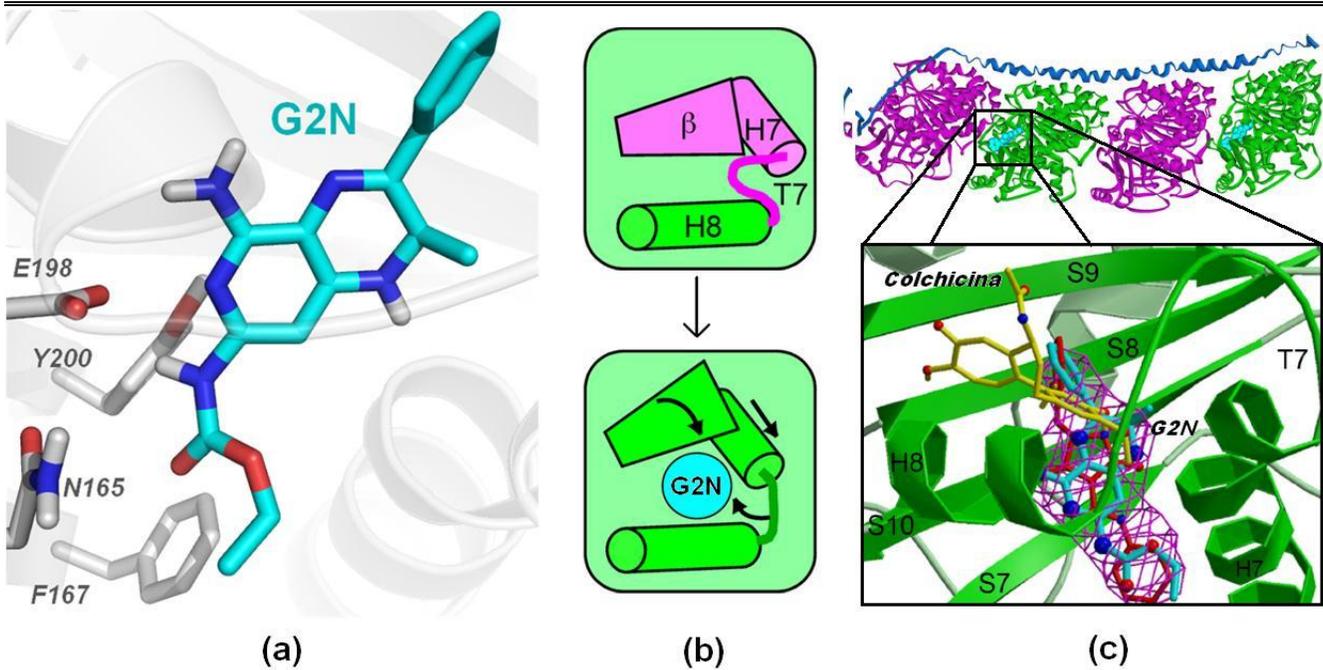


Figura 7.5. (a) Acoplamiento de G2N en el sitio de unión; (b) Cambio conformacional inducido por un ligando; (c) Competencia de G2N con la colchicina por el sitio en la interfaz del heterodímero.³¹

El ligando G2N (Figura 7.5a) tiene como mecanismo de acción la despolimerización e inhibición de la polimerización de los microtúbulos, al igual que los bencimidazoles 2-carbamato de metilo. Esta inhibición se debe a que la molécula induce un cambio conformacional en la interfaz del dímero sobre una de las asas (T7) del monómero β , reduciendo la interacción con el monómero α y propiciando la generación de la conformación curvada de la estructura heterodimérica (Figura 7.5b). Un heterodímero con esta conformación no tiene la capacidad de interactuar con otro para formar un protofilamento, o, en cuyo caso, propicia el proceso de despolimerización del extremo del microtúbulo. Este mecanismo es reversible ya que el movimiento constante del asa T7 permite la liberación de la molécula, contribuyendo así con el ciclo de inestabilidad dinámica del microtúbulo. Adicionalmente, se sabe que el sitio expuesto también corresponde al sitio de unión de la colchicina, por lo que Barbier y colaboradores reportan la existencia de inhibición competitiva, tal y como se muestra en la Figura 7.5c.^{30,31,80}

Esta información es de gran relevancia debido a que la extrapolación de dichos resultados a un modelo de β -tubulina de parásito podría ayudar a proponer el posible sitio de unión de los carbamatos bencimidazólicos así como a explicar la posible conformación que adquiere el grupo carbamato en el sitio y el mecanismo por el cual estos bencimidazoles promueven la

7.2.1. Modelado por homología

En la Tabla 7.4 se reporta un resumen de los resultados de validación de las estructuras obtenidas al modelar la secuencias aminoacídicas de los parásitos seleccionados con el programa *Modeller 9v10* usando como *plantilla* a la estructura 3N2G_D.

Tabla 7.4. Modelos de la β -tubulina de parásito obtenidos con *Modeller 9v10*

Organismo	No. Modelo	QMEANscore	Z-score	RMSD (Å)	Ramachandran plot (%)			
					F	P	G	NP
<i>Trichinella spiralis</i>	1	0.617	-1.769	0.135	86.6	9.7	2.7	1.1
	2 ^a	0.622	-1.717	0.126	86.6	9.9	2.4	1.1
	3	0.610	-1.858	0.129	85.8	10.8	2.4	1.1
	4	0.605	-1.918	0.137	86.0	10.2	2.4	1.3
	5	0.604	-1.924	0.126	86.8	9.1	3.0	1.1
<i>Giardia intestinalis</i>	1	0.606	-1.898	0.132	85.5	11.3	1.9	1.3
	2	0.609	-1.867	0.136	86.0	11.3	1.3	1.3
	3 ^a	0.620	-1.739	0.128	85.2	11.3	2.7	0.8
	4 ^a	0.627	-1.650	0.127	85.8	11.3	1.9	1.1
	5 ^a	0.619	-1.745	0.144	86.0	10.5	2.4	1.1
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	0.657	-1.296	0.123	84.1	11.1	2.9	1.9
	2 ^a	0.668	-1.163	0.126	84.7	11.4	2.4	1.6
	3	0.639	-1.515	0.129	83.1	13.0	2.4	1.6
	4 ^a	0.672	-1.119	0.128	84.4	11.4	2.6	1.6
	5 ^a	0.639	-1.517	0.120	83.9	12.2	2.6	1.3
<i>Echinococcus multilocularis</i>	1 ^a	0.618	-1.757	0.145	85.0	11.0	2.9	1.1
	2	0.643	-1.470	0.128	86.6	9.7	2.4	1.3
	3 ^a	0.621	-1.720	0.146	86.1	10.5	2.4	1.1
	4	0.627	-1.648	0.139	86.3	10.2	2.1	1.3
	5 ^a	0.619	-1.753	0.126	87.1	10.2	1.9	0.8
<i>Fasciola hepatica</i>	1	0.614	-1.804	0.137	86.8	9.7	2.2	1.3
	2 ^a	0.646	-1.427	0.130	86.3	11.0	1.6	1.1
	3 ^a	0.585	-2.155	0.131	86.8	9.7	2.2	1.3
	4 ^a	0.635	-1.564	0.137	85.8	10.2	3.0	1.1
	5 ^a	0.620	-1.736	0.143	85.8	11.3	1.9	1.1

Notas: (a) Modelos cuyo sitio de unión se encontró cerrado después de la optimización. Regiones del diagrama de Ramachandran: (F) Favorecida; (P) Permitida; (G) Generosamente Permitida & (NP) No Permitida.

Para obtener un modelo confiable, primero fue necesario generar varios modelos con diferentes servidores, tomando como referencia a la secuencia de *T. spiralis* (Apéndice 4). Los modelos generados fueron analizados con el servidor PROCHECK, en donde se encontró que el programa *Modeller 9v10* construyó los mejores modelos al poseer un Z-score próximo a cero (> -2.000), un bajo RMSD ($< 0.140 \text{ \AA}$), un QMEANscore cercano a uno y un valor de confiabilidad del diagrama de Ramachandran superior al 90%, así como también identificó que algunos de ellos exponían el sitio de unión de interés. Una vez seleccionado el programa se procedió a la generación de los modelos de β -tubulina de los parásitos restantes, para los cuales los resultados de la validación se encuentran reportados en la Tabla 7.4 y en el Apéndice 5 del presente trabajo, en cuyos esquemas y gráficos se logran observar, de manera general, los siguientes aspectos:

- El diagrama del Z-score permitió asegurar la existencia de una relación estructural de los modelos con respecto a la base de datos de estructuras, y cuya desviación en los valores se debe principalmente a la baja resolución de la *plantilla* (4.0 \AA).
- El esquema de errores por residuo permitió visualizar aquellas regiones por las cuales el modelo presentó variaciones en los valores de validación. En general se observa que las regiones en rojo (mayor error estructural) se localizan principalmente en las asas y giros de la estructura, mientras que las zonas en azul (menor error estructural) se encuentran conformando la parte interna de la estructura.
- El gráfico DOPE demostró la existencia de complementariedad entre la *plantilla* y los modelos generados, a excepción del caso de *E. histolytica*, donde hubo mayor número de variaciones debido a la baja identidad secuencial que posee con *O. aries*.
- En el diagrama de Ramachandran se observó la distribución de los aminoácidos en los cuatro cuadrantes que corresponden a la conformación estructural de los modelos generados. En éste se representan cuatro regiones clasificadas por letras según el tipo de conformación angular que adquiere cada aminoácido, a excepción de la glicina y la prolina. La región favorecida (A,B,L) se presenta en rojo y refiere a los aminoácidos con orientaciones angulares estables en el modelo, mientras que las regiones permitidas (a,b,l,p) y generosamente permitidas ($\sim a, \sim b, \sim l, \sim p$) se representan en amarillo y beige, respectivamente, mostrando a aquellos aminoácidos cuyas conformaciones angulares están dentro de los parámetros aceptables. Finalmente la región no permitida se encuentra representada en color blanco. En este caso de

estudio, los aminoácidos que conforman las asas y los aminoácidos superficiales presentaron conformaciones angulares no permitidas y se localizan en la región blanca. Con este diagrama se comprobó de manera gráfica lo observado anteriormente, en donde los aminoácidos no permitidos del diagrama de Ramachandran están señalizados en las regiones rojas del esquema de errores.

La superposición representada en Figura 7.7 demuestra que los modelos generados poseen una alta similitud estructural entre ellos y con la β -tubulina de *Ovis aries*. Esto también nos permite considerar que las diferencias en la afinidad por los bencimidazoles se deberán principalmente a modificaciones en los residuos de aminoácidos y no a causa de modificaciones en la estructura terciaria del monómero en cuestión.

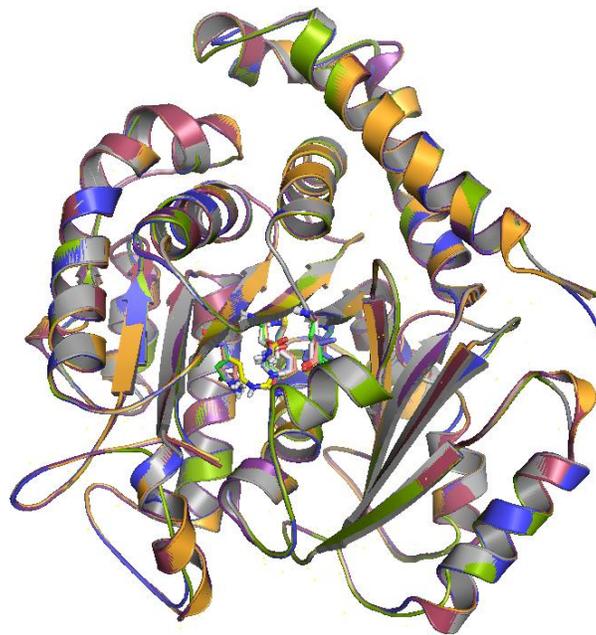
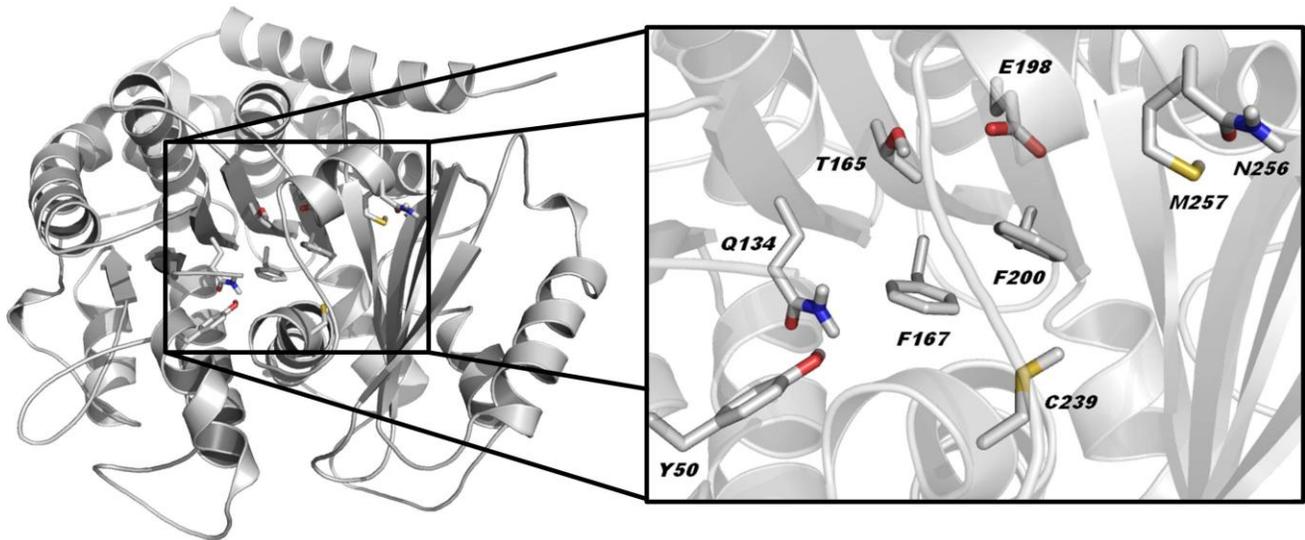


Figura 7.7. Superposición de los modelos de *T. spiralis* (salmón), *G. intestinalis* (verde), *E. histolytica* (cian), *E. multilocularis* (púrpura), *F. hepatica* (amarillo) y *O. aries* (gris).

Una vez que se construyeron y validaron los diferentes modelos, se procedió a realizar un análisis secuencial que permitió identificar el sitio de unión con base en los aminoácidos de resistencia. El sitio propuesto, para los 6 modelos, incluido el de mamífero, está conformado por varios aminoácidos altamente conservados que presentan características hidrofóbicas (L240, L250, L253 y F266) e hidrofílicas (Y50, T237 y N256). Adicionalmente, se encontraron aminoácidos que presentan características muy similares y con alta variabilidad, pero cuya significancia es baja debido a la lejanía del sitio (AA: 163, 314, 316, 350 y 368).



(a)

	50	130	160	170	200	240	260
S <i>T. spiralis</i> /1-428	...NVYYN...LQGFDL...YPDRIMTTFSVVP...DETFCID...GVTTCLR...LAVNMVPP...						
<i>G. intestinalis</i> /1-428	...NVYFN...LQGFQI...YPDRMMCFTFSVVP...DEMFCID...GCTSCCLR...LAVNLIIPF...						
<i>E. multilocularis</i> /1-428	...NVYYN...LQGFDM...FPDRIMNTFSVMP...DETFCID...GVTTCLR...LAVNMVPP...						
<i>E. histolytica</i> /1-428	...NVYFN...LQGFQV...FYDKIISTYSVVP...AITFCFD...GITCSLR...LAVNMNPY...						
R <i>F. hepatica</i> /1-428	...NVYYN...LQGFRL...YPDRIMNTFSVVP...DETYCID...GVTTCLR...LAVNMVPP...						
<i>O. aries</i> /1-428	...NVYYN...LQGFQL...YPDRIMNTFSVMP...DETYSID...GVTTCLR...LAVNMVPP...						
	50	134	165 167	198 200	239	256 257	

(b)

Figura 7.8. (a) Principales aminoácidos en el sitio de unión del modelo de *T. spiralis*. (b) Comparación de los aminoácidos que constituyen el sitio de unión en los diferentes modelos.

El sitio de unión propuesto (Figura 7.8) presenta aminoácidos con alta tasa de mutación entre los organismos seleccionados, dentro de los cuales se encuentran los aminoácidos de resistencia en helmintos (167, 198 y 200), y los aminoácidos 134 y 165, los cuales han presentado mutaciones de resistencia a carbamatos bencimidazólicos en algunas especies de hongos.²² Estas cinco posiciones se encuentran representadas en la Figura 7.9 para los 6 modelos de organismos. Además, cabe mencionar que estos aminoácidos presentan una alta similitud estructural, sin embargo, las diferencias en sus propiedades electrónicas y estéricas podrían representar los principales factores que modifican la afinidad de los bencimidazoles al sitio.

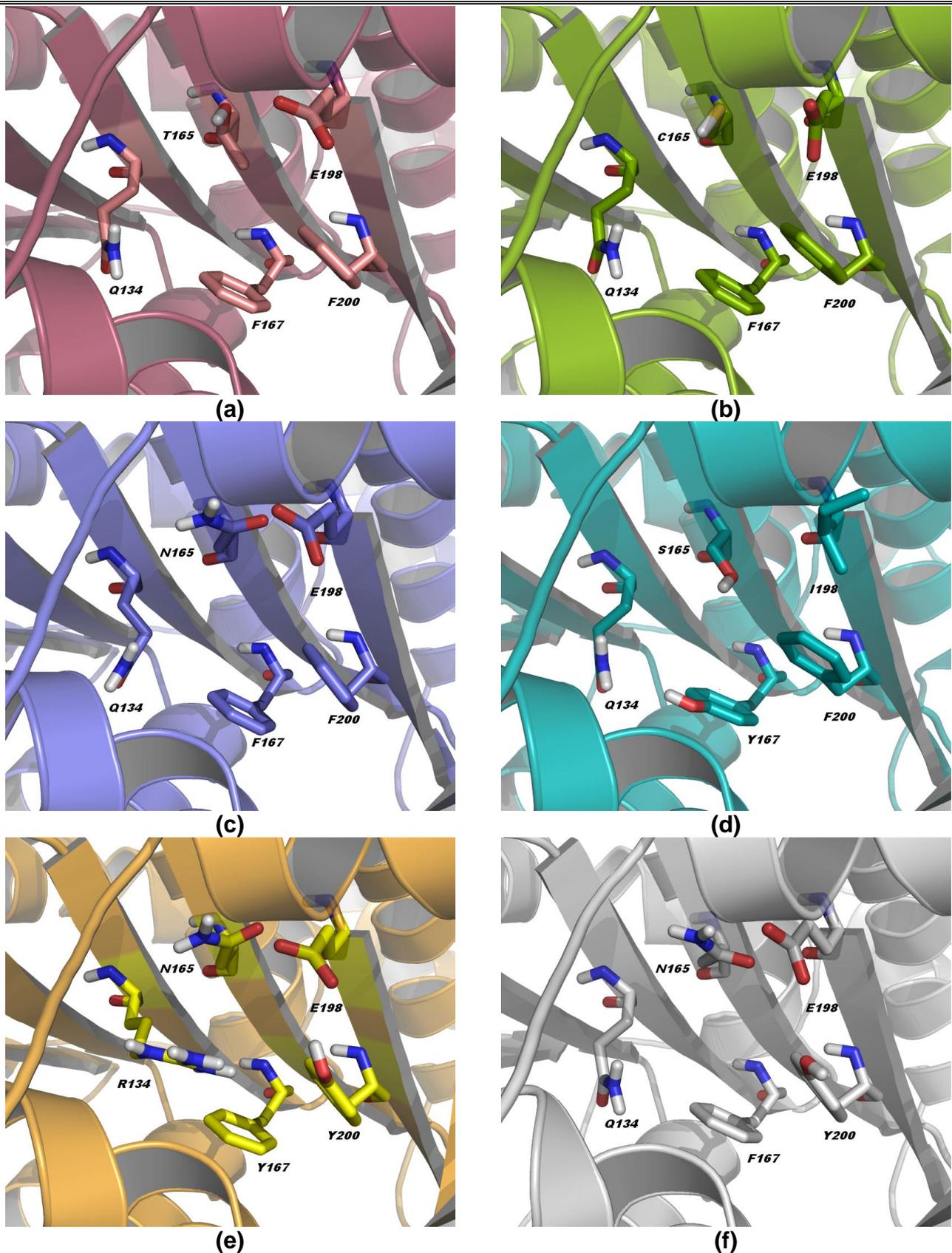


Figura 7.9. Principales aminoácidos en el sitio de unión de los modelos de *T. spiralis* (a), *G. intestinalis* (b), *E. multilocularis* (c), *E. histolytica* (d), *F. hepatica* (e) y *O. aries* (f).

7.3. Acoplamiento molecular

Esta herramienta computacional se empleó para estudiar las posibles conformaciones que podrían adquirir los carbamatos bencimidazólicos al acoplarse en el sitio de unión propuesto. Adicionalmente, permitió identificar las causas de las diferencias de afinidad de estas moléculas en los diferentes organismos, así como las características estructurales de mayor relevancia en la interacción fármaco-receptor. Además de los carbamatos bencimidazólicos, se evaluaron, por esta metodología, otros derivados bencimidazólicos, no carbamatos de metilo, que se cree pueden estar actuando a este nivel y que podrían unirse al mismo sitio; sin embargo, para estos derivados no existen reportes de resistencia y/o confirmación del mecanismo de acción, por lo que se han estudiado con el único fin de comparar dichas estructuras y conformaciones con las de los carbamatos bencimidazólicos. El estudio de acoplamiento también fue realizado con el fin de identificar la posible cercanía del sitio propuesto con el sitio de la colchicina, de tal forma que se pueda establecer un posible mecanismo de inhibición competitiva, y, por consiguiente, poder correlacionar dichos resultados con lo reportado por Barbier y colaboradores con el fin de exponer un posible mecanismo de despolimerización de los microtúbulos.³¹

Adicionalmente, se generaron tres modelos de *T. spiralis* con las mutaciones puntuales reportadas hasta el momento, denominando WT (silvestre) al modelo original sin mutaciones, mientras que a los nuevos modelos se les nombró según la mutación que presentasen (F167Y, E198A y F200Y). Este estudio permitió proponer las posibles causas por las que dichas mutaciones generan resistencia en los helmintos.

7.3.1. Acoplamiento molecular con modelos silvestres

En las Tablas 7.5 a 7.10 se presentan los resultados de las energías de unión del acoplamiento de los diferentes fármacos antiparasitarios al sitio de unión propuesto. En cada modelo se identificaron y seleccionaron a aquellos acoplamientos que obtuvieron la menor energía, lo que implica una mayor afinidad por el sitio, para posteriormente ser comparados con las conformaciones de los otros derivados, y así poder definir los acoplamientos preferenciales. Adicionalmente, se muestran algunas de las imágenes de los acoplamientos que permiten identificar las principales interacciones de los bencimidazoles con el sitio, así como también ejemplifican la importancia de las diferencias estructurales presentes en los diferentes parásitos.

a) *Trichinella spiralis*

Tabla 7.5. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Trichinella spiralis*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-7.05	-6.86	-7.05	-6.86
ABZ	-7.70	-7.41	-7.44	-7.45
ABZSO (+)	-7.90	-7.76	-7.84	-7.84
ABZSO (-)	-7.70	-7.47	-8.03	-7.98
MBZ	-8.73	-9.08	-8.88	-8.65
FBZ	-8.76	-8.63	-8.69	-8.58
FBZSO (+)	-9.02	-8.63	-8.90	-8.81
FBZSO (-)	-8.96	-8.90	-9.15	-9.01
OBZ	-7.41	-6.98	-6.92	-6.93
PBZ	-7.93	-7.74	-7.41	-7.25
LBZ	-9.41	-9.29	-8.34	-8.31
NZ	-8.83	-8.95	-8.57	-8.57
FPA1	-7.35	-7.48	-7.11	-7.37
FPA2	-7.60	-7.51	-6.91	-7.38
GNV-ABZ	-6.40		-6.09	
GNV-MBZ	-7.58		-7.27	
TCBZ	-7.65		-7.81	

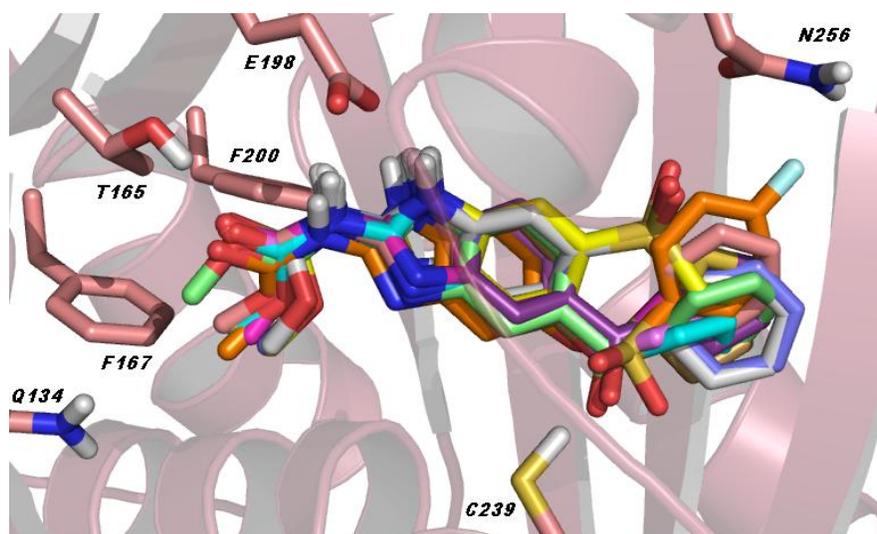


Figura 7.10. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos en la β -tubulina de *T. spiralis*.

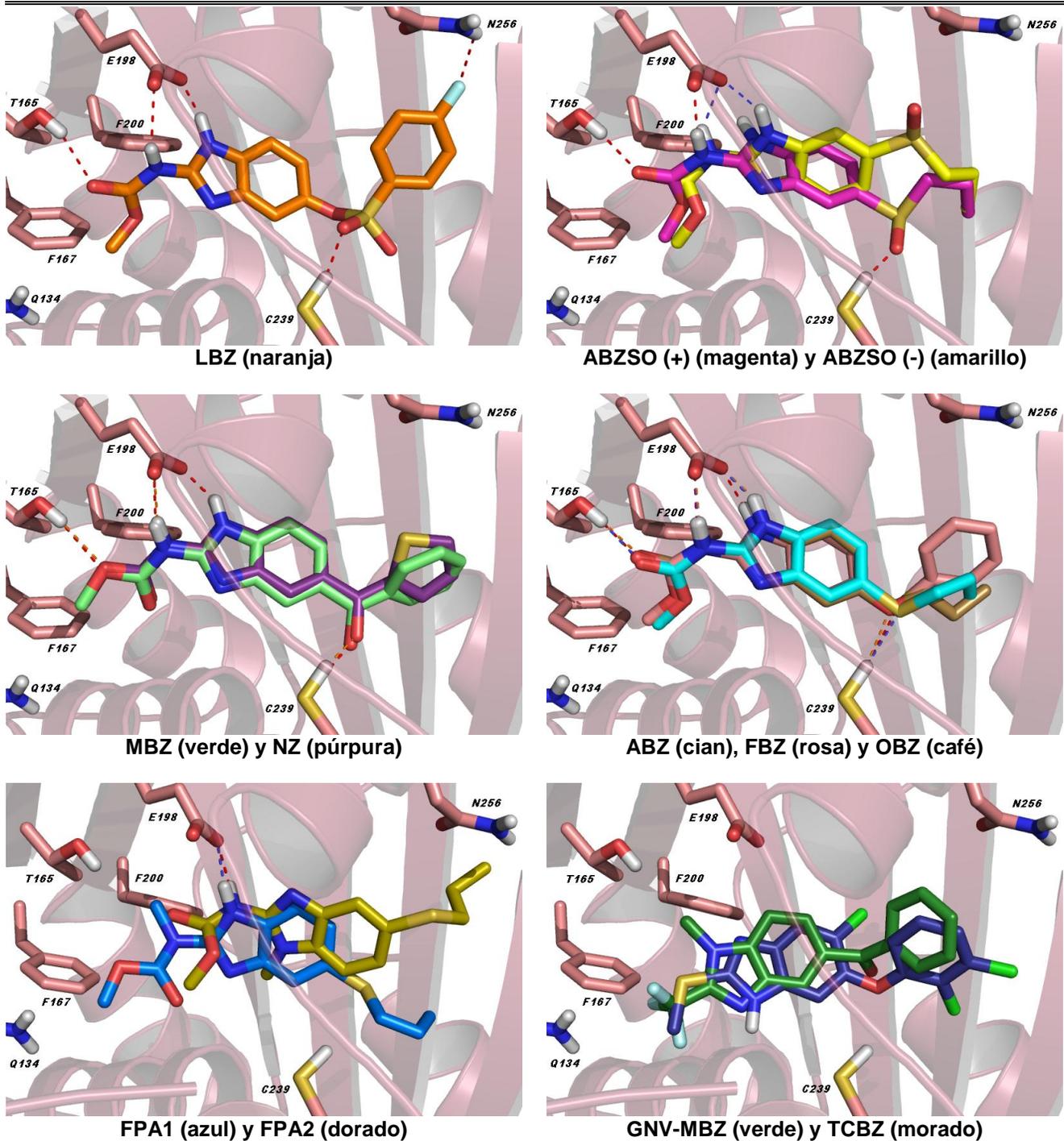


Figura 7.11. Representación de algunos acoplamientos dentro de la β -tubulina de *T. spiralis*.

En este modelo se puede observar un acoplamiento preferencial por las estructuras con el isómero *cis* del carbamato, lo que facilita la formación de un puente de hidrógeno de este grupo con el residuo de Thr165. Además, se observa que los ligandos con grupos aceptores de puentes de hidrógeno en el sustituyente interactúan con el residuo Cys239 mediante la formación de un puente de hidrógeno, favoreciendo a su vez la formación del tautómero 1,5.

b) *Giardia intestinalis*

Tabla 7.6. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Giardia intestinalis*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-6.87	-6.92	-6.87	-6.92
ABZ	-6.92	-7.50	-8.18	-8.18
ABZSO (+)	-8.35	-8.49	-8.51	-8.73
ABZSO (-)	-7.33	-7.69	-8.45	-8.57
MBZ	-8.78	-8.09	-8.63	-9.08
FBZ	-8.72	-8.11	-8.74	-8.60
FBZSO (+)	-8.72	-8.99	-9.03	-8.66
FBZSO (-)	-8.47	-8.34	-9.03	-9.16
OBZ	-6.95	-6.96	-7.63	-7.58
PBZ	-7.35	-7.74	-8.06	-8.10
LBZ	-9.14	-8.91	-8.30	-9.25
NZ	-8.96	-8.66	-8.80	-9.10
FPA1	-7.58	-7.68	-8.20	-7.94
FPA2	-7.89	-7.96	-7.33	-7.45
GNV-ABZ	-6.03		-6.04	
GNV-MBZ	-7.45		-8.01	
TCBZ	-8.00		-8.56	

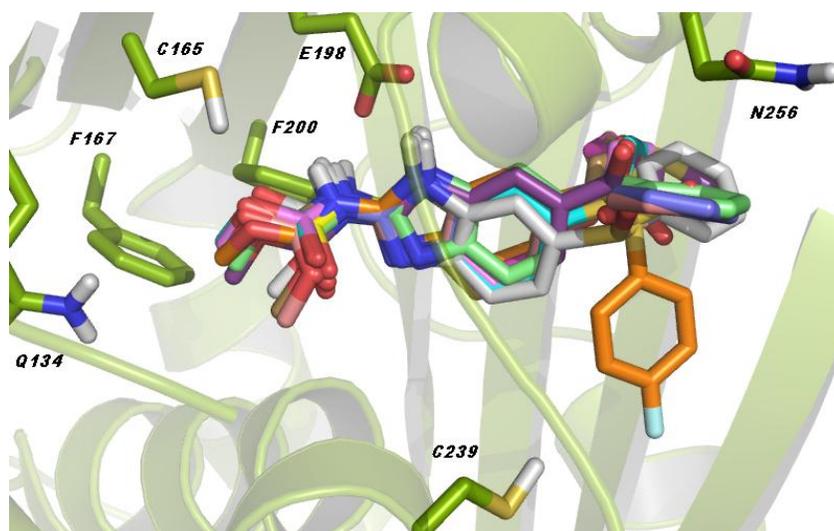


Figura 7.12. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina de *G. intestinalis*.

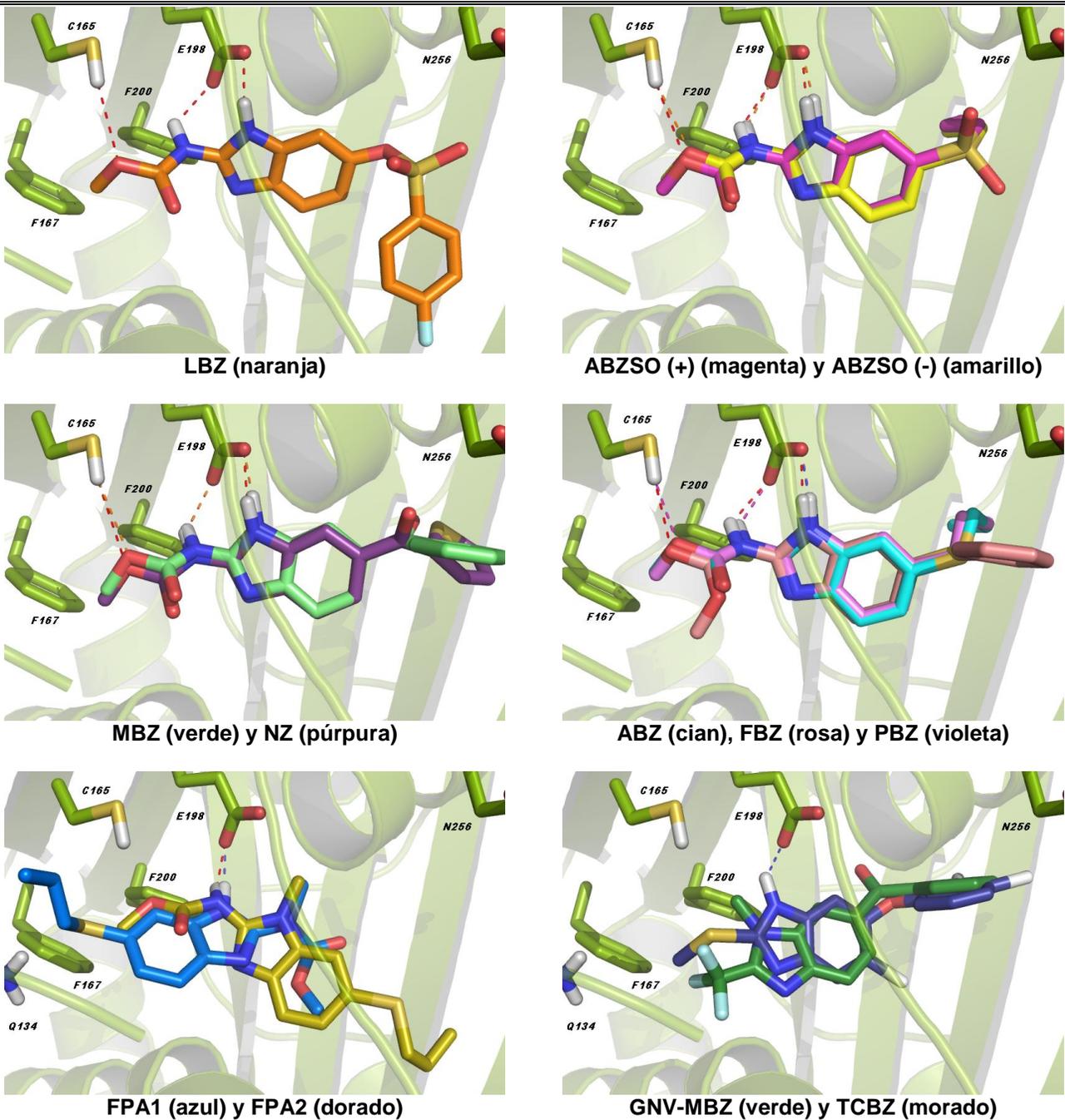


Figura 7.13. Representación de algunos acoplamientos dentro de la β -tubulina de *G. intestinalis*.

A diferencia de *T. spiralis*, en *G. intestinalis* se favoreció la conformación *trans* del grupo carbamato durante el acoplamiento. La alta similitud estructural del sitio de unión de ambos parásitos permite suponer que la diferencia conformacional se debe a la orientación de los aminoácidos Glu198 y Cys239. La ausencia en la interacción del sustituyente en 5 del benzimidazol con la cavidad se debió a que se produjo un giro de 180° del residuo Cys239 con respecto a la cadena principal, propiciando la preferencia por el tautómero 1,6.

c) *Echinococcus multilocularis*

Tabla 7.7. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Echinococcus multilocularis*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-6.61	-6.65	-6.61	-6.65
ABZ	-7.62	-7.75	-7.42	-7.55
ABZSO (+)	-7.88	-7.98	-7.67	-7.70
ABZSO (-)	-7.53	-7.87	-7.65	-7.74
MBZ	-8.48	-8.93	-8.94	-8.84
FBZ	-8.50	-8.52	-8.81	-8.23
FBZSO (+)	-8.83	-8.65	-8.86	-9.02
FBZSO (-)	-8.45	-7.96	-8.98	-9.07
OBZ	-7.07	-7.36	-6.83	-7.05
PBZ	-7.58	-7.51	-7.33	-7.47
LBZ	-8.81	-8.82	-9.06	-8.84
NZ	-8.99	-8.98	-8.64	-8.14
FPA1	-7.48	-7.58	-7.95	-8.05
FPA2	-7.45	-7.30	-7.25	-7.36
GNV-ABZ	-5.88		-5.99	
GNV-MBZ	-7.59		-7.50	
TCBZ	-7.73		-7.72	

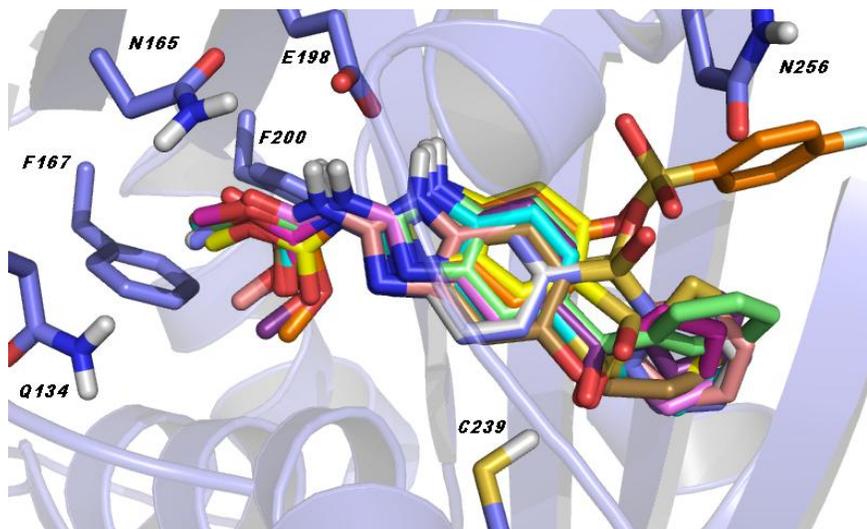


Figura 7.14. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina de *E. multilocularis*

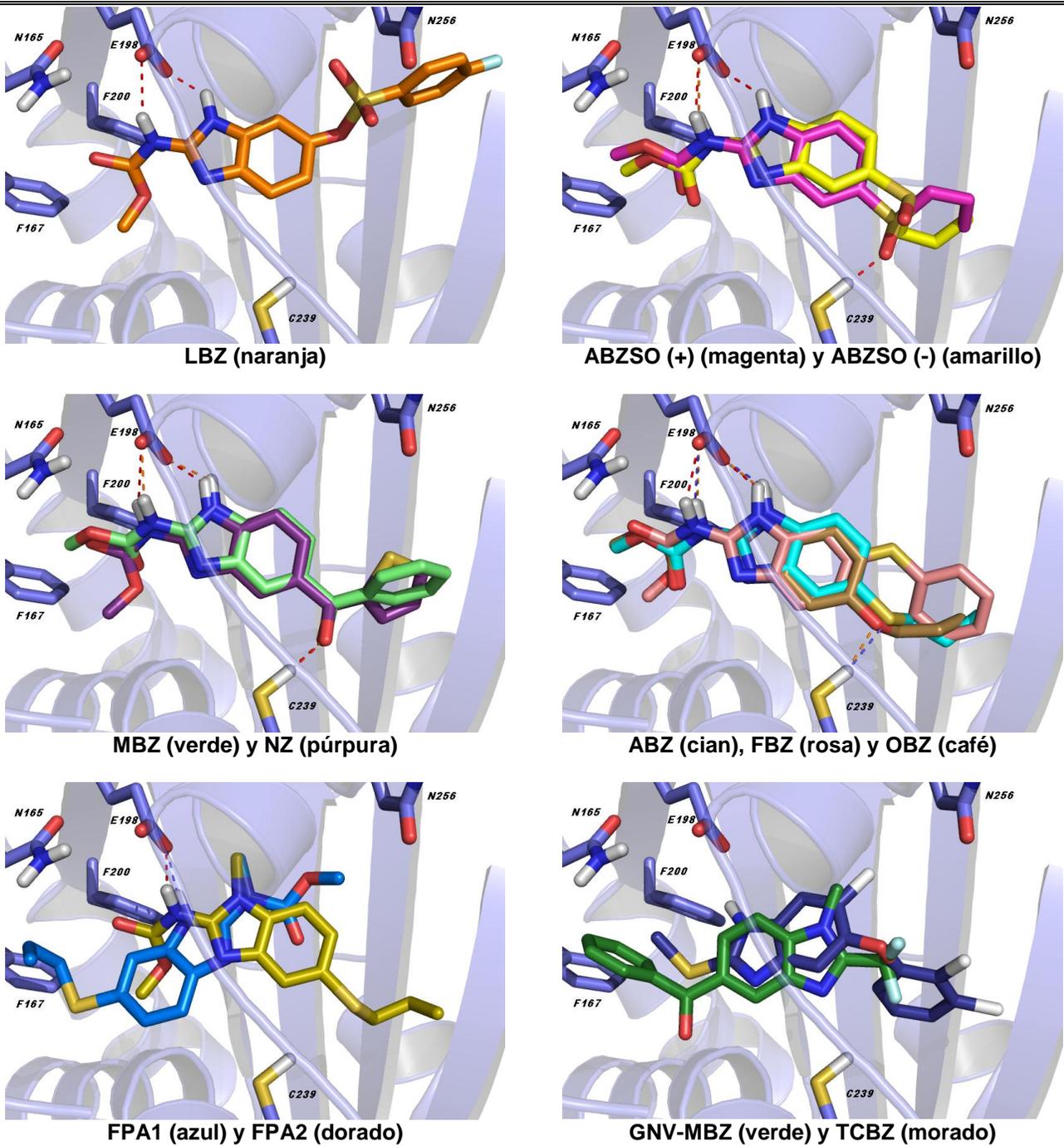


Figura 7.15. Representación de algunos acoplamiento dentro de la β -tubulina de *E. multilocularis*.

Para *E. multilocularis* el grupo de estructuras que presentó mayor número de acoplamiento preferenciales fue el isómero *trans*. El aumento en la energía de unión se puede deber principalmente a la pérdida de interacción con el aminoácido 165, puesto que la asparagina, a pesar de que posee la propiedad de ser donador de puentes de hidrógeno, presenta una orientación estructural desfavorable para interactuar directamente con el bencimidazol.

d) *Entamoeba histolytica*

Tabla 7.8. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Entamoeba histolytica*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-5.86	-5.64	-5.86	-5.64
ABZ	-6.24	-6.30	-6.41	-6.47
ABZSO (+)	-6.90	-6.83	-6.80	-6.61
ABZSO (-)	-6.56	-6.40	-6.73	-6.54
MBZ	-7.58	-8.17	-7.56	-8.01
FBZ	-7.49	-7.45	-7.73	-7.39
FBZSO (+)	-8.19	-7.78	-7.92	-7.59
FBZSO (-)	-8.32	-7.78	-7.82	-7.58
OBZ	-5.60	-5.73	-5.62	-5.69
PBZ	-6.22	-6.17	-6.39	-6.46
LBZ	-7.55	-7.30	-7.38	-7.66
NZ	-7.67	-7.97	-7.45	-7.52
FPA1	-6.97	-6.74	-6.72	-6.54
FPA2	-6.56	-6.89	-6.59	-7.62
GNV-ABZ	-6.17		-6.51	
GNV-MBZ	-8.17		-8.03	
TCBZ	-8.11		-8.25	

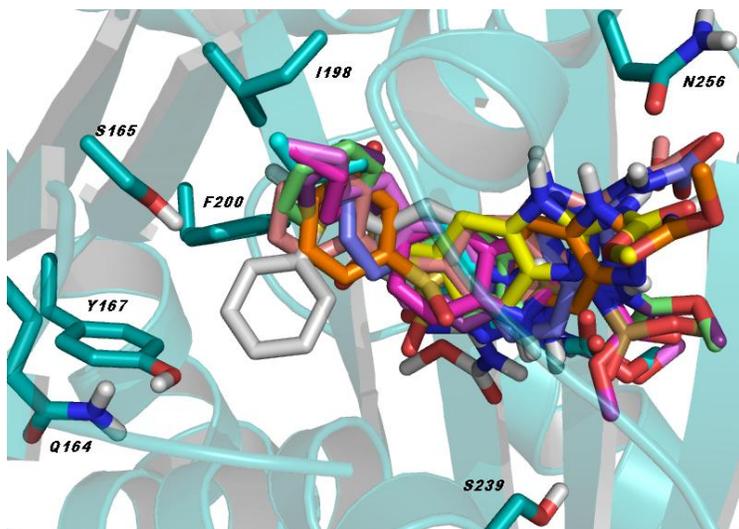


Figura 7.16. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina de *E. histolytica*.

e) *Fasciola hepatica*

Tabla 7.9. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Fasciola hepatica*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-5.39	-6.08	-5.39	-6.08
ABZ	-5.89	-5.98	-5.85	-5.85
ABZSO (+)	-6.53	-6.80	-6.54	-6.66
ABZSO (-)	-6.57	-6.62	-6.47	-6.62
MBZ	-7.34	-7.47	-7.97	-7.78
FBZ	-6.98	-7.13	-7.07	-6.90
FBZSO (+)	-7.76	-8.04	-7.37	-7.43
FBZSO (-)	-7.42	-7.11	-7.27	-7.35
OBZ	-6.18	-5.90	-5.54	-5.80
PBZ	-5.78	-5.94	-5.74	-5.84
LBZ	-7.55	-7.72	-6.98	-7.25
NZ	-8.08	-7.44	-8.23	-7.11
FPA1	-6.26	-6.34	-5.84	-5.82
FPA2	-5.67	-6.08	-6.16	-6.32
GNV-ABZ	-4.96		-5.13	
GNV-MBZ	-6.80		-6.94	
TCBZ	-7.17		-7.18	

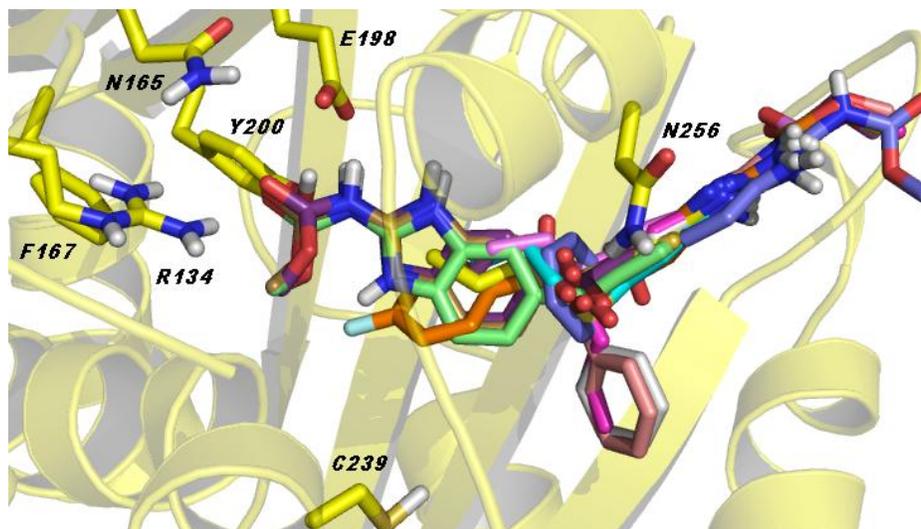


Figura 7.17. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina de *F. hepática*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de *E. histolytica* no se observó preferencia por alguna conformación en específico, debido a que la mayoría de las moléculas se acoplan en la parte externa del sitio. Esta diferencia en la afinidad se debe principalmente a la presencia del aminoácido Ile198, por lo que se descarta la posibilidad de formar puentes de hidrógeno que estabilicen a la molécula en el interior, como sucedió en los casos anteriores. Además, se observa que las moléculas FPA1 y FPA2, así como los GNVs, presentan una mayor afinidad por el sitio que las estructuras originales (ABZ y MBZ).

Para *F. hepatica* se observa una tendencia por la conformación *trans* de los carbamatos, sin embargo las energías son mayores a las de los otros organismos, y muy similares a las de *E. histolytica*. Para este caso se esperaba un aumento en la afinidad del TCBZ, por lo que se podría estar hablando de otro posible sitio de unión para este tipo de derivado bencimidazólico no carbamato de metilo. Referente a las isoformas de β -tubulina pertenecientes a este organismo, se puede decir que las variaciones de afinidad se pueden deber principalmente al nivel de expresión de estas, ya que, como se mencionó anteriormente, dos isoformas (BT4 y BT6) podrían ser más susceptibles a los carbamatos bencimidazólicos.

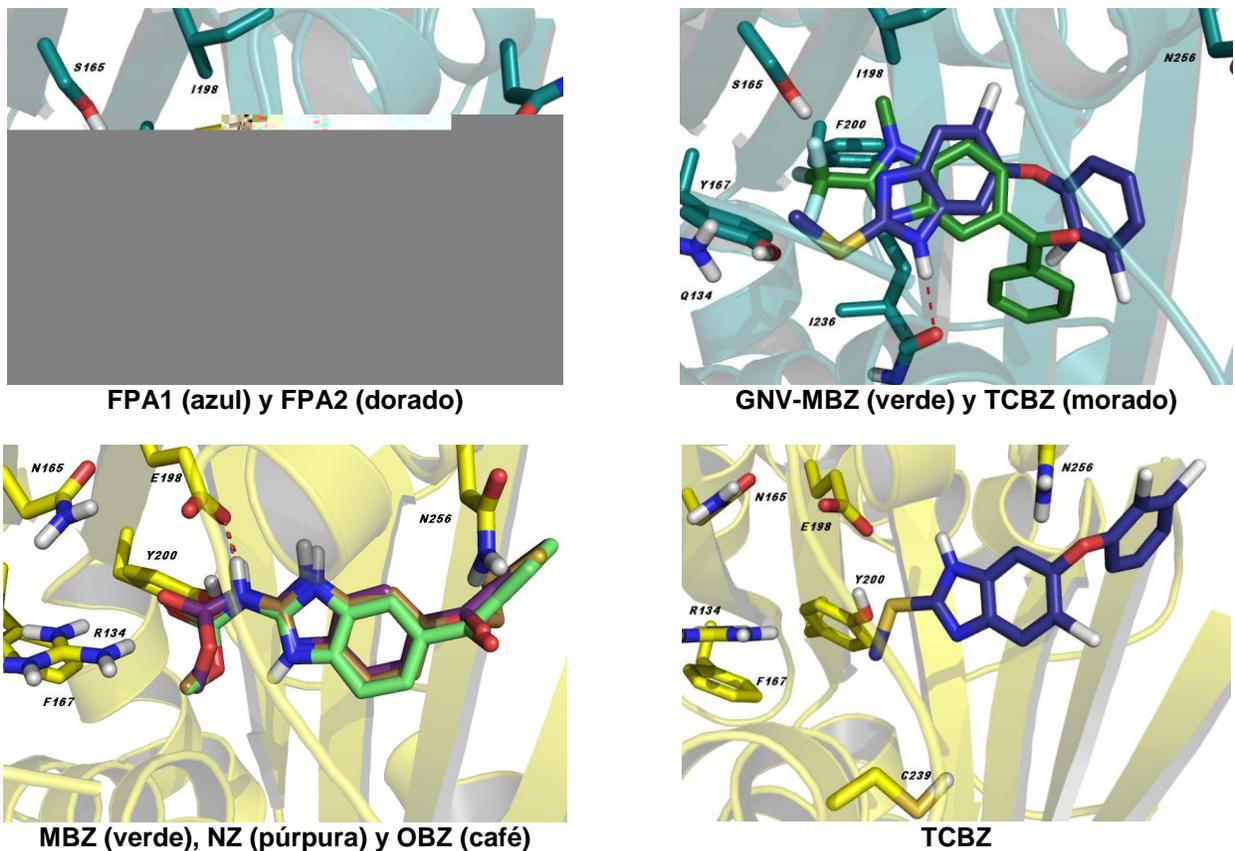


Figura 7.18. Representación de algunos acoplamientos dentro de la β -tubulina de *E. histolytica* y *F. hepatica*.

f) *Ovis aries*

Tabla 7.10. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *Ovis aries*

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-7.04	-7.21	-7.04	-7.21
ABZ	-7.44	-7.54	-7.35	-7.36
ABZSO (+)	-7.08	-7.86	-7.62	-7.80
ABZSO (-)	-7.11	-7.84	-7.72	-7.98
MBZ	-8.54	-8.98	-9.00	-8.52
FBZ	-8.68	-8.27	-8.51	-8.59
FBZSO (+)	-8.53	-8.62	-8.85	-8.98
FBZSO (-)	-8.57	-8.51	-8.94	-8.99
OBZ	-6.93	-7.12	-6.86	-6.99
PBZ	-7.37	-7.27	-7.20	-7.40
LBZ	-8.17	-8.49	-8.03	-8.84
NZ	-8.80	-8.80	-8.42	-8.54
FPA1	-6.32	-7.65	-6.32	-7.40
FPA2	-6.62	-7.34	-7.44	-7.41
GNV-ABZ	-6.02		-5.86	
GNV-MBZ	-7.04		-6.95	
TCBZ	-7.43		-7.73	

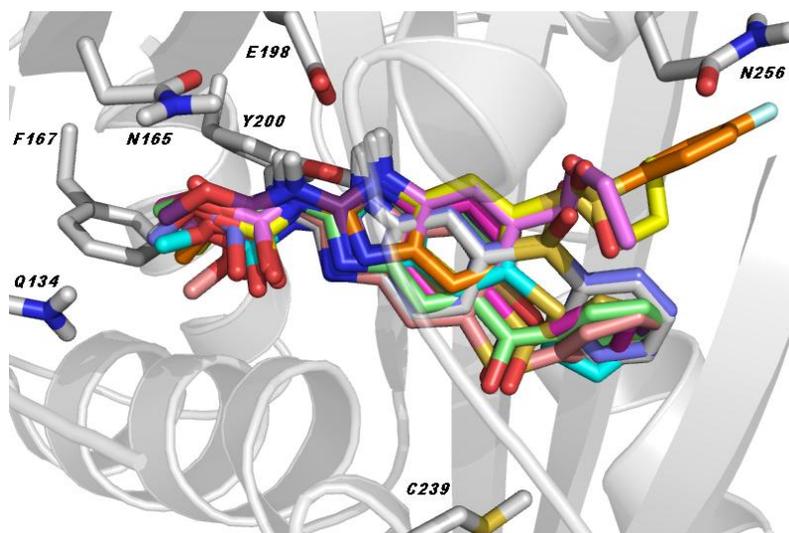


Figura 7.19. Superposición de los carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina de *O. aries*.

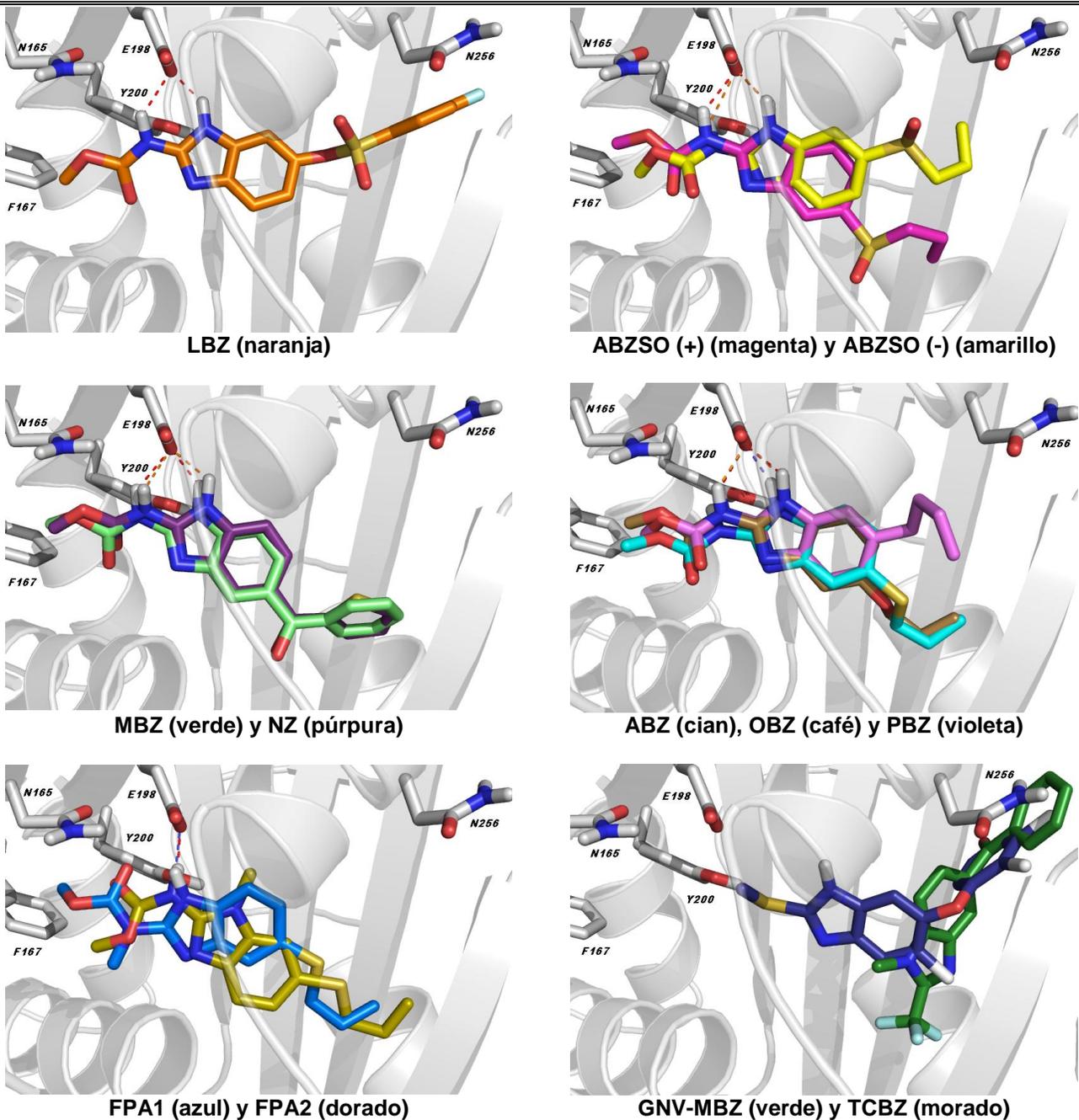


Figura 7.20. Representación de algunos acoplamientos dentro de la β -tubulina de *O. aries*.

Los acoplamientos obtenidos en el modelo de *O. aries* presentaron energías muy similares a las de los organismos susceptibles, principalmente al de *E. multilocularis*, con el cual difiere en el aminoácido 200. Por lo que la afinidad podría ser independiente de las interacciones que este aminoácido presenta en el sitio. Además, estos resultados también podrían explicar la causa de que los carbamatos bencimidazólicos se unan con menor afinidad a la β -tubulina de mamíferos.

g) Todos los organismos

Tabla 7.11. Resumen de los resultados del acoplamiento molecular obtenidos en cada modelo estudiado

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)					
	Susceptibles			Resistentes		
	<i>Ts</i>	<i>Gi</i>	<i>Em</i>	<i>Eh</i>	<i>Fh</i>	<i>Oa</i>
CBZ	-7.05	-6.92	-6.65	-5.86	-6.08	-7.21
ABZ	-7.70	-8.18	-7.75	-6.47	-5.98	-7.54
ABZSO (+)	-7.90	-8.73	-7.98	-6.90	-6.80	-7.86
ABZSO (-)	-8.03	-8.57	-7.87	-6.73	-6.62	-7.98
MBZ	-9.08	-9.08	-8.93	-8.17	-7.97	-8.98
FBZ	-8.76	-8.74	-8.81	-7.73	-7.13	-8.68
FBZSO (+)	-9.02	-9.03	-9.02	-8.19	-8.04	-8.98
FBZSO (-)	-9.15	-9.16	-9.07	-8.32	-7.42	-8.99
OBZ	-7.41	-7.63	-7.36	-5.73	-6.18	-7.12
PBZ	-7.93	-8.10	-7.58	-6.46	-5.94	-7.40
LBZ	-9.41	-9.25	-9.06	-7.66	-7.72	-8.84
NZ	-8.95	-9.10	-8.99	-7.97	-8.23	-8.80
FPA1	-7.48	-8.20	-8.05	-6.97	-6.34	-7.65
FPA2	-7.60	-7.96	-7.45	-7.62	-6.32	-7.44
GNV-ABZ	-6.40	-6.04	-5.99	-6.51	-5.13	-6.02
GNV-MBZ	-7.58	-8.01	-7.59	-8.17	-6.94	-7.04
TCBZ	-7.81	-8.56	-7.73	-8.25	-7.18	-7.73

Con base en los resultados anteriores, podemos afirmar que la afinidad de los derivados bencimidazólicos por el sitio de unión propuesto se debe principalmente a la interacción de los hidrógenos de los nitrógenos del anillo de imidazol y del carbamato, con el Glu198. La importancia de la interacción con este grupo se puede definir en los resultados obtenidos con el modelo de *E. histolytica*, en donde se observa claramente que hubo una disminución en afinidad por el sitio de unión debido a la pérdida de esta interacción. Además, se encontró que, en la mayoría de los casos, la interacción con el NH del anillo de imidazol es más importante que la que se forma con el carbamato, esto basado en los resultados obtenidos con las moléculas FPA1 y FPA2. Este análisis concuerda con los resultados biológicos reportados por Jaime Pérez Villanueva.⁸⁵

Adicionalmente, se pudieron observar interacciones complementarias para la estabilización de los derivados bencimidazólicos en el sitio, dentro de las cuales se encuentran principalmente a los aminoácidos de las posiciones 165 y 239. Los aminoácidos en estas posiciones presentaron, en todos los organismos, la propiedad de ser donadores de puentes de hidrógeno, cuya función se vio limitada por la conformación espacial adquirida por el residuo. Para el caso de los organismos susceptibles, cuya variación del sitio de unión es debida principalmente a modificaciones en estas posiciones, se evaluaron las combinaciones posibles para determinar cuál de las interacciones complementarias era más importante. En el modelo de *T. spiralis* se evaluaron ambas interacciones, en donde se observó que la interacción del sustituyente de la posición 5 del bencimidazol con la Cys239 permitió la aproximación del carbonilo del carbamato al aminoácido Thr165, favoreciendo la formación del puente de hidrógeno. El modelo de *G. intestinalis* permitió comprobar que la falta de interacción con el aminoácido Cys239 no afecta la estabilidad de la molécula en el sitio, pero sí favorece que el carbamato bencimidazólico adquiera la conformación tautomérica 1,6. De forma complementaria, en el caso del modelo de *E. multilocularis*, ningún derivado interactuó con la Asp165, pero sí con la Cys239, favoreciendo la tautomería 1,5. Dada la alta similitud en la energía de unión de los diferentes derivados bencimidazólicos en los modelos de organismos susceptibles, podemos inferir que estas interacciones complementarias no son determinantes para la unión del bencimidazol al sitio, sin embargo, podrían explicar las diferencias de afinidad dentro de los grupos susceptibles.

En cuanto a la conformación estructural más favorecida, se puede afirmar que el isómero *cis* y *trans* del carbamato se pueden encontrar en proporciones similares durante un acoplamiento, dado que ambas permiten la exposición de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno para la interacción con el aminoácido 165, en caso de ser posible. Sin embargo, el isómero *trans* es energéticamente más estable, por lo que en la mayoría de los acoplamientos se favoreció su conformación. En el caso de los tautómeros 1,5 y 1,6, su incidencia se debió principalmente a la presencia o ausencia de interacción que presenta el derivado bencimidazólico con el aminoácido 239.

Las moléculas ABZSO (-) y FBZSO (-) presentaron, en la mayoría de los casos, un mejor acoplamiento que su análogo enantiomérico y que la molécula original. No obstante, este acoplamiento es desfavorable desde el punto de vista metabólico, puesto que dicho enantiómero es más propenso a sufrir la segunda oxidación para formar la sulfona, lo que aumenta la rapidez de su eliminación y disminuye la probabilidad de que se una al sitio.

7.3.2. Acoplamiento molecular con mutaciones de resistencia

Para realizar el análisis de resistencia se tomó como modelo de estudio a la estructura de *T. spiralis*, dado que este organismo presenta un alto ID en relación a las isoformas BT1 y BT2 de *H. contortus*, a las cuales se les han identificado las tres mutaciones y se han registrado en el NCBI las de las posiciones 198 y 200, con confirmación experimental de la resistencia. Adicionalmente, este estudio permitirá comprobar si dichas mutaciones afectarían la afinidad de los bencimidazoles en cualquier organismo en las que se presentasen. En la Figura 7.21 se representan las modificaciones estructurales en el sitio de unión al sufrir las mutaciones que se encuentran relacionadas con el mecanismo de resistencia.

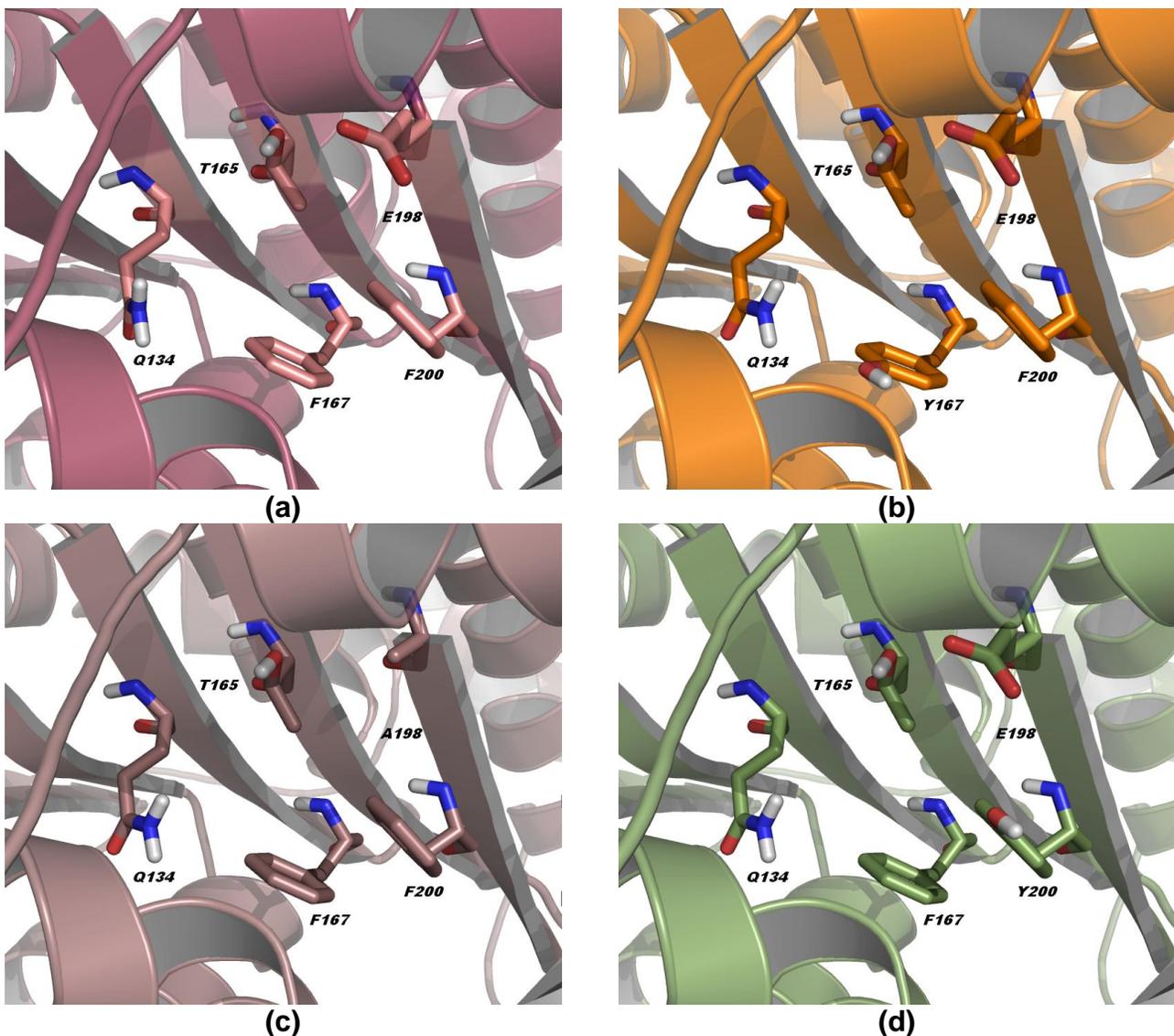


Figura 7.21. Principales aminoácidos presentes en el sitio de unión en los modelos de *T. spiralis*: (a) WT, (b) F167Y, (c) E198A y (d) F200Y.

a) Mutación F167Y

Tabla 7.12. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *T. spiralis* con la mutación F167Y

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-6.86	-6.74	-6.86	-6.74
ABZ	-7.57	-7.44	-7.43	-7.46
ABZSO (+)	-8.33	-8.13	-7.63	-8.02
ABZSO (-)	-6.38	-7.59	-7.90	-7.92
MBZ	-8.22	-8.98	-8.62	-8.62
FBZ	-8.38	-8.45	-8.60	-8.36
FBZSO (+)	-8.92	-8.80	-8.80	-8.80
FBZSO (-)	-8.34	-8.47	-8.97	-8.96
OBZ	-7.27	-7.06	-6.93	-6.82
PBZ	-7.82	-7.56	-7.23	-7.28
LBZ	-8.10	-8.41	-8.65	-8.49
NZ	-8.57	-8.82	-8.71	-8.65
FPA1	-6.33	-7.58	-7.15	-7.51
FPA2	-6.89	-7.50	-6.15	-7.10
GNV-ABZ	-6.11		-5.75	
GNV-MBZ	-7.32		-7.09	
TCBZ	-7.67		-6.54	

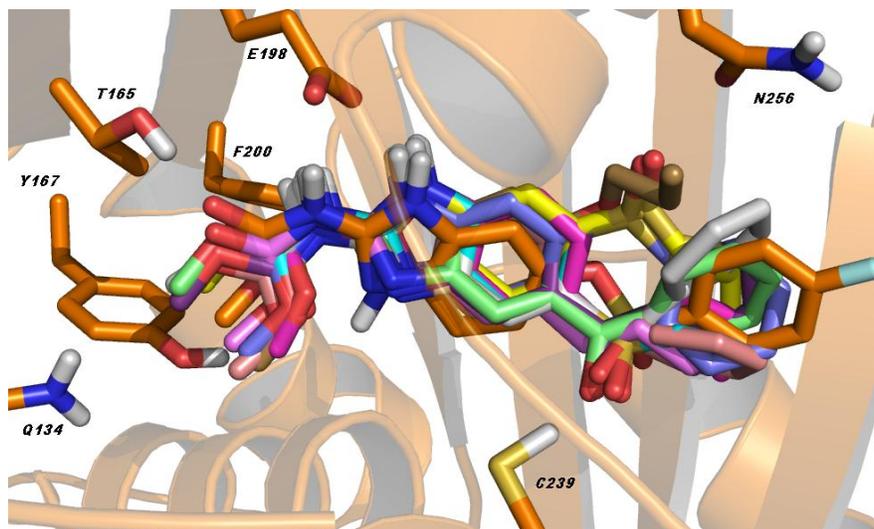


Figura 7.22. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina.

b) Mutación E198A

Tabla 7.13. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *T. spiralis* con la mutación E198A

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-5.49	-5.32	-5.49	-5.32
ABZ	-6.15	-6.57	-6.59	-6.60
ABZSO (+)	-6.57	-6.90	-7.20	-7.22
ABZSO (-)	-6.37	-6.95	-7.04	-6.70
MBZ	-7.59	-8.18	-7.79	-8.14
FBZ	-7.61	-7.44	-8.00	-7.80
FBZSO (+)	-7.79	-7.81	-7.89	-8.25
FBZSO (-)	-7.73	-7.82	-7.97	-8.16
OBZ	-5.63	-5.99	-6.21	-6.03
PBZ	-6.26	-6.58	-6.50	-6.52
LBZ	-7.65	-7.45	-7.66	-7.69
NZ	-7.44	-7.87	-7.99	-7.97
FPA1	-6.49	-6.82	-6.60	-6.93
FPA2	-6.49	-6.51	-6.37	-6.93
GNV-ABZ	-5.98		-5.95	
GNV-MBZ	-7.69		-7.90	
TCBZ	-7.96		-7.96	

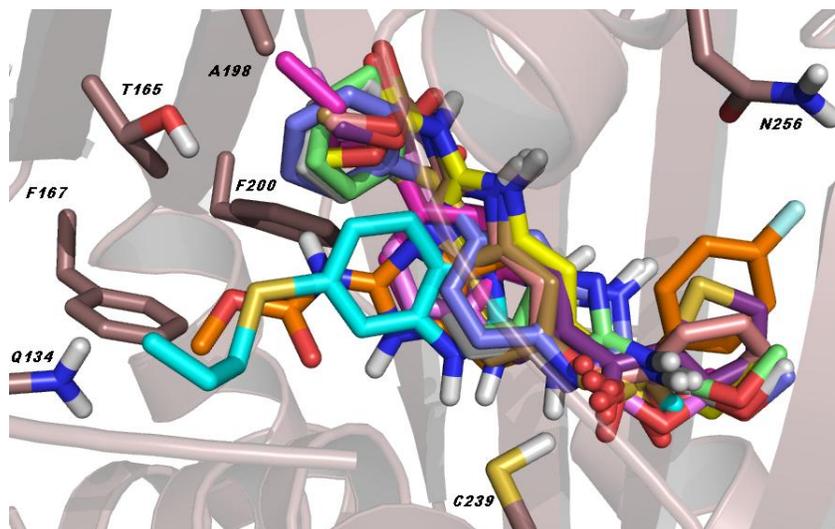


Figura 7.23. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina.

c) Mutación F200Y

Tabla 7.14. Resultados del acoplamiento molecular en el modelo de *T. spiralis* con la mutación F200Y

Moléculas	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	<i>cis</i> -1,5	<i>trans</i> -1,5	<i>cis</i> -1,6	<i>trans</i> -1,6
CBZ	-7.03	-6.94	-7.03	-6.94
ABZ	-7.66	-7.55	-7.36	-7.31
ABZSO (+)	-7.40	-8.18	-7.82	-8.09
ABZSO (-)	-7.72	-7.73	-7.91	-7.87
MBZ	-7.61	-9.22	-9.00	-8.60
FBZ	-8.99	-8.78	-8.97	-8.35
FBZSO (+)	-7.99	-9.13	-8.42	-8.84
FBZSO (-)	-7.91	-8.70	-8.83	-9.25
OBZ	-7.33	-7.17	-6.88	-6.93
PBZ	-7.13	-7.91	-7.37	-7.23
LBZ	-8.84	-8.64	-7.01	-8.39
NZ	-9.08	-8.77	-8.41	-8.67
FPA1	-6.74	-7.54	-7.07	-7.55
FPA2	-5.96	-7.23	-6.66	-6.53
GNV-ABZ	-6.16		-5.94	
GNV-MBZ	-7.31		-6.88	
TCBZ	-7.13		-7.40	

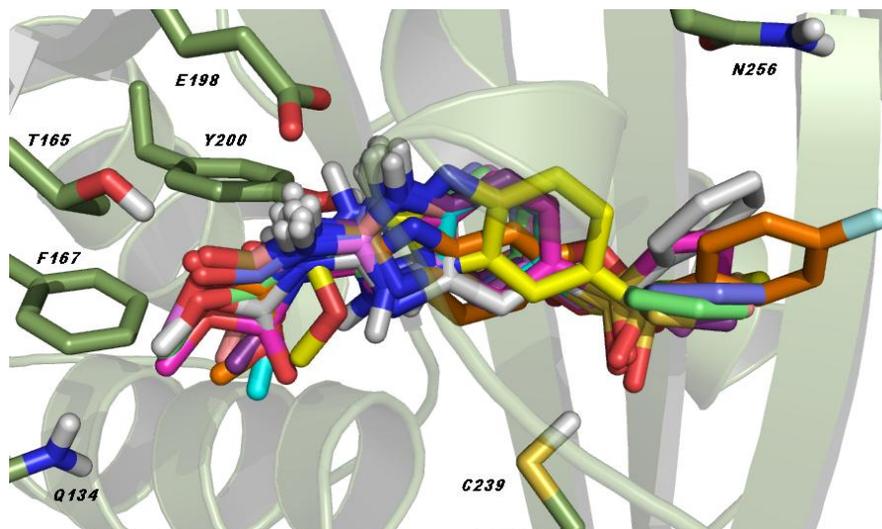


Figura 7.24. Superposición de algunos carbamatos bencimidazólicos dentro de la β -tubulina.

d) Comparación del efecto de las mutaciones

Tabla 7.15. Resumen de resultados del acoplamiento molecular en los modelos de *T. spiralis*

Molécula	$\Delta G_{unión}$ (kcal/mol)			
	WT	F167Y	E198A	F200Y
CBZ	-7.05	-6.86	-5.49	-7.03
ABZ	-7.70	-7.57	-6.60	-7.66
ABZSO (+)	-7.90	-8.33	-7.22	-8.18
ABZSO (-)	-8.03	-7.92	-7.04	-7.91
MBZ	-9.08	-8.98	-8.18	-9.22
FBZ	-8.76	-8.60	-8.00	-8.99
FBZSO (+)	-9.02	-8.80	-8.25	-9.13
FBZSO (-)	-9.15	-8.97	-8.16	-9.25
OBZ	-7.41	-6.93	-6.21	-7.33
PBZ	-7.93	-7.82	-6.58	-7.91
LBZ	-9.41	-8.65	-7.69	-8.84
NZ	-8.95	-8.82	-7.99	-9.08
FPA1	-7.48	-7.58	-6.93	-7.55
FPA2	-7.60	-7.50	-6.93	-6.66
GNV-ABZ	-6.40	-6.11	-5.98	-6.16
GNV-MBZ	-7.58	-7.32	-7.90	-7.31
TCBZ	-7.81	-7.67	-7.96	-7.40

Basado en los resultados mostrados en la Tabla 7.15, podemos confirmar la importancia de la presencia del residuo de glutamato en la posición 198 para la interacción de los carbamatos bencimidazólicos con el sitio de unión. En el caso de las mutaciones en las posiciones 167 y 200, se puede observar una alta similitud energética con respecto al modelo del organismo silvestre, por lo que el mecanismo de resistencia que inducen estas mutaciones no es debido a las interacciones, tal y como se había confirmado con el modelo de *O. aries*. Para evaluar todos los factores que modifican el acoplamiento a causa de las mutaciones en las posiciones 167 y 200, se decidió realizar un análisis comparativo del tamaño del clúster (CS, por sus siglas en inglés), el cual nos permite conocer la probabilidad de que cierto derivado bencimidazólico adquiriera dicha conformación, y el número de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

acoplamientos fuera del sitio propuesto (AFS), y así tener una aproximación de la facilidad con la que la molécula se introduce al sitio propuesto.

Tabla 7.16. Resumen de resultados del acoplamiento molecular en los modelos de *T. spiralis*

Molécula	WT			F167Y			F200Y		
	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	CS	AFS	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	CS	AFS	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	CS	AFS
CBZ	-7.05	9	3	-6.86	7	1	-7.03	12	3
ABZ	-7.70	11	7	-7.57	7	13	-7.66	5	15
ABZSO (+)	-7.90	7	9	-8.33	5	13	-8.18	1	16
ABZSO (-)	-8.03	9	9	-7.92	4	15	-7.91	2	17
MBZ	-9.08	18	1	-8.98	14	5	-9.22	15	5
FBZ	-8.76	8	9	-8.60	8	12	-8.99	4	13
FBZSO (+)	-9.02	5	6	-8.80	7	9	-9.13	8	11
FBZSO (-)	-9.15	13	7	-8.97	6	11	-9.25	8	3
OBZ	-7.41	14	4	-6.93	3	11	-7.33	8	10
PBZ	-7.93	14	6	-7.82	7	8	-7.91	13	6
LBZ	-9.41	6	11	-8.65	4	14	-8.84	3	12
NZ	-8.95	14	1	-8.82	11	5	-9.08	3	14
FPA1	-7.48	12	4	-7.58	5	9	-7.55	2	16
FPA2	-7.60	1	16	-7.50	5	12	-6.66	1	18
GNV-ABZ	-6.40	11	9	-6.11	3	1	-6.16	2	4
GNV-MBZ	-7.58	9	4	-7.32	5	7	-7.31	3	10
TCBZ	-7.81	2	13	-7.67	1	14	-7.40	2	14

En la Tabla 7.16 se muestran los resultados al considerar los nuevos parámetros comparativos, en donde se seleccionaron las moléculas del grupo que cumplieron con al menos dos de los tres parámetros: poseer una menor energía de unión, un mayor tamaño de clúster o un menor número de acoplamientos fuera del sitio. Esta comparación permitió comprobar que existe una mayor afinidad por el sitio de unión de la estructura silvestre; así como también permitió identificar al efecto estérico como posible causa de la diferencia de dicha afinidad al observar que varios de los acoplamientos, en las estructuras mutantes, se

encuentran fuera del sitio propuesto. Adicionalmente, se propone que el efecto inhibitorio puede deberse principalmente al mecanismo de apertura y cierre del sitio por inducción del ligando, por lo que el estudio de dinámica molecular, reportado en el apartado 7.4 del presente trabajo, permitió formular varias teorías en torno a este principio.

7.3.3. Inhibición competitiva con la colchicina

Utilizando el modelo de *T. spiralis*, con el resultado del acoplamiento del ABZ al sitio de unión propuesto, se realizó una superposición estructural con el dímero de α/β -tubulina de *Bos taurus* (PDB ID: 1SA0, subunidades C y D), el cual se encuentra co-cristalizado con la colchicina. Esto se realizó con el fin de comprobar que el sitio de unión identificado se encuentra próximo al sitio de unión de la colchicina, así como también se demuestra la posible causa por la cual los diferentes carbamatos bencimidazólicos inhiben la unión de la colchicina al sitio. En la Figura 7.25 se observa que en la interface del heterodímero, donde se encuentran ambos sitios, se presenta una superposición estructural del ABZ con la estructura de la colchicina, lo que demuestra la existencia de un mecanismo de inhibición de tipo competitivo entre ambas estructuras.

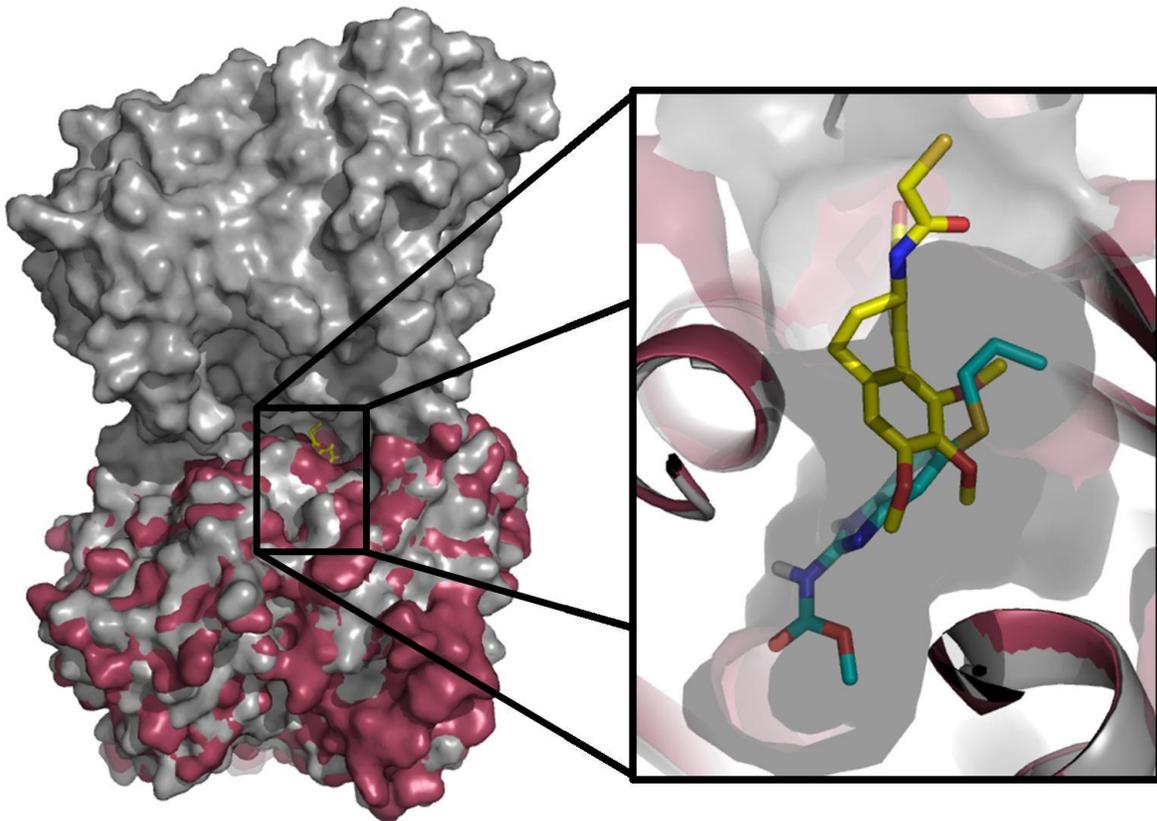


Figura 7.25. Representación de la competencia del albendazol con la colchicina por el sitio.

7.4. Dinámica molecular

Esta técnica se empleó con el fin de confirmar la estabilidad dinámica de los modelos proteicos generados y de los complejos proteína-ligando obtenidos, a fin de validar los resultados del estudio de acoplamiento molecular. Para este estudio se emplearon los modelos generados para el organismo *T. spiralis*, realizando una evaluación con y sin ligandos a cada uno de ellos.

7.4.1. Evaluación de modelos sin ligandos

Para evaluar el comportamiento dinámico de los modelos generados para *T. spiralis*, se calculó el RMSD de cada uno de ellos por un periodo de 10 ns, su tendencia se encuentra representada en el Gráfico 1. Con este gráfico se puede observar que los cuatro modelos presentaron pocas modificaciones estructurales a lo largo de la dinámica, puesto que poseen un RMSD menor a 0.4 nm. Las principales causas de la modificación estructural se deben a los aminoácidos superficiales, loops y regiones terminales. Sin embargo, en el caso del modelo con la mutación E198A, se presentó una mayor variación debido a que la disminución espacial del aminoácido permitió la introducción de un mayor número de moléculas de agua al sitio, propiciando a su vez el aumento en los grados de libertad de los aminoácidos contiguos.

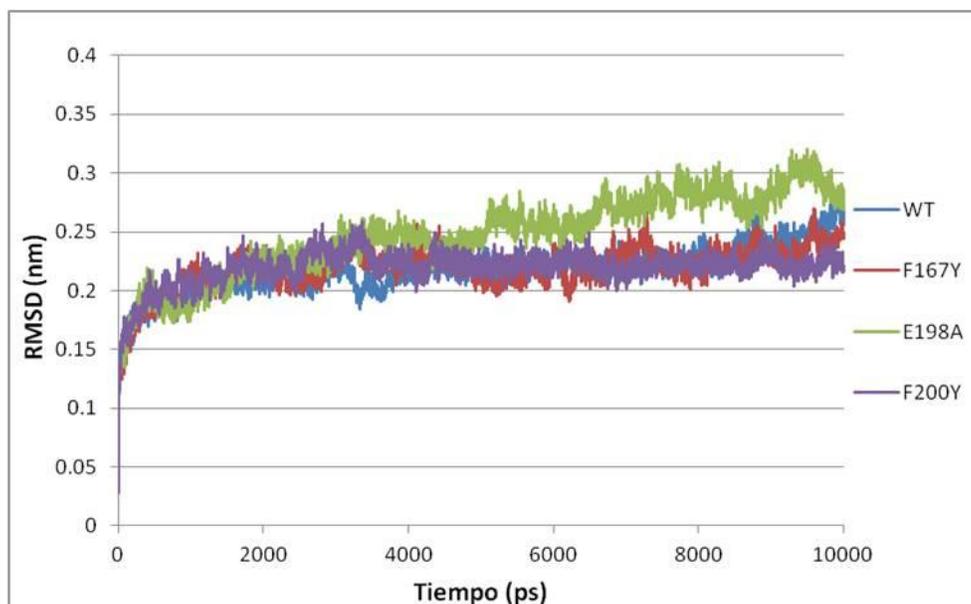


Gráfico 1. RMSD del esqueleto de los modelos de *Trichinella spiralis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de acoplamiento molecular permitió comprobar la importancia de la presencia del aminoácido Glu198, al observar que la mutación por alanina propició la disminución de las interacciones con el ligando. No obstante, para el caso de las mutaciones en las posiciones 167 y 200, no se observó diferencia significativa en la energía de unión, por lo que se propuso que el mecanismo de resistencia se podía deber principalmente a ciertas alteraciones, inherentes a la inducción del ligando, en el mecanismo de apertura y cierre del sitio de unión. Esta suposición se fundamenta en el hecho de que al convertir un aminoácido no polar (Phe) en uno polar (Tyr), se modifican las propiedades fisicoquímicas de las posiciones mutadas, adquiriendo así la capacidad de interactuar con otros aminoácidos mediante la formación de puentes de hidrógeno. A fin de comprobar esta teoría, se analizaron los puentes de hidrógeno que forman estos nuevos aminoácidos con los de alrededor, evaluando así el posible efecto de dicha interacción.

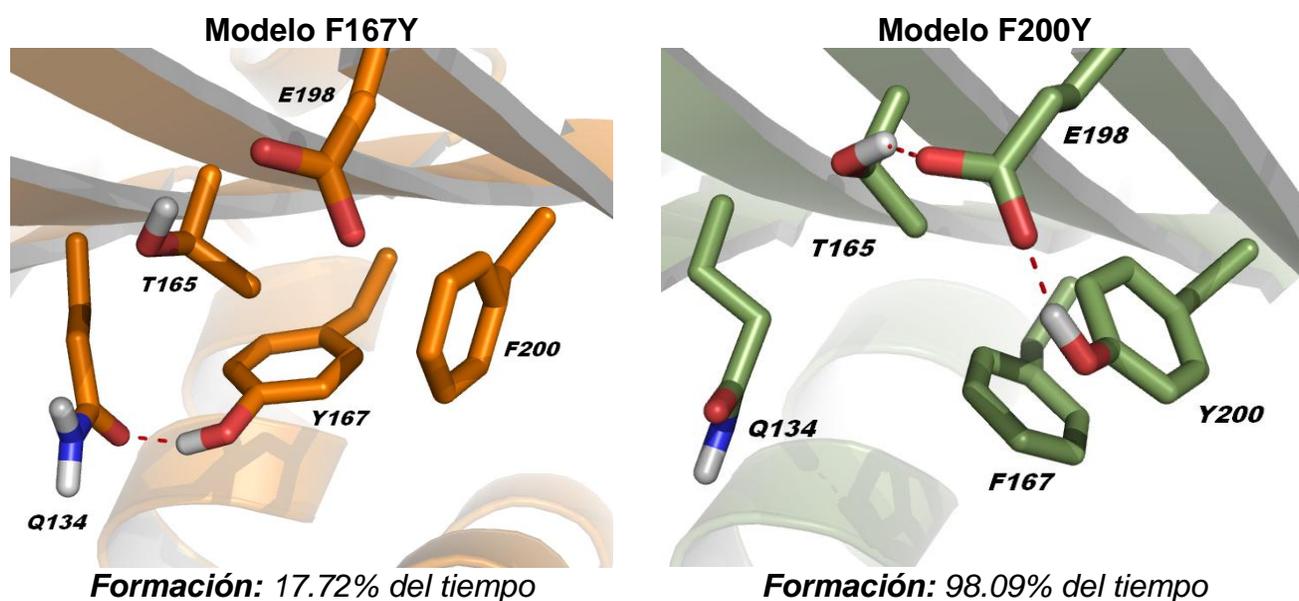


Figura 7.26. Puentes de hidrógeno intramoleculares en los modelos F167Y y F200Y.

En la Figura 7.26 se muestran las principales interacciones intramoleculares que presentan los modelos con las mutaciones F167Y y F200Y, así como también se reporta el porcentaje de ocurrencia de dicho puente de hidrógeno a lo largo de los 10 ns.

La interacción de puente de hidrógeno que presenta el grupo hidroxilo de la Tyr167 con la amida de la Gln134 tiene baja incidencia (17.72%) según el tiempo evaluado, sin embargo, esta interacción propicia la disminución las dimensiones de la cavidad en la parte terminal del sitio de unión, lo que posiblemente dificulta la introducción del grupo carbamato del

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bencimidazol durante el acoplamiento. Es importante señalar que los aminoácidos Tyr167 y Gln134 se encuentran conformando dos hojas beta paralelas contiguas, la S4 y S3, respectivamente, es por esto que la interacción dificulta la movilidad entre ellas. Cabe mencionar que el mecanismo de inhibición aquí propuesto explica la baja significancia que la mutación F167Y genera en algunos organismos, como es el caso de *Trichomonas vaginalis* (S) y *Entamoeba histolytica* (R), los cuales poseen al aminoácido Tyr167 en su secuencia. Es posible observar que la causa principal de la diferencia entre la susceptibilidad y la resistencia que presentan dichos organismos, respectivamente, se debe principalmente a la presencia de una isoleucina en la posición 198 de la secuencia de *E. histolytica*, tal como se observó con los estudios de acoplamiento. Esto a su vez permitió comprobar el hecho de que el efecto que tiene la tirosina en la posición 167 es de poca relevancia en el mecanismo de resistencia. Estos resultados permitirían ampliar el estudio al caso específico de los nematodos equinos, en busca de la posible causa de su falta de susceptibilidad a los carbamatos bencimidazólicos.

Adicionalmente, durante la interacción de puente de hidrógeno del hidroxilo de la Tyr200 con el carboxilato del Glu198, no se observa inhibición en el mecanismo de apertura, puesto que estos aminoácidos se encuentran en un mismo segmento de hoja beta (S5). Sin embargo, se observa disminución en la superficie de la cavidad debido a esta interacción, así como también restringe el plegamiento del residuo Glu198, lo que de cierta forma reduce la probabilidad de interacción con el ligando en cuestión, como se mostrará más adelante. Esta nueva teoría se contrapone con la propuesta por Robinson y colaboradores, en donde se expone la posibilidad de que exista la disminución en la exposición del sitio de unión debida a la posible interacción entre el aminoácido Tyr200 con el aminoácido 165.²² No obstante, cabe a señalar que esta explicación no es aplicable a todos los organismos que presentan resistencia debida a la presencia de tirosina en la posición 200, puesto que algunos de ellos tienen un aminoácido en la posición 165 que no puede formar puentes de hidrogeno con el residuo de tirosina, tal es el caso de la isoforma BT1 de *H. contortus*, *T. circumcincta* y la isoforma BT2 de *E. multilocularis* (Ver Figura 7.27).

```
160      170      180      190      200
YPDRIMASFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCID H.contortus_BT1MT200/1-448
YPDRIMASFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCID T.circumcincta_BT1MT200/1-93
YPDRIMMTYSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCID E.multilocularis_BT2/1-445
```

Figura 7.27. Alineamiento de secuencias de tres organismos resistentes al tratamiento con bencimidazoles.

7.4.2. Evaluación del modelo WT de *T. spiralis* con ligandos

Una vez evaluado el comportamiento de los modelos aislados, se procedió a estudiar el comportamiento de los complejos obtenidos durante el estudio de acoplamiento molecular. De forma inicial se evaluaron todos los carbamatos bencimidazólicos con el modelo WT de *T. spiralis*, con el fin de estudiar el comportamiento de los mismos durante un periodo de 3 ns. En el Gráfico 2 se muestra el resultado de dicha evaluación con base en los resultados de RMSD obtenidos durante la dinámica, observándose que varios de los complejos formados presentan alta estabilidad al poseer un bajo RMSD y una tendencia definida en los valores del mismo.

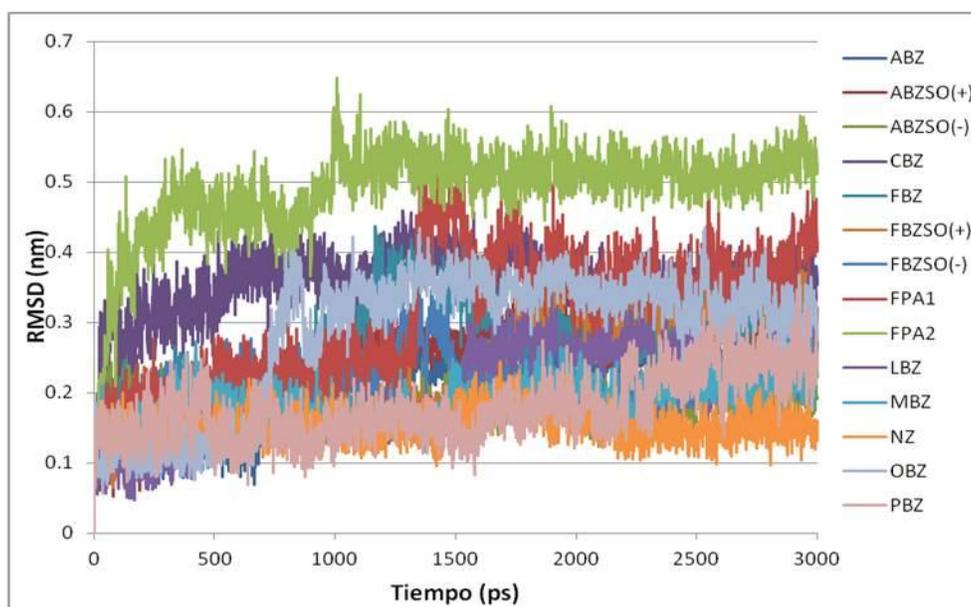


Gráfico 2. RMSD de los complejos proteína-ligando en el modelo WT de *T. spiralis*.

El compuesto FPA2 presentó el mayor valor de RMSD debido al desplazamiento de la molécula del sitio original, lo que a su vez corroboró la baja afinidad de la molécula por el sitio, a diferencia del compuesto FPA1, el cual logró estabilizar el complejo por un periodo de tiempo más prolongado (1400 ps). Esta estabilización se debió, principalmente, a la formación de un puente de hidrógeno a lo largo de la dinámica, como se muestra en la Tabla 7.17, mientras que el compuesto FPA2 la mayor parte del tiempo no tuvo este tipo de interacción. En la Figura 7.28 se esquematizan las conformaciones adquiridas de los compuestos FPA1 y FPA2 a diferentes tiempos de la dinámica molecular, en donde se observa que el compuesto FPA1 mantiene la interacción con el Glu198 durante un gran lapso

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de tiempo. Al romperse este puente de hidrógeno, el FPA1 se mantiene en el sitio debido a la interacción que mantiene con la Gln134, a diferencia del FPA2, en el cual la interacción se rompe a los pocos picosegundos, lo que conlleva a ser desplazado fuera del sitio. Esta comparación nos permite concluir que, a pesar de que ambas moléculas presentaron una energía de unión similar durante el estudio acoplamiento molecular, la falta de grupos capaces de donar protones disminuye la posibilidad de que FPA2 se mantenga en el sitio, siendo relevante la carencia de dicha interacción en la posición 1 del bencimidazol. En el caso del CBZ ocurre algo similar, puesto que la falta de un sustituyente en el núcleo de bencimidazol elimina la posibilidad de que la molécula se ancle al sitio, lo que disminuye la interacción de puentes de hidrógeno que ésta genera inicialmente con el Glu198.

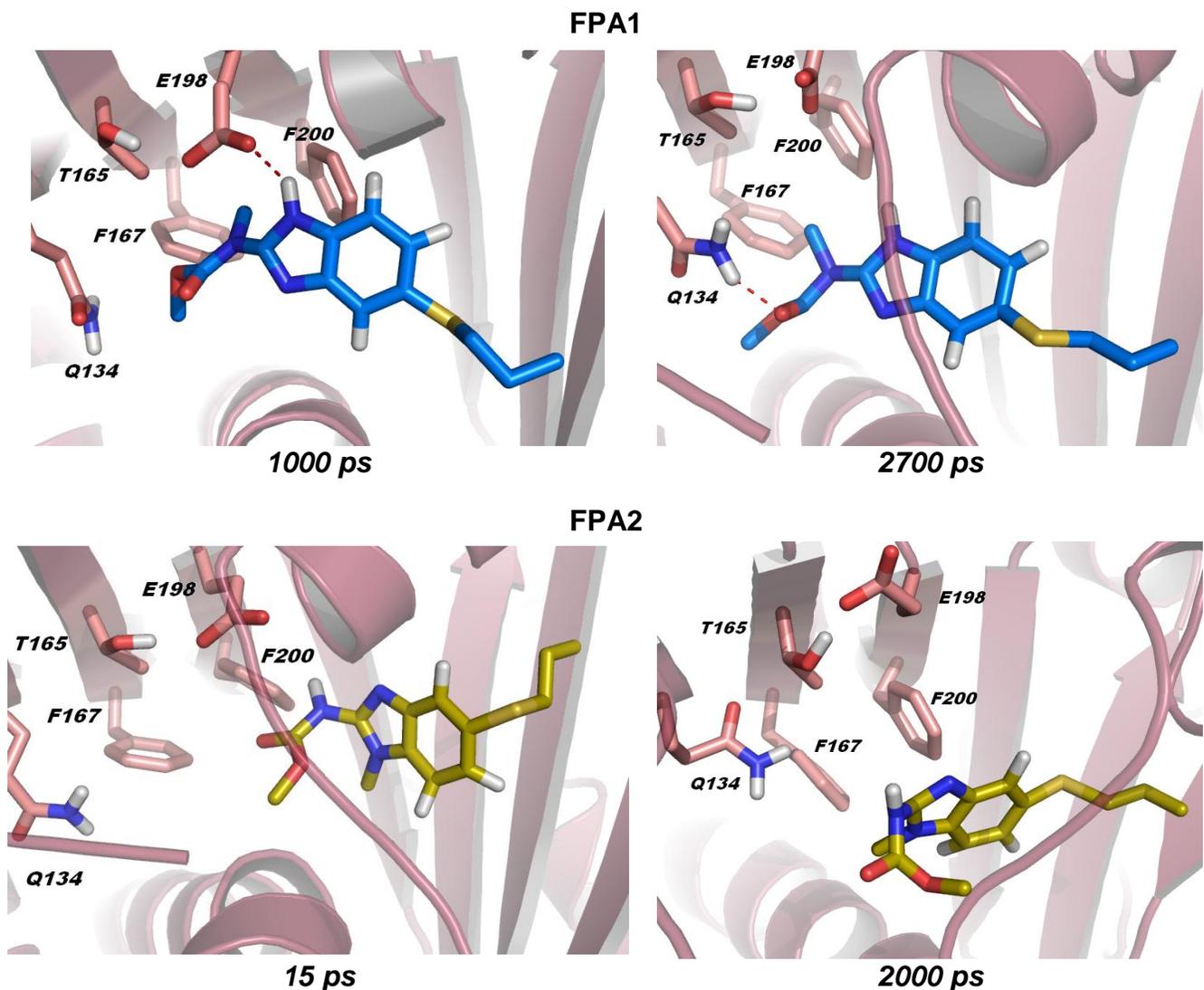


Figura 7.28. Acoplamientos de las moléculas FPA1 y FPA2 a evaluados a diferentes tiempos en la DM.

Para los ligando restantes, el estudio de dinámica mostró la permanencia de los mismos en los sitios de unión, estableciendo como principal interacción la formación del puente de hidrógeno con el aminoácido Glu198, y en donde la variación se debió principalmente al número de grados de libertad que presenta el sustituyente en 5, siendo mayor para el caso del ABZ, OBZ y PBZ, y menor para el NZ, MBZ y FBZ, lo que correlacionó con una tendencia menor en la variación del RMSD. Adicionalmente, durante el estudio de la dinámica molecular se observó la formación de una nueva interacción con el aminoácido Gln134, con el cual el ligando genera un puente de hidrógeno por parte del carbonilo del carbamato con el grupo amino de la amida de la Gln134, tal como se muestra en la Figura 7.29. Por esta razón, los intervalos de puentes de hidrógeno representados en la Tabla 7.17 exceden al número estimado durante el acoplamiento. Esta interacción es de gran relevancia puesto que permite, en gran medida, la retención del ligando en el sitio de unión, manteniendo a su vez la interacción con el Glu198. Es por esto que esta interacción podría facilitar la introducción del ligando al sitio y su permanencia en él.

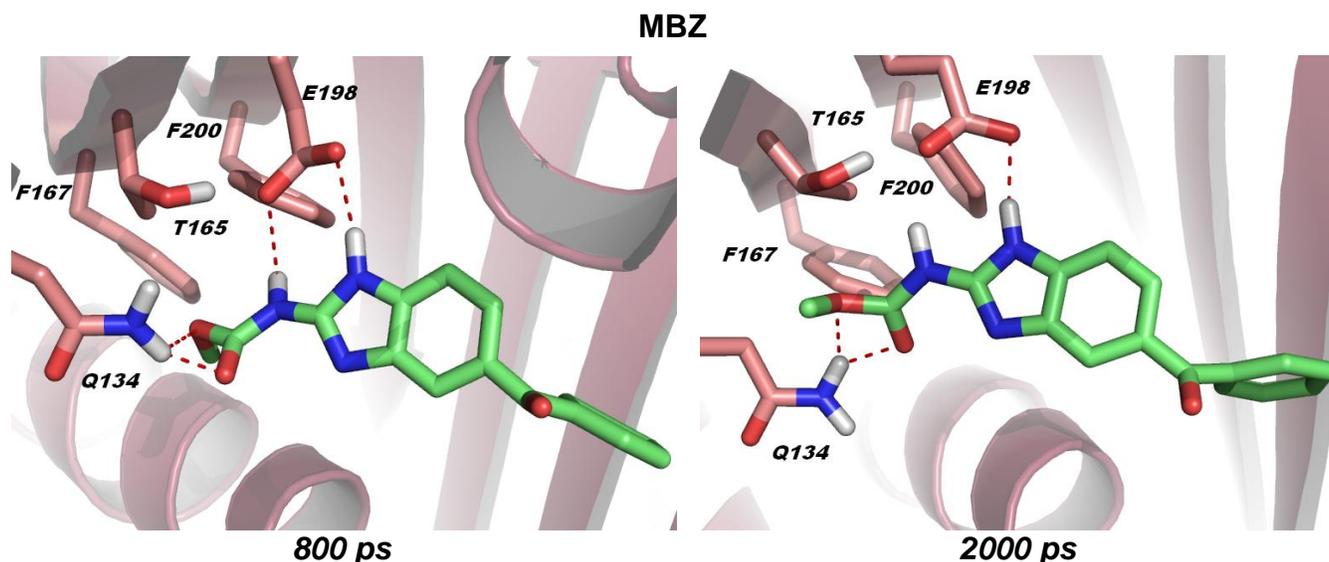


Figura 7.29. Representaciones de la estabilización del MBZ por parte la Gln134 a diferentes tiempos.

En la Tabla 7.17 se muestra el resultado del análisis energético y de interacción durante el estudio de dinámica molecular. Para el análisis energético se calcularon las energías de corto alcance de Lennard-Jones (E_{LJ}) y Coulomb (E_{Coul}) con base en las interacciones proteína-ligando, cuya suma nos permite conocer una aproximación de la energía de interacción del sistema (E_{int}). Esta energía no representa una energía de unión, sino una

estimación cualitativa de la estabilidad del complejo proteína-ligando. Adicionalmente, en esta tabla se reporta un intervalo del número de puentes de hidrógeno (NPH) generados a lo largo de la dinámica, así como el promedio de los mismos.

Tabla 7.17. Evaluación energética y de interacción en los diferentes complejos

Molécula	E_{int} (kcal/mol)			NPH	
	E_{Coul}	E_{LJ}	$E_{int} = [E_{Coul}] + [E_{LJ}]$	Intervalo	Promedio
CBZ	2.81	-32.83	-30.02	0 – 2	0
ABZ	-27.11	-35.90	-63.02	0 – 4	2
ABZSO (+)	-15.15	-34.02	-49.17	0 – 4	1
ABZSO (-)	-38.94	-37.09	-76.03	1 – 6	3
MBZ	-12.63	-41.62	-54.25	0 – 6	2
FBZ	-11.98	-43.02	-55.00	0 – 5	1
FBZSO (+)	-20.53	-40.38	-60.91	0 – 5	2
FBZSO (-)	-24.01	-39.69	-63.70	0 – 5	2
OBZ	-15.37	-35.92	-51.28	0 – 4	1
PBZ	-16.33	-34.29	-50.62	0 – 4	1
LBZ	-12.56	-48.46	-61.03	0 – 4	1
NZ	-8.31	-40.81	-49.12	0 – 4	1
FPA1	-4.16	-37.74	-41.90	0 – 3	1
FPA2	-5.17	-33.60	-38.77	0 – 1	0

Con base en los resultados anteriores, se procedió a realizar un análisis comparativo con los resultados obtenidos durante el estudio de acoplamiento, con el fin de validar la similitud en el comportamiento energético y de formación de puentes de hidrógeno para ambos estudios, sin olvidar que los valores energéticos a evaluar no presentan una similitud estricta, dado que en el cálculo de la energía de interacción en la dinámica no considera la interacción que se presenta por el efecto de solvatación. En la Tabla 7.18 se muestran los resultados de dicha comparación, enlistando las moléculas en orden ascendente de energía para el estudio de acoplamiento molecular (AM) y dinámica molecular (DM), así como el número de puentes de hidrógeno observados.

Tabla 7.18. Análisis energético y de interacción en ambos estudios

Molécula	AM			DM		
	No.	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	NPH	No.	E_{int} (kcal/mol)	NPH
LBZ	1	-9.41	5	4	-61.03	1
FBZSO (-)	2	-9.15	3	2	-63.70	2
MBZ	3	-9.08	4	7	-54.25	2
FBZSO (+)	4	-9.02	4	5	-60.91	2
NZ	5	-8.95	4	11	-49.12	1
FBZ	6	-8.76	4	6	-55.00	1
ABZSO (-)	7	-8.03	1	1	-76.03	3
PBZ	8	-7.93	3	9	-50.62	1
ABZSO (+)	9	-7.90	4	10	-49.17	1
ABZ	10	-7.70	4	3	-63.02	2
FPA2	11	-7.60	1	13	-38.77	0
FPA1	12	-7.48	1	12	-41.90	1
OBZ	13	-7.41	4	8	-51.28	1
CBZ	14	-7.05	3	14	-30.02	0

Con los resultados de la tabla anterior podemos confirmar que existe cierta correlación entre los resultados de la energía de unión y de interacción, como es el caso de los FPAs y el CBZ; sin embargo, también se confirma, para algunos acoplamientos, que a pesar de poseer una alta o baja energía de unión pueden presentarse variaciones en la afinidad de la misma durante un estudio dinámico. En general se considera una buena energía de interacción, como aproximación, a todos aquellos complejos proteína-ligando cuyos valores energéticos son menores a -50.0 kcal/mol, lo que a su vez confirma lo observado en las tendencias del análisis del RMSD.

El caso particular de los metabolitos de oxidación del ABZ y FBZ demostraron poseer mayor estabilidad en el sitio de unión en comparación con el fármaco original. No obstante, cabe recordar que dicha oxidación aumenta la probabilidad de ser oxidado a la sulfona correspondiente, más en el caso del enantiómero (-), aumentando la rapidez del proceso de eliminación y, por tanto, disminuyendo la residencia de éste en sitio en cuestión.

7.4.3. Evaluación de los modelos con ligandos

Con base en el análisis realizado a los complejos WT-ligando se decidió seleccionar como modelos de estudio a los complejos que presentaban los ligandos ABZ, FPA1, FPA2, LBZ, MBZ y NZ, con el fin de facilitar el análisis de los resultados de la dinámica molecular, así como demostrar las diferencias de estabilidad de los diferentes complejos y su correlación con los resultados del acoplamiento original. El cálculo del RMSD realizado a los complejos de los cuatro modelos se encuentra representado en los Gráficos 3 a 6; así mismo, se realizó el análisis energético y de interacción para cada uno de ellos, los cuales se encuentran reportados en la Tabla 7.19.

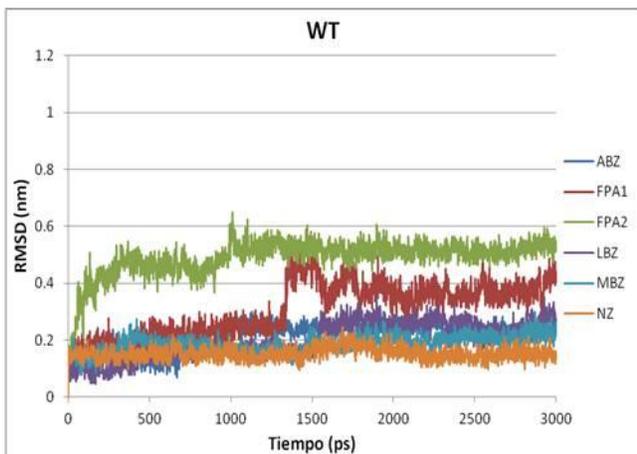


Gráfico 3

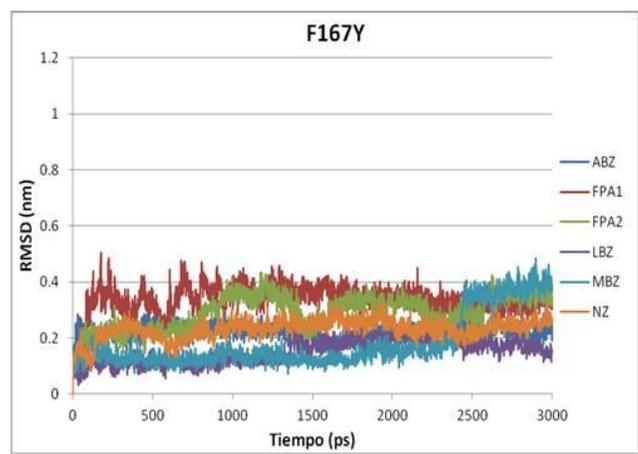


Gráfico 4

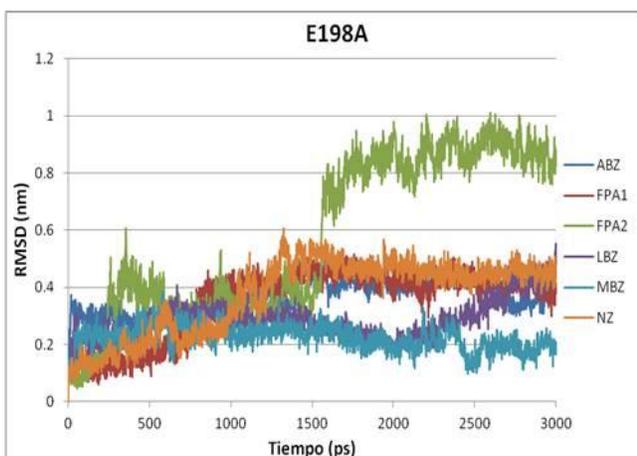


Gráfico 5

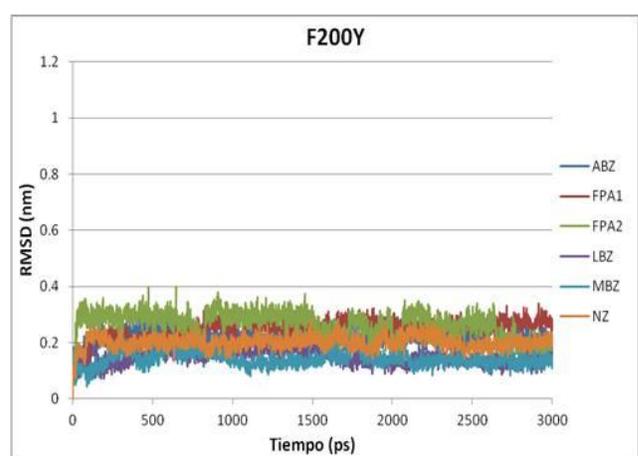


Gráfico 6

Gráficos 3-6. Representación del RMSD del comportamiento de los ligandos presentes en los complejos proteína-ligando en los modelos: (a) WT; (b) F167Y; (c) E198A y (d) F200Y.

Tabla 7.19. Análisis energético y de interacción durante la simulación de DM en los cuatro modelos

Molécula	Modelo	E_{int} (kcal/mol)	NPH	
		$E_{int} = [E_{Coul}] + [E_{LJ}]$	Intervalo	Promedio
ABZ	WT	-63.02	0 – 4	2
	F167Y	-51.25	0 – 4	1
	E198A	-43.65	0 – 2	1
	F200Y	-56.07	0 – 4	2
MBZ	WT	-54.25	0 – 6	2
	F167Y	-59.82	0 – 6	2
	E198A	-44.80	0 – 2	0
	F200Y	-51.99	0 – 5	2
LBZ	WT	-61.03	0 – 4	1
	F167Y	-60.59	0 – 4	1
	E198A	-53.04	0 – 4	1
	F200Y	-64.66	0 – 3	1
NZ	WT	-49.12	0 – 4	1
	F167Y	-50.98	0 – 5	2
	E198A	-43.74	0 – 1	0
	F200Y	-53.98	0 – 4	1
FPA1	WT	-41.90	0 – 3	1
	F167Y	-51.94	0 – 5	2
	E198A	-38.83	0 – 2	0
	F200Y	-49.44	0 – 3	1
FPA2	WT	-38.77	0 – 1	0
	F167Y	-48.00	0 – 4	1
	E198A	-34.43	0 – 3	0
	F200Y	-52.98	0 – 3	1

En los Gráficos 3 a 6 se observa que la inestabilidad dinámica se presenta principalmente en los complejos que poseen a los ligandos FPA1 y FPA2, siendo esta variación del RMSD menor en los modelos F167Y y F200Y. Sin embargo, esta estabilización se puede deber

principalmente a que la disminución del sitio de unión propicia la retención del ligando, lo que a su vez se ve estabilizado por la formación de puentes de hidrógeno. Este análisis sugiere que la adquisición de la resistencia por parte de estas mutaciones no se debe a la disminución de interacciones en el acoplamiento, sino que la resistencia podría estar involucrada directamente con el mecanismo de apertura y cierre del sitio, o por las modificaciones estéricas y electrónicas a las que se encuentra expuesto el ligando al introducirse al sitio modificado. Esto confirma el hecho de que la mutación F167Y es de baja significancia, puesto que los resultados son similares a los del modelo WT, y por lo que el mecanismo de resistencia se puede deber al impedimento de acoplamiento por la reducción de la superficie de interacción en el extremo distal del sitio, como se expuso anteriormente.

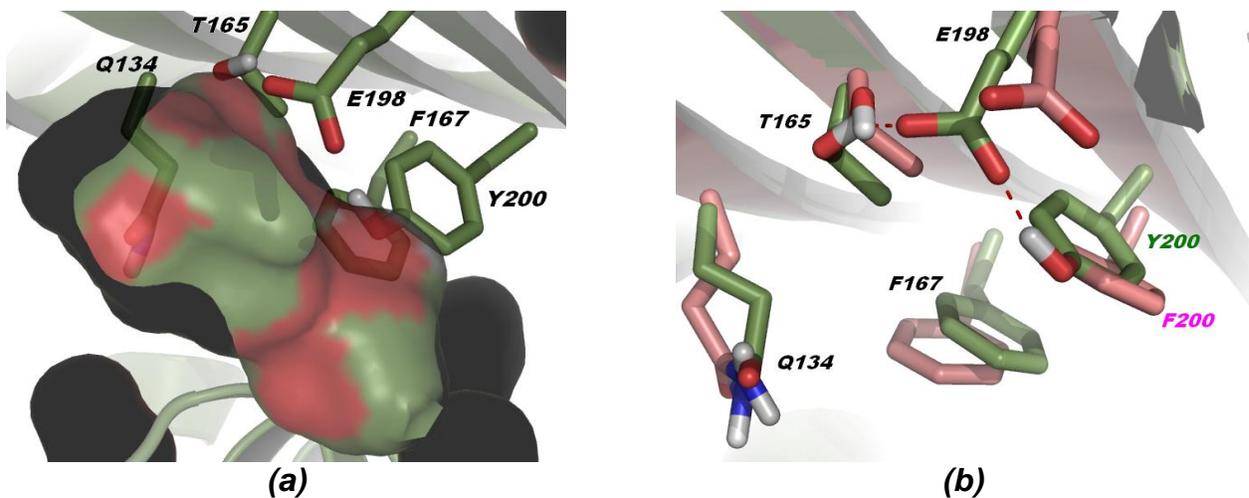


Figura 7.30. (a) Modificaciones electrónicas y dimensionales de la cavidad del modelo F200Y. (b) Superposición del modelo WT (rosa) con el modelo F200Y (verde).

En el modelo F200Y se observó que varias interacciones proteína-ligando están favorecidas, por lo que es posible concluir que el efecto de resistencia no se debe a la falta de afinidad del sitio sino a un mecanismo previo a su introducción. De esta forma se corrobora que la interacción del hidroxilo de la Tyr200 con el grupo carbonato del Glu198 podría ser el mecanismo por el cual se inhibe la introducción del ligando al sitio o que altera su acoplamiento en el mismo. Adicionalmente, se cree que dicha interacción disminuye la exposición del aminoácido Glu198 al sitio de unión, de tal forma que se aumenta la probabilidad de que el ligando interactúe de forma inicial con el hidroxilo de la tirosina por parte del grupo carbamato, como se muestra en la Figura 7.30a. Además, en la Figura 7.30b se demuestra, al superponer un cuadro de la dinámica con el modelo WT, que la generación de la interacción del Glu198 con la Tyr200 y la Thr165 propicia un distanciamiento de dicho

aminoácido del sitio original, reduciendo aún más la probabilidad de que esté presente la primera interacción con el ligando. El posible acoplamiento obtenido a partir de dicha interacción podría ser similar al presentado por la molécula G2N en la tubulina de bovino, lo que en este caso propiciaría la disminución de la superficie de interacción y, por tanto, el aumento en la energía de unión proteína-ligando a causa del acoplamiento desfavorable.

En el caso del modelo E198A, se observó que existe gran variación dinámica y alta energía de interacción, así como baja tasa de formación de puentes de hidrógeno. Estas observaciones corroboran el resultado inicial del acoplamiento molecular, en donde se comprueba la importancia y significancia de la incidencia de dicha mutación en varios organismos, según lo reportan Rufener y colaboradores.⁴⁶ Estudios realizados por estos autores, basados en la evaluación de la incidencia de cepas resistentes de *H. contortus*, han transmitido la importancia de la mutación en el aminoácido 198 al equipararla con la de la posición 200, por lo que este estudio permite identificar la causa de la disminución de la afinidad por dicha modificación. Además, cabe señalar que la mutación E198A no solo propicia un cambio electrónico, sino también espacial, por lo que las dimensiones superficiales del sitio se ven alteradas, tal como se muestra en la Figura 7.31.

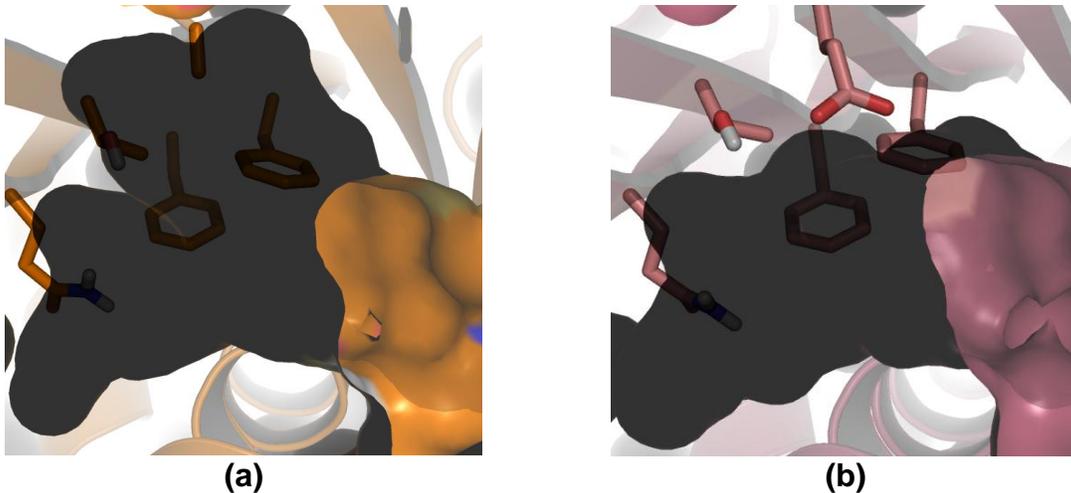
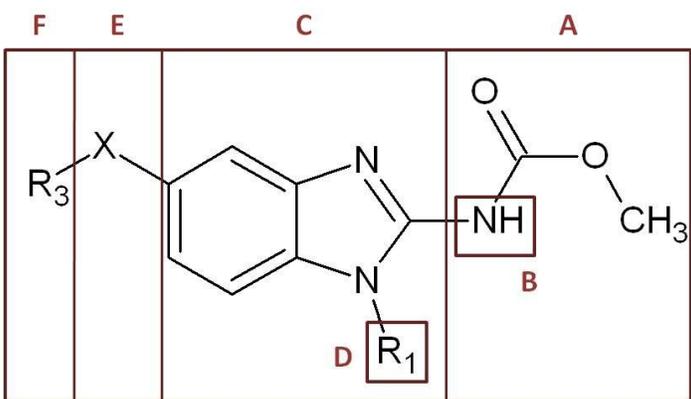


Figura 7.31. Representación del aumento espacial del sitio de unión de E198A (a) con respecto al WT (b).

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en los estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular realizados a los diferentes organismos y a los modelos con las mutaciones de resistencia, se propuso una serie de características estructurales fundamentales para la interacción de los carbamatos bencimidazólicos con el sitio propuesto, las cuales se enlistan en la Tabla 7.20 a manera de comparación con lo reportado por Sharma y colaboradores.³

Tabla 7.20. Requerimientos estructurales en carbamatos bencimidazólicos para poseer actividad antihelmíntica

	
Región	Comentarios
A	La presencia de este grupo permite que la molécula se establezca en el sitio, mediante la formación de puentes de hidrógeno con el aminoácido Gln134, y con el aminoácido en la posición 165 cuando éste tiene la capacidad de donar un hidrógeno para la interacción, siempre y cuando la cadena del residuo sea corta.
B	La alquilación de este grupo elimina la posibilidad de que interaccione con el aminoácido Glu198; sin embargo, su modificación no altera de forma significativa el acoplamiento.
C	El heterociclo de bencimidazol, al ser una estructura privilegiada, permite su fácil interacción, debido a su planaridad y a la resonancia que éste presenta.
D	Al modificar este grupo por un alquilo, se reduce de forma significativa el acoplamiento de la molécula, ya que evita la introducción de la misma al sitio, así como la interacción con el aminoácido Glu198.
E	La presencia de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno aumenta la probabilidad de que éste se establezca por interacción con la Cys239. En el caso de los carbonilos y los sulfóxidos, se aumenta la probabilidad de interacción debido a que el sustituyente aproxima al grupo carbamato al aminoácido 165. En el LBZ, el grupo sulfonato del sustituyente aumenta la posibilidad de interaccionar con ambos aminoácidos.
F	Los sustituyentes aromáticos presentan un mejor acoplamiento en comparación a aquellos cuyo sustituyente tiene mayor número de grados de libertad.

7.5. Propuestas para el diseño de fármacos

Los estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular permitieron identificar las posibles conformaciones adquiridas por los carbamatos bencimidazólicos en el modelo WT de la β -tubulina, así como los posibles mecanismos por los cuales los organismos adquieren resistencia a causa de las mutaciones F167Y, E198A y F200Y. Particularmente para los modelos con las mutaciones F167Y y F200Y se tienen los siguientes inconvenientes:

- La mutación F167Y, cuyo mecanismo propuesto involucra un ejercicio dinámico de la introducción del ligando al sitio unión, dificulta el diseño de una molécula con la capacidad de introducirse al sitio a causa del bloqueo. Por esta razón, el diseño de nuevos ligandos deberá basarse en los resultados de estudios *in situ* que corroboren el comportamiento estructural para facilitar la introducción al sitio modificado. Adicionalmente, se debe considerar que la baja incidencia y significancia de dicha mutación podrían tener poca relevancia para los organismos aquí estudiados, sin embargo, deberá realizarse el estudio pertinente para los nematodos de equinos.
- En los organismos que presentan la mutación F200Y existe un aumento en el grado de dificultad en cuanto al diseño del fármaco, debido a que dicha modificación aumenta la similitud secuencial con el sitio de unión de la β -tubulina de humanos. Por tanto, el diseño de un fármaco más afín al sitio con esta mutación también estaría promoviendo el aumento de la afinidad a la β -tubulina de mamíferos, por lo que tendría un efecto perjudicial en el hospedero. Adicionalmente, también se debería evaluar el posible comportamiento del ligando al introducirse al sitio, puesto que el mecanismo de resistencia podría estar involucrado a la interacción con la Tyr200, tal como se expuso anteriormente. Este mecanismo propuesto podría corroborarse con un estudio de actividad en el cual se utilicen análogos del MBZ, NZ o LBZ que posean un metilo en el carbamato, al igual que el compuesto FPA1. El uso de estos compuestos podría eliminar la posibilidad de la interacción inicial entre el grupo carbamato y la Tyr200, facilitando el ingreso de la estructura al sitio.

Debido a las dificultades antes mencionadas, en el presente trabajo no se diseñaron ligandos basados en los modelos F167Y y F200Y.

7.5.1. Propuestas para los modelos silvestres

Según las observaciones realizadas en los acoplamientos de los modelos de β -tubulina de *T. spiralis*, *G. intestinalis* y *E. multilocularis*, se puede establecer la importancia del grupo carbamato de metilo y del núcleo de bencimidazol sin sustitución en la posición 1 y con sustitución en la posición 5 ó 6. Con base en esto, se diseñaron modificaciones a la estructura original del bencimidazol con el fin de disminuir los grados de libertad generando un ciclo a partir del metilo del carbamato con el heterociclo, el cual se modificará a un anillo de indol para facilitar la ciclación, como se muestra en la Figura 7.32. Esta estrategia no sólo permitirá reducir el número de grados de libertad en la estructura, sino que también permitirá confirmar si esa es la conformación preferencial para acoplarse al sitio de unión, según se observó durante el estudio de acoplamiento molecular.

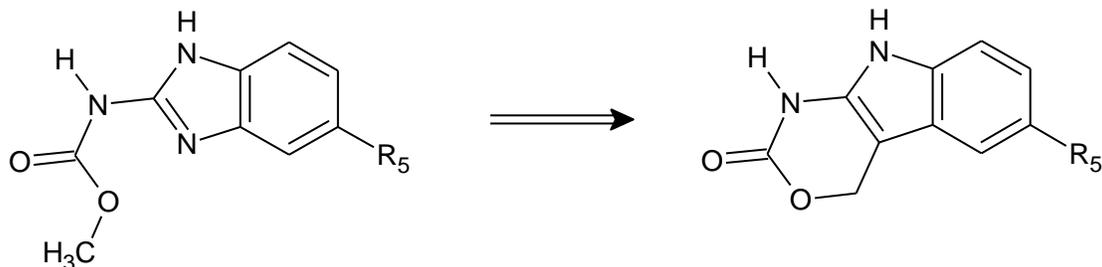


Figura 7.32. Propuesta de modificación a estructura de carbamatos bencimidazólicos.

7.5.2. Propuestas para el modelo con la mutación E198A

Dado el actual aumento en la incidencia y significancia de la mutación E198A, así como la baja similitud estructural que presenta en comparación con la β -tubulina de mamíferos, se seleccionó al modelo E198A como candidato ejemplar para el diseño de fármacos basado en el receptor. Para el diseño de estas estructuras se realizó una evaluación por *screening* virtual de una serie de bibliotecas obtenidas empleando la base de datos de EDULISS del servidor LIDAEUS. La biblioteca de moléculas del servidor se evaluó inicialmente en el modelo E198A para posteriormente hacer la comparación con el modelo WT, con el fin de identificar aquellas estructuras que posean buen acoplamiento en ambos modelos y que además no presenten potencial toxicológico en mamíferos.

7.5.2.1. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC)

La implementación del servidor LIDAEUS permitió generar un mapa farmacofórico para la evaluación de la biblioteca de moléculas de EDULISS. Los *puntos de sitio* generados a partir del cálculo de la distribución superficial del potencial electrostático se situaron a lo largo del sitio de unión propuesto en nuestro modelo, tal como se muestra en la Figura 7.32. En esta figura se observa la representación de los *puntos de sitio* en diferentes colores, en donde los puntos rojos representan a los oxígenos, los puntos azules a los nitrógenos y los puntos cian a los carbonos.⁸¹

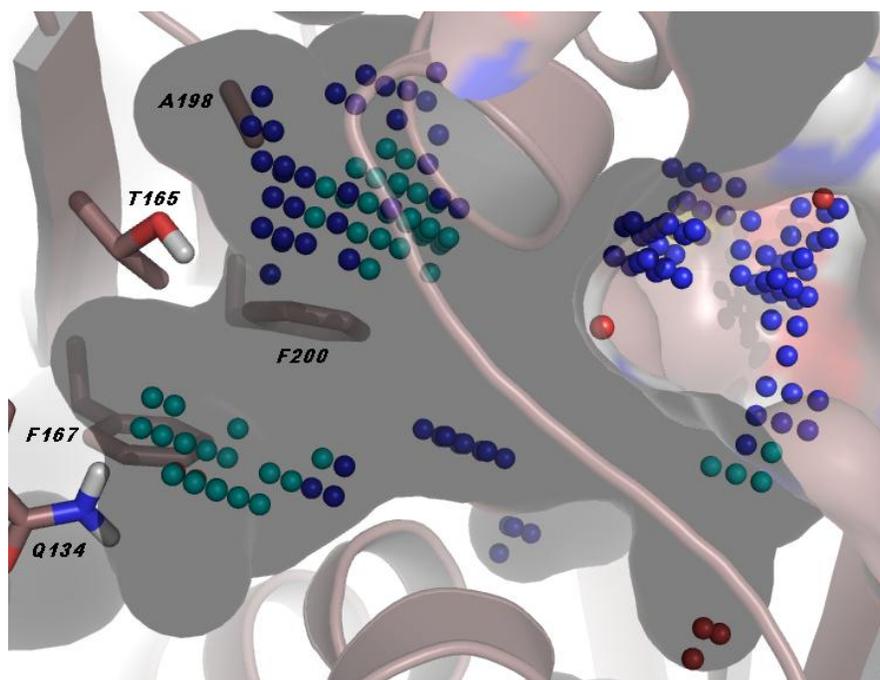
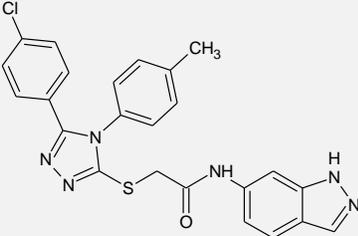
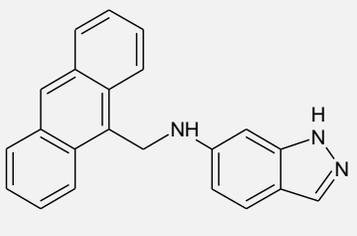
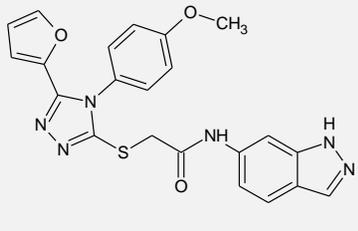
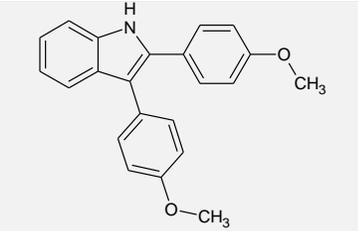
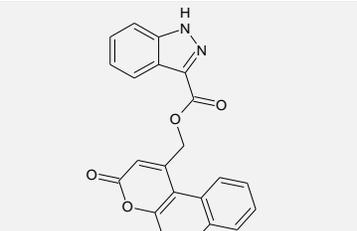
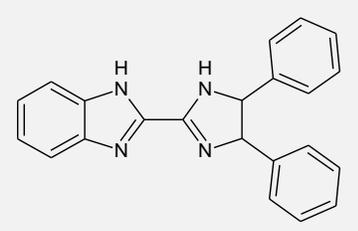
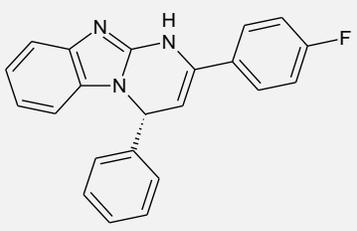
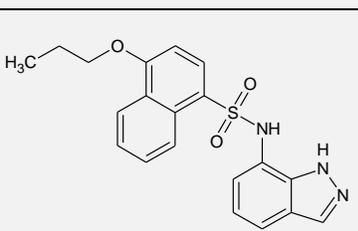
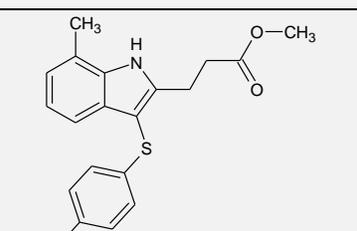


Figura 7.32. Representación de los puntos de sitio en el modelo E198A.

Basado en este mapa farmacofórico, el servidor LIDAEUS identificó 2,145 moléculas con posible actividad de la base de datos de *EDULISS 2 Unique*, de las cuales se seleccionaron a las primeras 50 que presentaron como estructuras base los núcleos de bencimidazol, benzotiazol, indazol o indol. Se buscaron y seleccionaron, de la base de datos ZINC, los análogos estructurales de las 50 moléculas encontradas previamente, las cuales se evaluaron con *AutoDock 4.0* para finalmente seleccionar las 20 estructuras con la menor energía de unión para el modelo de E198A, y con baja toxicidad según ZINC.

En la Tabla 7.21 se reportan las 20 estructuras que presentaron la menor energía de unión en el modelo E198A, comparándose a su vez con los resultados de energía obtenidos para los acoplamientos del modelo WT.

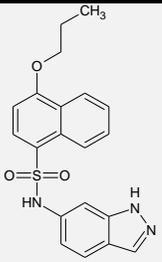
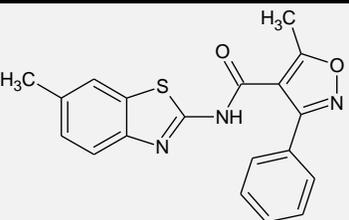
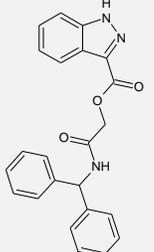
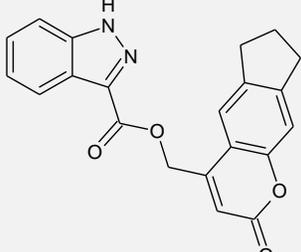
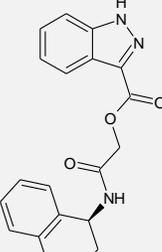
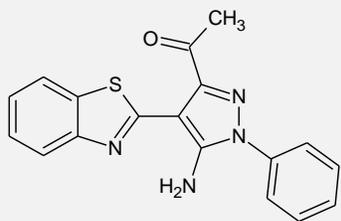
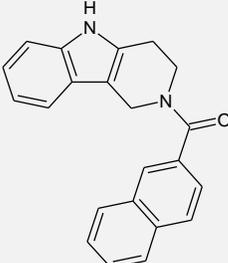
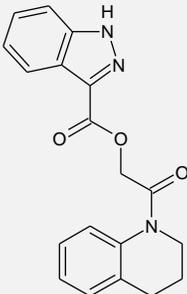
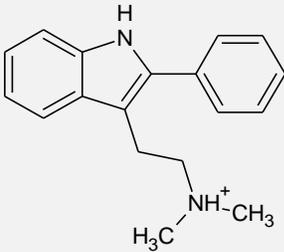
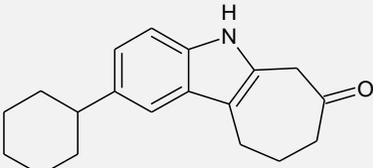
Tabla 7.21. Moléculas obtenidas por *screening* virtual como posibles inhibidores de la β -tubulina

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)		Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	
	E198A	WT		E198A	WT
 ZINC01088862 [26SPH1-665-327]	-10.81	-9.28	 ZINC00279500 [9SPH1-052-884]	-10.74	-9.01
 ZINC02451977	-10.73	-7.89	 ZINC04822977 [31SPH1-336-585]	-10.49	-8.07
 ZINC00001568 [35SPH1-000-390]	-10.21	-7.36	 ZINC04823350	-10.02	-9.43
 ZINC00035325 [26SPH1-325-728]	-9.95	-8.86	 ZINC00038166 [26SPH1-674-360]	-9.91	-7.87
 ZINC04593866	-9.82	-9.21	 ZINC00036653 [26SPH1-323-329]	-9.60	-8.66

Nota: Todas las estructuras se encuentran identificadas con la clave de ZINC, así como también se identifican con la de EDULISS a aquellas moléculas que fueron obtenidas a partir de la evaluación con LIDAEUS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Continuación de la Tabla 7.21

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)		Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	
	E198A	WT		E198A	WT
 ZINC04593860	-9.52	-7.96	 ZINC00081340 [29SPH1-027-576]	-9.50	-8.59
 ZINC04825050	-9.44	-7.96	 ZINC04823520	-9.42	-8.88
 ZINC04822798	-9.41	-8.52	 ZINC00038065 [26SPH1-674-171]	-9.39	-7.91
 ZINC00053074 [26SPH1-692-892]	-9.38	-9.71	 ZINC04824961	-9.28	-8.67
 ZINC00007578	-9.19	-7.85	 ZINC00059889 [26SPH1-371-147]	-9.14	-9.24

Nota: Todas las estructuras se encuentran identificadas con la clave de ZINC, así como también se identifican con la de EDULISS a aquellas moléculas que fueron obtenidas a partir de la evaluación con LIDAEUS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las energías resaltadas en la Tabla 7.21 pertenecen a aquellas moléculas que presentaron una energía de unión menor a -9.0 kcal/mol en ambos modelos, lo cual aumenta la posibilidad de que estos compuestos presenten mayor eficacia en el tratamiento de una helmintosis, sin afectar al hospedero.

En la Figura 7.33 se muestran las conformaciones más favorecidas de las diferentes moléculas en el sitio de unión propuesto para ambos modelos.

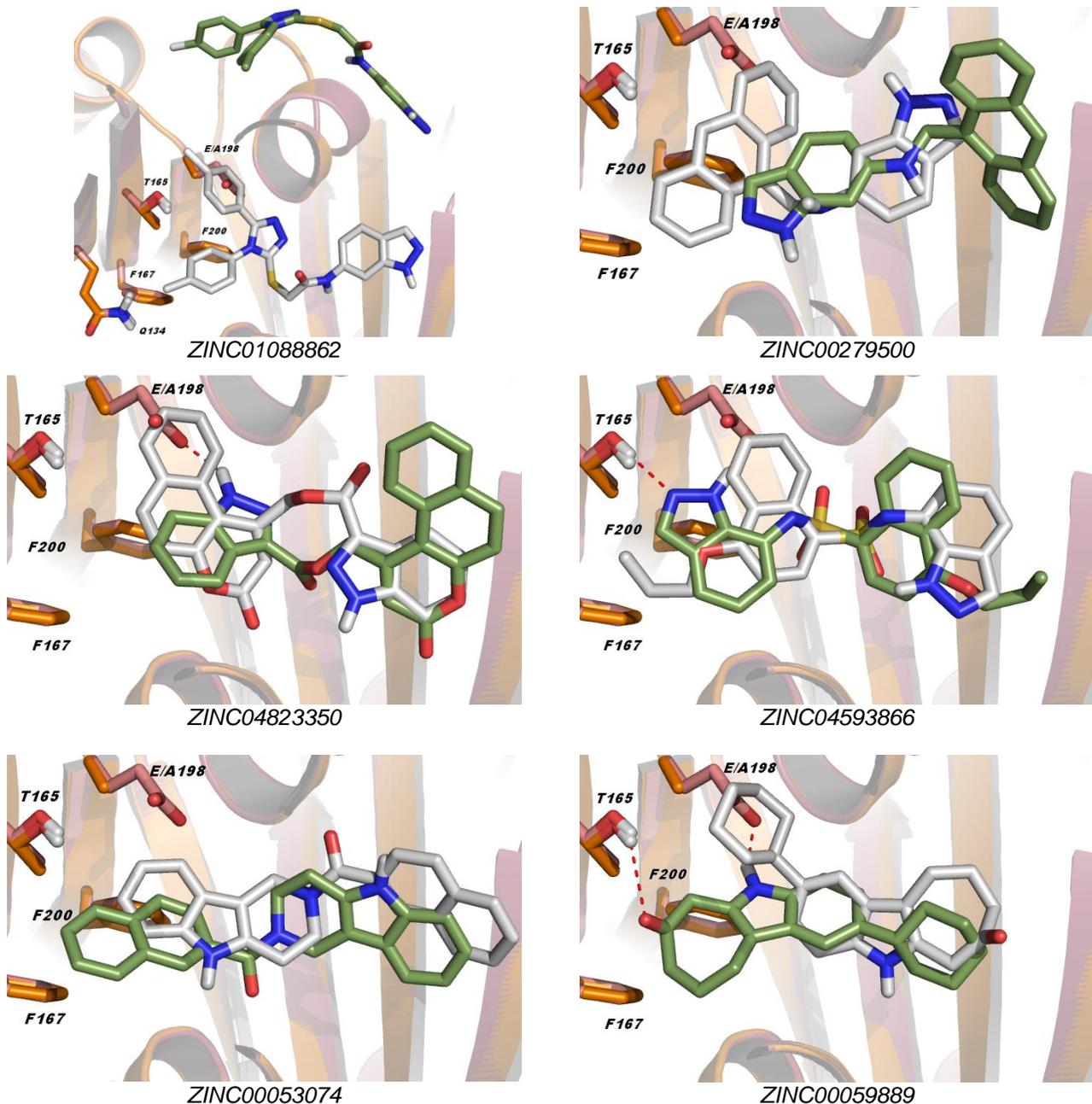


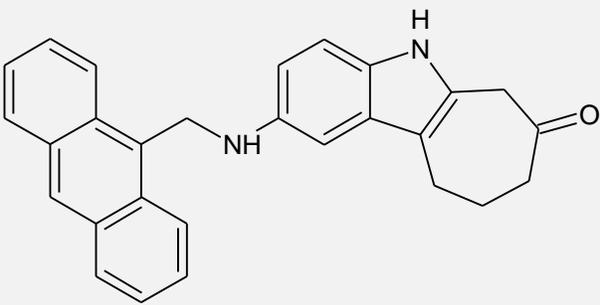
Figura 7.33. Representación del acoplamiento de los diferentes compuestos en los modelos E198A y WT. Las moléculas acopladas en E198A se representan en color gris y las de WT en color verde.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general se observa que los sitios de unión en ambos modelos tienen mayor preferencia por las moléculas que poseen un anillo de indazol o indol en su estructura; también, que las moléculas con un grupo aromático voluminoso (ej. naftilo, antracilo, etc.) fueron más afines al sitio del modelo E198A, dado que los sistemas aromáticos les permiten acoplarse en la hendidura formada por la presencia de la Ala198. En el modelo WT, el grupo aromático voluminoso se acopla por la parte externa del sitio, manteniendo en la parte interna de éste a los heterociclos, los cuales forman puentes de hidrógeno con la Glu198 y Thr165. En el caso particular de la molécula *ZINC01088862*, la cual presentó una de las menores energías de unión para ambos modelos, se observó que en el modelo WT la molécula se acopla en la parte externa, por lo cual no es una estructura selectiva al sitio propuesto y no podrá ser considerada para el diseño de nuevas moléculas.

Cabe a señalar que en el acoplamiento del compuesto *ZINC00059889* en el modelo WT se observó gran similitud entre las conformaciones de este compuesto y la adquirida por los carbamatos bencimidazólicos. De esta manera se confirma la hipótesis propuesta para el diseño de estructuras en organismos susceptibles (sección 7.5.1), demostrando que el intercambio del bencimidazol por un indol, así como la reducción de los grado de libertad en la posición 2 y la conservación de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno en esta posición, favorece la estabilización del compuesto en el sitio. Así mismo, la adición de un grupo voluminoso en la posición 5 del indol permitirá anclar a la molécula en el sitio de unión en ambos modelos, como sucede con el compuesto *ZINC00279500*. Con base en los fragmentos de las estructuras anteriores, se construyó una molécula como posible compuesto *hit computacional (Hit-1)*, del cual su resultado de acoplamiento molecular se reporta en la Tabla 7.22.

Tabla 7.22. Estructura y resultados del acoplamiento en la β -tubulina del compuesto *Hit-1*

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	
	E198A	WT
 <i>Hit-1</i>	-10.84	-9.72

En la Figura 7.34 se muestra el acoplamiento de la molécula *Hit-1* en el sitio propuesto de los modelos E198A y WT, lo cual nos permitió corroborar las características conformacionales preferenciales anteriormente descritas para cada uno de los modelos. En el caso del acoplamiento en el modelo WT se observa que el anillo de indol se posicionó en la parte interna del sitio, interaccionado mediante puentes de hidrógeno con los aminoácidos Glu198 y Gln134, situando el anillo de antraceno en la parte externa de éste. En el caso del modelo E198A, el antraceno se fijó en la parte interna del sitio, manteniendo al heterociclo interaccionado con la parte externa.

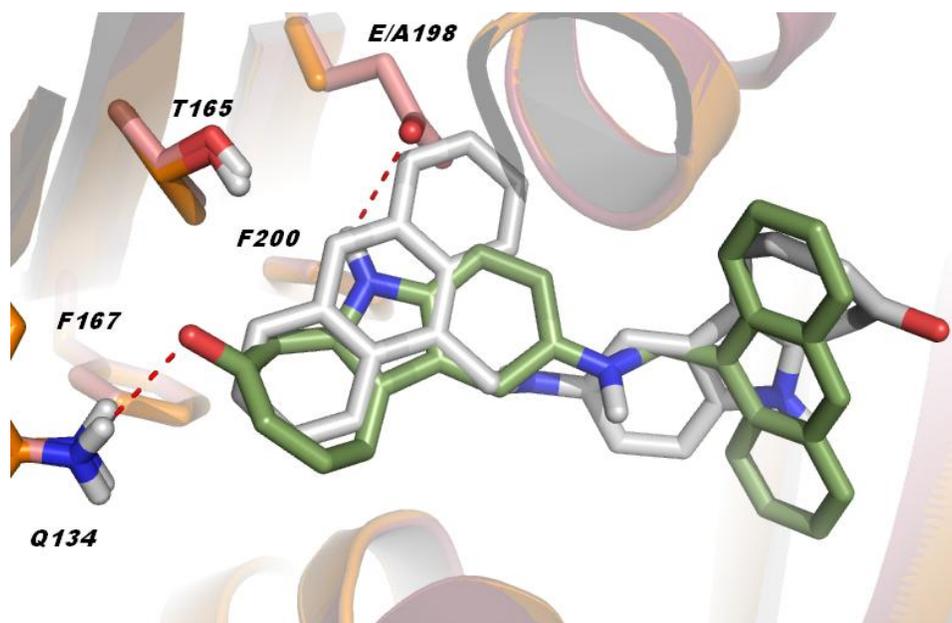
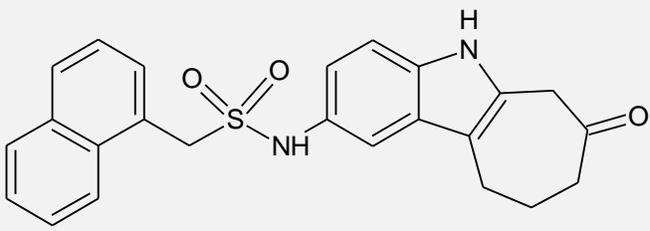


Figura 7.34. Representación del acoplamiento del compuesto *Hit-1* en los modelos E198A (gris) y WT (verde).

La construcción de este modelo permitió visualizar las propiedades conformacionales y estructurales necesarias para que un ligando se pueda unir a los modelos WT y E198A. La modificación de bencimidazol a indol no solo permitirá comprobar la conformación de la estructura en el sitio, sino también permitirá aumentar la solubilidad de los compuestos, dado que se sabe que este tipo de heterociclos presentan una mayor biodisponibilidad; sin embargo, en el compuesto *Hit-1*, el sustituyente de antraceno podría alterar dicha propiedad, por lo que decidimos proponer un análogo de este compuesto en el que se retiene el volumen del sustituyente, adicionando un grupo aceptor de puentes de hidrógeno que pudiese interaccionar con la Cys239, y empleando el mismo heterociclo indólico. Con base en lo anterior, se construyó una molécula como posible compuesto *líder* (*Lead-1*), del cual su resultado de acoplamiento molecular se reporta en la Tabla 7.23.

Tabla 7.23. Estructura y resultados del acoplamiento en la β -tubulina del compuesto *Lead-1*

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	
	E198A	WT
 Lead-1	-10.39	-11.05

Con base en el resultado anterior, pudimos observar un ligero aumento en la energía de unión del compuesto *Lead-1* en el modelo E198A, comparado con la del *Hit-1*, dado que el grupo voluminoso que se asignó (naftilo) es menor al antracilo original, lo que a su vez genera una disminución en la superficie de contacto con el sitio de unión de dicho modelo (Figura 7.34a). En el caso del modelo WT (Figura 7.34b), esta molécula obtuvo una energía de unión mucho menor que la del compuesto *Hit-1*, lo que nos indica que el aumento en el número de átomos que conforman la cadena del sustituyente permitió que la molécula presentara una interacción más estable con los aminoácidos E198 y T165; sin embargo, no se observó interacción de la sulfonamida con el aminoácido Cys239, como se esperaba; dada la similitud estructural de esta molécula con el LBZ.

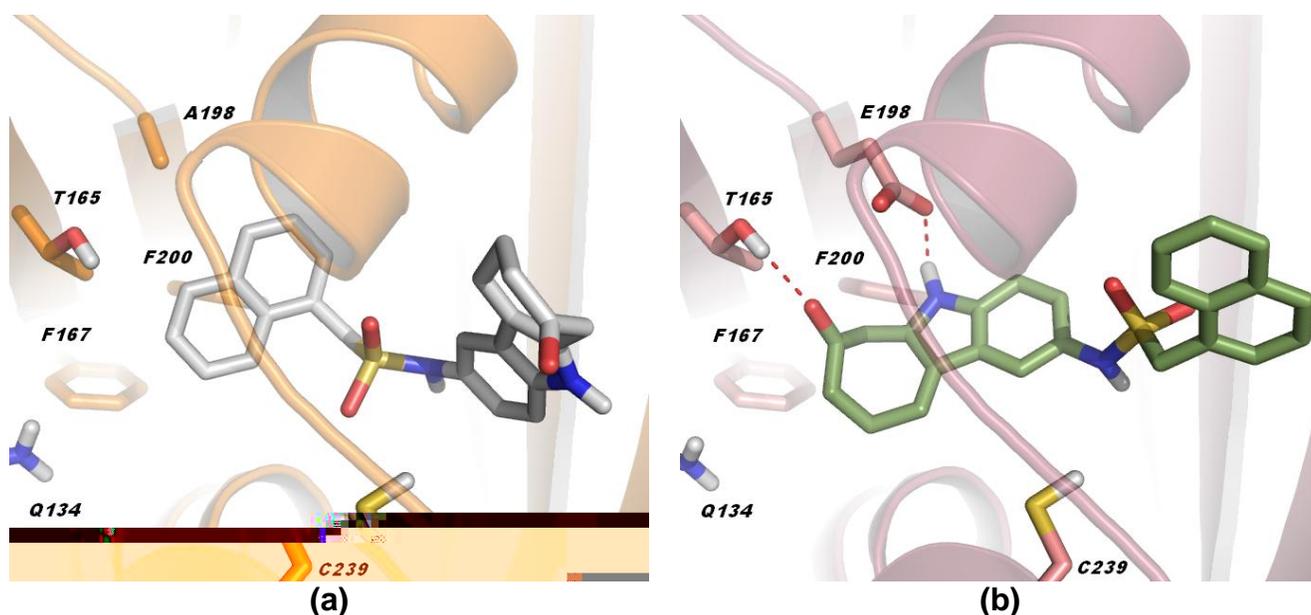


Figura 7.34. Representación del acoplamiento del compuesto *Lead-1* en los modelos E198A (a) y WT (b).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad predecir de forma teórica las propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) de las moléculas *Hit-1* y *Lead-1*, se empleó el módulo *FAF-Drugs 2.0* del servidor *Mobyle-RPBS*, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7.24.

Tabla 7.24. Propiedades estructurales de los compuestos *Hit-1* y *Lead-1*

Compuesto	PM (Da)	logP	tPSA (Å)	ERot	ERig	DPH	APH	Sol. (mg/L)	Status
<i>Hit-1</i>	404.49	6.30	44.89	3	33	2	3	650.58	Aceptado
<i>Lead-1</i>	418.51	3.83	87.41	4	30	2	5	3,263.05	Aceptado

Abreviaturas: peso molecular (PM); superficie polar del espacio topológico (tPSA); enlaces rotables (ERot); enlaces rígidos (ERig); grupos donadores de puentes de hidrógeno (DPH); grupos aceptores de puentes de hidrógeno (APH); solubilidad (Sol.).

En la Figura 7.35 se representan de manera gráfica los resultados de los cálculos de los parámetros moleculares, delimitando con un área de color verde a los valores de aceptación establecidos por las reglas de Lipinski, Veber y Egan.

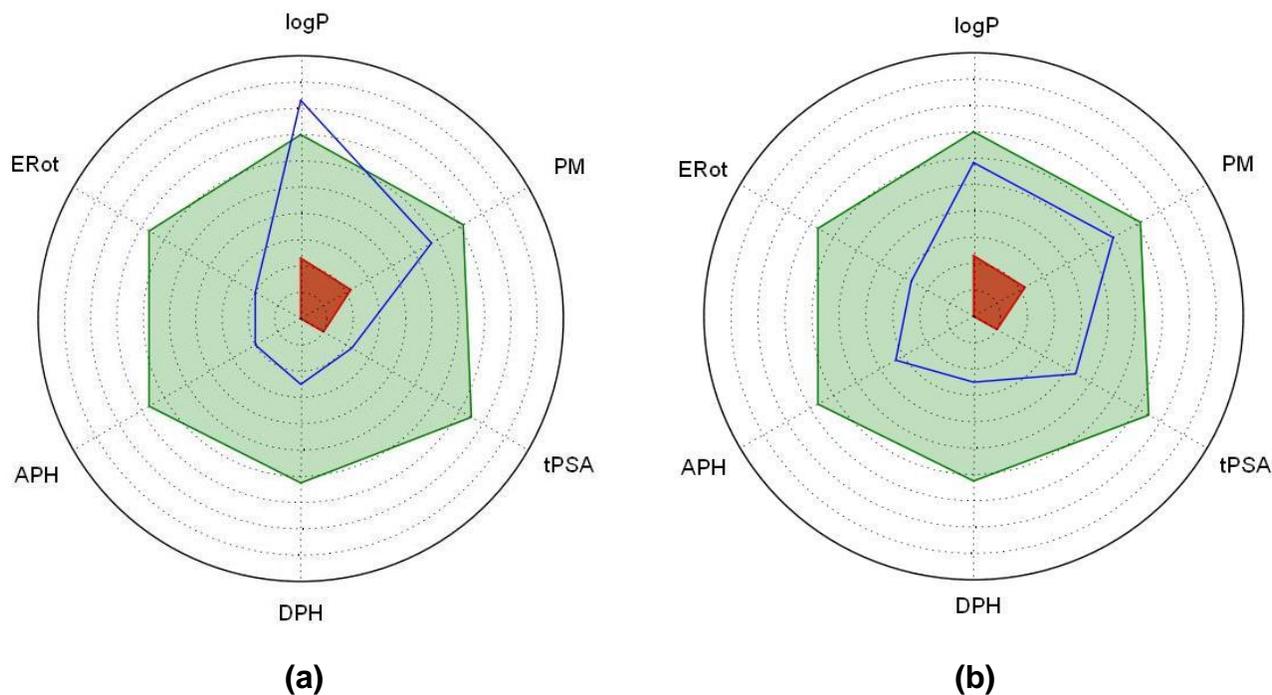


Figura 7.35. Gráficos de evaluación de parámetros moleculares de los compuestos *Hit-1* (a) y *Lead-1*(b). La línea azul representa los valores del compuesto, y la superficie interna de color verde (máximo) y roja (mínimo) a los valores de aceptación establecidos por las reglas de Lipinski, Veber y Egan.

Estos resultados nos permiten confirmar que el compuesto *Hit-1* es menos soluble que el compuesto *Lead-1*, quien presenta un menor valor de logP. Esta diferencia de solubilidad se debe principalmente a la adición del grupo sulfonamida y naftilo en la estructura, sustituyendo al antracilo original. Además, es importante señalar que durante el diseño del compuesto *Lead-1* se descartó la posibilidad de adicionar un nitrógeno entre el carbonilo y el indol, para formar la amida que asemejaría a la estructura del carbamato, dado que esta modificación propiciaría la planaridad del sistema, reduciendo la posibilidad de que estos grupos formasen puentes de hidrógeno con los aminoácidos correspondientes.

Para establecer el estado de aceptación del compuesto *Lead-1*, el servidor evaluó las propiedades moleculares con una serie de reglas asociadas a la biodisponibilidad de los compuestos en un sistema biológico, las cuales fueron:

- **Regla de los 5 de Lipinski:** el compuesto cumple los cuatro puntos al presentar un logP menor a 5, un peso molecular menor a 500 Da, un número menor de 5 donadores y menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno.⁸²
- **Regla de Veber:** el compuesto cumple todos los parámetros establecidos por esta regla al poseer un número menor de 10 enlaces rotables, así como un tPSA menor a 140 Å, y un total de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno menor a 12.⁸³
- **Regla de Egan:** al igual que en las reglas anteriores, en esta se cumplen todos los puntos establecidos al presentar un valor de logP menor a 6 y al poseer una superficie polar del espacio topológico entre 0 y 132 Å, por lo cual se determina el cumplimiento de la regla.⁸⁴

Con base en lo anterior podemos decir que el compuesto *Lead-1* presenta propiedades aceptables para ser evaluado como posible fármaco antihelmíntico, según el modelo generado en el presente trabajo.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió generar un modelo en el cual se establece un posible sitio de unión de los bencimidazoles 2-carbamatos de metilo a la β -tubulina de helmintos y protozoarios. Esta propuesta concuerda con diferentes reportes experimentales encontrados en la investigación bibliográfica.

A partir de la elaboración del árbol filogenético se comprobó la existencia de una conservación aminoacídica entre los organismos de una misma familia. De la misma manera, el alineamiento de secuencias permitió corroborar el alto porcentaje de identidad secuencial que presentan los helmintos en comparación con las secuencias de mamíferos, a diferencia de los protozoarios. Adicionalmente, este estudio permitió identificar a los aminoácidos 167, 198 y 200 como las principales diferencias secuenciales involucradas en la generación de resistencia en helmintos a los carbamatos bencimidazólicos.

Con la técnica de modelado por homología se construyeron modelos proteicos de β -tubulinas, con altos porcentajes de identidad, a partir de *plantilla* 3N2G_D para *T. spiralis* (95.0%), *G. intestinalis* (88.0%), *E. histolytica* (56.0%), *E. multilocularis* BT1 (92.0%), y *F. hepatica* BT2 (97%). Además, el servidor I-TASSER facilitó la identificación del posible sitio de unión al basar nuestra búsqueda en los principales aminoácidos de resistencia. El análisis estructural realizado a los diferentes modelos permitió validar su construcción, así también permitió confirmar que los aminoácidos presentes en el sitio de unión cumplen con los parámetros de validación.

En el sitio de unión propuesto se lograron identificar a los aminoácidos 167, 198 y 200, así como a los aminoácidos 50, 134, 165 y 257, los cuales están implicados en mutaciones de resistencia a carbamatos bencimidazólicos en algunos hongos. El ligando G2N, co-cristalizado en la *plantilla* 3N2G_D, nos permitió suponer la conformación estructural del grupo carbamato en el sitio, así como el mecanismo por el cual este induce su apertura e inhibe la polimerización de los microtúbulos. Adicionalmente, se identificó que el sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina está próximo al de la colchicina, lo que podría explicar el posible mecanismo de inhibición competitiva reportado en la literatura.

A partir de los modelos generados *in silico* se realizó un estudio de acoplamiento molecular en el sitio unión propuesto. En este estudio se encontró que los carbamatos bencimidazólicos poseen acoplamientos más favorables, al mostrar energías de unión menores y con mayor similitud conformacional, en los modelos de los organismos de *G. intestinalis*, *T. spiralis* y *E. multilocularis*. Estos resultados confirman las suposiciones realizadas durante el alineamiento, lo que a su vez se correlaciona con la susceptibilidad de dichos organismos. Este estudio confirmó que el aminoácido Glu198 es determinante para la estabilización vía puentes de hidrógeno del ligando en el sitio. Para los aminoácidos en las posiciones 165 y 239 se encontró que pueden intervenir en la estabilización del ligando dentro del sitio si presentan un residuo donador de puentes de hidrógeno, sin embargo dicha interacción no es indispensable, por lo que podría estar relacionada principalmente a las diferencias de afinidad presentes en los organismos susceptibles.

Los estudios de acoplamiento molecular realizado a los modelos con las mutaciones permitieron confirmar la pérdida de afinidad por el sitio a causa de la mutación E198A; sin embargo, en el caso de las mutaciones F167Y y F200Y no fue posible identificar diferencias energéticas, por lo que el mecanismo de resistencia se atribuye principalmente a la reducción en la cavidad.

El estudio de dinámica molecular permitió evaluar el comportamiento de los modelos y de complejos proteína-ligando al ser expuestos a un ambiente simulado de las condiciones reales. Se logró visualizar la aparición de interacciones intramoleculares en el sitio de unión por parte de los modelos con las mutaciones F167Y y F200Y debido a la presencia del residuo de tirosina; demostrando con ello, la causa de la disminución de la superficie de interacción del sitio de unión, lo que posteriormente permitió comprobar que dicha interacción también interviene en la estabilización del ligando al sitio.

Para el complejo proteína-ligando del modelo WT de *T. spiralis* se encontró que las moléculas FPA1 y FPA2 presentan baja estabilidad en el sitio debido a la metilación que presentan en su estructura, siendo menos favorable la interacción de FPA2 al tener dicho metilo en la posición 1 del bencimidazol. Así mismo, la baja estabilidad del CBZ permitió confirmar la importancia de presentar un sustituyente en posición 5 ó 6 del bencimidazol.

Este estudio permitió establecer la importancia del papel que juega el aminoácido Gln134 en la internalización y estabilización de los ligandos en el sitio. Es por esto que la interacción de

la Tyr167 con la Gln134, en el modelo F167Y, puede ser perjudicial, ya que no permite que el residuo de glutamina se aproxime al ligando durante el acoplamiento, o que en cuyo caso ésta no pueda atrapar al ligando para internalizarlo. Para el caso del modelo F200Y se establece que el posible mecanismo de resistencia se debe a que la interacción de la Tyr200 con la Glu198 reduce la superficie de interacción del sitio de unión, lo que a su vez propicia que el ligando interaccione en primera instancia con el hidroxilo de la tirosina, haciendo menos favorable su acoplamiento en el sitio.

Los resultados de acoplamiento molecular y dinámica molecular permitieron plantear un panorama para el diseño de nuevos fármacos basados en el receptor utilizando el modelo de *T. spiralis* con la mutación E198A.

La técnica de *screening* virtual se empleó para el diseño de una molécula con la característica de interactuar con el monómero de β -tubulina silvestre (WT) y con el que posee la mutación E198A. Se determinaron las características estructurales de dicha molécula para tales interacciones como son: poseer un núcleo heterocíclico capaz de donar un puente de hidrógeno (ej. indol), debe tener un grupo aceptor de hidrógenos en la posición 2, y un grupo voluminoso como sustituyente en la posición 5 del núcleo de indol que permita estabilizar la molécula en el sitio. Con base en esto se logró identificar al compuesto *Lead-1* como posible candidato para la evaluación biológica y comprobación de los resultados de acoplamiento molecular.

9. PERSPECTIVAS

- Confirmar la propuesta del sitio de unión mediante la generación de una proteína recombinante del heterodímero de α/β -tubulina de parásito, en el cual se pueda establecer un estudio de inhibición competitiva con la colchicina y/o una posible resolución cristalográfica.
- Determinar el efecto de las mutaciones F167Y, E198A y F200Y mediante la implementación de ensayos de mutagénesis dirigida, comparando los resultados con los mecanismos propuestos en el presente trabajo.
- Sintetizar y evaluar al compuesto *Lead-1* para determinar su posible actividad como despolimerizador de microtúbulos, de tal manera que si resulta activo puedan generarse nuevos análogos estructurales.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Márquez-Lara, D. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista Corpoica*, 4(1): 55-70.
2. Mottier, L. & Lanusse, C. (2001). Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82(2): 74-85.
3. Sharma, S. (1994). Design new drugs for helminth diseases: Lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research*, 25: 101-161.
4. Borgers, M.; *et al.* (1975). Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. *American Journal Veterinary Research*, 36(8): 1153-1166.
5. Fenell, B.J.; *et al.* (2008). Microtubules as antiparasitic drug targets. *Expert Opinion Drug Discovery*, 3(5): 501-518.
6. Katiyar, S.K.; *et al.* (1994). Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9): 2086-2090.
7. Navarrete-Vázquez, G.; *et al.* (2006). Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 4615-4622.
8. Melchor, S. (2011). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Síntesis de derivados de carbendazim y nicotinamida como compuestos de acción antiparasitaria. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
9. Palomares-Alonso, F.; *et al.* (2009). Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 1794-1800.
10. Lanusse, C.E. & Prichard; R.K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 49(2-4): 123-158.
11. Álvarez, L.; *et al.* (1999). *In vivo* and *ex vivo* uptake of albendazole and its sulphoxide metabolites by cestode parasites: relationship with their kinetics behavior in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22: 77-86.
12. Álvarez, L.; *et al.* (2000). Uptake of albendazole and albendazole sulphoxide by *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 94: 75-89.
13. Capece, B.P.S. (2001). Tesis Doctoral. Caracterización farmacológica del albendazol sulfóxido y de sus enantiómeros en ovejas y ratas. Análisis del metabolismo ruminal.

- Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología, Universidad Autónoma de Barcelona.
14. Capece, B.P.S.; *et al.* (2009). Enantiomeric behavior of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: Pharmacological implications. *The Veterinary Journal*, 181: 241-250.
 15. García-Rodríguez, J.J.; *et al.* (2012). Enantimerical pharmacokinetic prevalence of (+) albendazole sulphoxide in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Parasitology Research*, 110: 993-999.
 16. Bolás-Fernández, F.; *et al.* (2004). *Ex vivo* anthelmintic activity of albendazole-sulphoxide enantiomers. *Journal of Parasitology*, 90(2):407-409.
 17. MacDonald, L.M.; *et al.* (2004). Characterization of benzimidazoles binding with recombinant tubulina from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 138: 89-96.
 18. Lacey, E.; *et al.* (1987). Comparison of inhibition of polymerization of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazoles carbamates. *Veterinary Parasitology*, 23: 105-119.
 19. Lubega, G.W. & Prichard, R.K. (1990). Specific interaction of benzimidazoles anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazoles resistance in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 38: 221-232.
 20. MacDonald, L.M. (2003). Thesis of Doctor of Philosophy. Characterization of the benzimidazole-binding site on the cytoskeletal protein tubulin. Murdoch University, Perth, Western Australia.
 21. Henriquez, F.L.; *et al.* (2008). Molecular basis for resistance of *Acanthamoeba* tubulins to all major classes of antitubulin compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3): 1133-1135.
 22. Robinson, M.W.; *et al.* (2004). A possible model of benzimidazoles binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23: 275-284.
 23. Chambers, E.; *et al.* (2010). Liver fluke β -tubulin isotype 2 binds albendazole and is thus a probable target of this drug. *Parasitology Research*, 107: 1257-1264.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

24. Sharma, O.P.; *et al.* (2011). Modeling, docking, simulation, and inhibitory activity of the benzimidazoles analogue against β -tubulin protein from *Brugia malayi* for treating lymphatic filariasis. *Medicinal Chemistry Research*, 21: 2415-2427.
25. Downing, K.H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16: 89-111.
26. Akhmanova, A. & Steinmeetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 309-322.
27. Nogales, E. (2000). Structure insights into microtubule function. *Annual Review of Biochemistry*, 69: 277-302.
28. Aylett, C.H.S.; *et al.* (2011). New insights into the mechanism of cytomotive actin and tubulin filaments. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 292: 12-17.
29. Nawrotek, A.; *et al.* (2011). The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. *Journal of Molecular Biology*, 412: 35-42.
30. Dorléans, A.; *et al.* (2009). Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33): 13775-13779.
31. Barbier, P.; *et al.* (2010). Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(41): 31672-31681.
32. Russell, G.J. & Lacey, E. (1992). Differential stability of the benzimidazole (BZ)-tubulin complex in BZ-resistant and BZ-susceptible isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology*, 22(3): 399-402.
33. Jiménez-González, A.; *et al.* (1991). Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Veterinary Parasitology*, 39: 89-99.
34. Lacleste, J.P.; *et al.* (1980). Inhibition of tubulin polymerization by mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92: 417-423.
35. Russell, G.J.; *et al.* (1995). Binding of [3 H]benzimidazole carbamates to mammalian brain tubulin and the mechanism of selective toxicity of the benzimidazole anthelmintics. *Biochemical Pharmacology*, 43: 1095-1100.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

36. Tahir, S.K.; *et al.* (2000). Rapid colchicine competition-binding scintillation proximity assay using biotin-labeled tubulin. *BioTechniques*, 29: 156-160.
37. Friedman, P.A. & Platzer, E.G. (1978). Interaction of anthelmintic benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 544 (3): 605-614.
38. Nguyen, T.L.; *et al.* (2005). A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(19): 6107-6116.
39. Massarotti, A.; *et al.* (2011). Identification of novel antitubulin agents by using a virtual screening approach based on a 7-point pharmacophore model of the tubulin Colchicine site. *Chemistry Biology and Drug Design*, 78: 913-922.
40. Yenjerla, M.; *et al.* (2008). Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2): 390-398.
41. Winder, B.S.; *et al.* (2001). The role of GTP binding and microtubule-associated proteins in the inhibition of microtubule assembly by carbendazim. *Toxicological Sciences*, 59: 138-146.
42. Wolstenholme, A.J.; *et al.* (2004). Drug resistance in veterinary helminthes. *TRENDS in Parasitology*, 20(10): 469-476.
43. Silvestre, A. & Cabaret, J. (2002). Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin of *Trichostrongylid* nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120: 297-300.
44. Ghisi, M.; *et al.* (2007). Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 144: 313-320.
45. Rufener, L.; *et al.* (2009). *In vitro* selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 168: 120-122.
46. Kotze, A.C.; *et al.* (2012). Relative level of thiabendazole resistance associated with the E198A and F200Y SNP in larvae of a multi-drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*; 2: 92-97.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

47. Diawara, A.; *et al.* (2009). Assays to detect β -tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. Drug-Resistance SNPs in Soil-Transmitted Helminths, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(3): e397(1-7).
48. Wang, J.; *et al.* (2011). Deep small RNA sequencing from the nematode *Ascaris* reveals conservation, functional diversification, and novel developmental profiles. *Genome Research*, 21: 1462-1477.
49. Kwa, M.S.G.; *et al.* (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63: 299-303.
50. Shayan, P.; *et al.* (2007). Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology Research*, 100: 1063-1068.
51. Silvestre, A.; *et al.* (2009). Contrasting genetic structures of two parasitic nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology*, 18(24): 5086-5100.
52. Palcy, C.; *et al.* (2008). Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: Long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *Veterinary Journal*, 183: 68-74.
53. Roos, M.H.; *et al.* (1995). New genetic and practical implications of selection anthelmintic resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Today*, 11: 148-150.
54. Schwab, A.; *et al.* (2005). Detection of benzimidazole resistance-associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(2): 234-238.
55. Upcroft, J.; *et al.* (1996). Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 200 in β -tubulin. *Microbial Drug Resistance*, 2: 303-308.
56. Frazen, C. & Salzberger, B. (2008). Analysis of the β -tubulin gene from *Vittaforma corneae* suggests benzimidazole resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2): 790-793.
57. Olson, P.D.; *et al.* (2012). Cestode genomics-progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunology*, 34: 130-150.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

58. Bennett, A.B.; *et al.* (2002). Sequence variation in the *Trichuris trichiura* β -tubulin locus: implications for the development of benzimidazole resistance. *International Journal for Parasitology*, 32: 1519-1528.
59. Samson-Himmelstjerna, G.; *et al.* (2009). Molecular detection of benzimidazole resistance in *Hemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. *Parasitology*, 136: 349-358.
60. Geer, L. Y.; *et al.* (2010). The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Research*, 38: D492-D496.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consulta: marzo de 2012]
61. Magrane, M. & the UniProt consortium (2011). UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database*, bar009 (1-13).
<http://www.uniprot.org/> [Consulta: marzo de 2012]
62. Néron, B.; *et al.* (2009). Mobylye: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics*, 25(22): 3005-3011.
<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome> [Consulta: abril de 2012]
63. Bernsetin, F.C.; *et al.* (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures", *Journal of Molecular Biology*, 112: 535.
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> [Consulta: abril - julio de 2012]
64. Roy, A.; *et al.* (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4): 725-738
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> [Consulta: abril - julio de 2012]
65. Fiser, A.; *et al.* (2000). Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*, 9:1753-1773.
[Modeller 9v10, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA]
66. Laskowski, R.A.; *et al.* (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26: 283-291.
http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment1
[Consulta: mayo de 2012]
67. Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics*, 8(1):52-56.
<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html> [Consulta: mayo de 2012]
68. Van Der Spoel, D.; *et al.* (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16): 1701-1718.

- [GROMACS v4.5.3, University of Groningen, Groningen, Nehterlands]
69. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA, 2007. <http://www.pymol.org>.
[PyMOL v0.99, DeLano Schientific LLC, South San Francisco, California, USA]
70. Pettersen, E.F.; *et al.* (2004). UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13): 1605-1612.
[UCSF Chimera v1.6.1, University of California, CA, USA]
71. Sanner, M.F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17: 57-61.
[AutoDock Tools v1.5.4, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA]
72. Deppmeir, B.J.; *et al.* (2002). Spartan'02, version 115a. Wavefunction, Inc.; Irvine, CA.
73. Sanner, M.F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17: 57-61.
[AutoDock v4.2, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA]
74. Schuttelkopf, A.W.; *et al.* (2004). PRODRG – a tool for highthroughput crystallography of protein–ligand complexes. *Acta Crystallographica*, 60: 1355-1360.
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/> [Consulta: julio de 2012]
75. Hsin, K; *et al.* (2010). EDULISS: a small-molecule database with data-mining and pharmacophore searching capabilities. *Nucleic Acids Research*; doi: 10.1093/nar/gkq878.
<http://eduliss.bch.ed.ac.uk/test/> [Consulta: agosto de 2012]
76. Taylor, P.; *et al.* (2008). Ligand discovery and virtual screening using the program LIDAEUS. *British Journal of Pharmacology*, 153: S55-S67.
<http://opus.bch.ed.ac.uk/lidaeus/> [Consulta: agosto de 2012]
77. Irwin, J.J. & Shoichet, B.K. (2005). ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J. of Chem. Inf. Mod.*, 45(1): 177-182.
<http://zinc.docking.org/> [Consulta: agosto de 2012]
78. Sanner, M.F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17: 57-61.
[AutoDock v4.0, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA]
79. Lagorce, D.; *et al.* (2008). FAF-Drugs2: Free ADME/tox filtering tool to assist drug discovery and chemical biology projects. *BMC Bioinformatics*, 9: 396.
<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/FAFDrugs/> [Consulta: agosto de 2012]

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

80. Chen, J.; *et al.* (2011). Synthesis and antiproliferative activity of novel 2-aryl-4-benzoyl-imidazole derivatives targeting tubulin polymerization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19: 4782-4795.
81. Taylor, P.; *et al.* (2008). Ligand discovery and virtual screening using the program LIDAEUS. *British Journal of Pharmacology*, 153: S55-S67.
82. Lipinski, C.A. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (1-3): 3-26.
83. Veber, D.F.; *et al.* (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12): 2615-2623.
84. Egan, W.J.; *et al.* (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21): 3867-3877.
85. Pérez Villanueva, J. (2007). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Síntesis y actividad antihelmíntica de derivados *N*-metilados del albendazol. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
86. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Databases and tools. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/tools/index.html> [Consulta: abril de 2012]
87. Baxevanis, A.D. (2001). Bioinformatics and the internet. John Wiley & Sons, *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*, Second Edition, pp. 1, 19, 20.
88. Zhang, Y. (2008). Progress and challenges in protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(3): 409-427.
89. Bradley, P.; *et al.* (2005). Toward high-resolution de novo structure prediction for small proteins. *Science*, 309:1868-1871.
90. Raman, S.; *et al.* (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*, 77(9): 89-99.
91. Krieger, E.; *et al.* (2003). Homology Modeling. *Structural Bioinformatics*, Chapter 25.
92. Wallner, B. & Elofsson, A. (2005). All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs. *Protein Science*, 14: 1315-1327.
93. Roy, A.; *et al.* (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4): 725-738.
94. Crooks, G.E. & Brenner, S.E. (2005). An alternative model of amino acid replacement. *Bioinformatics*, 21(7): 975-980.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

95. Carugo, O. & Pongor, S. (2001). A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science*, 10(7): 1470-1473.
96. Shen, M. & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, 15: 2507-2524.
97. Benkert, P.; *et al.* (2009). QMEAN Server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, 37: 510-514.
98. Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2008). Lehninger. Principios de Bioquímica. 4ª Edición, Ediciones Omega, España, Barcelona, pp. 123-125.
99. Kichen, D.B.; *et al.* (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 935-949.
100. Pouplana, R.; *et al.* (2009). Química computacional en diseño de fármacos. *Lifescienceslab*, pp. 28-31.
101. Pérez-Acle, T.; *et al.* Computational Biology Lab (DLab). DLab is a transdisciplinary environment for pure and applied research in Computational Biology.
<http://dlab.cl/molecular-design/> [Consulta: abril de 2012]
102. Morris, G. M.; *et al.* (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14): 1639-1662.
103. Trejo-Soto, P. (2011). Tesis de Licenciatura. Síntesis de tres carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por *docking* como inhibidores potenciales de la Tirosafosfato Isomerasa (TIM) de *Entamoeba histolytica*. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
104. Adcock, S.A. & McCammon, J.A. (2006). Molecular Dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews*, 106(5): 1589-1615.
105. Karplus, M. & McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9): 646-652.
106. Medina-Franco, J.L. (2005). Tesis de Doctorado en Ciencias. Diseño de fármacos asistido por computadora. Inhibidores de la transcriptasa reversa del virus del VIH, hipocolesterolemiantes y antiparasitarios. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
107. Talevi, A. (2007). Tesis Doctoral. Screening virtual basado en topología molecular: una nueva metodología en el descubrimiento de agentes anticonvulsivos. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

108. Young, D.C. (2009). Computational drug design. A guide for computational and medicinal chemists. *John Wiley & Sons, Inc.*, pág. 67.
109. Arnold, K.; *et al.* (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22: 195-201.
http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1
[Consulta: abril de 2012]
110. Bates, P.A.; *et al.* (2001). Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Structure, Function and Genetics, Suppl 5*: 39-46.
http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/html/form_v2.0_maestro.html
[Consulta: abril de 2012]
111. Tosatto, S.C.E. (2005). The Victor/FRST Function for Model Quality Estimation. *Journal of Computational Biology*, 12(10): 1316-1327.
[Homology Modeling with HOMERv1.5]
<http://protein.cribi.unipd.it/Homer/> [Consulta: abril de 2012]
112. Chen, C.C.; *et al.* (2009). (PS)²-v2: template-based protein structure prediction server. *BMC Bioinformatics*, 10:366.
<http://ps2v2.life.nctu.edu.tw/index.php> [Consulta: abril de 2012]
113. Canutescu, A.A.; *et al.* (2003). A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Science*, 12 (9): 2001-2014.
<http://ffas.burnham.org/protmod-cgi/qryByAliForm.pl> [Consulta: abril de 2012]
114. Xiang, J.Z. (2002). JACKAL: A Protein Structure Modeling Package. Columbia University and Howard Hughes Medicinal Institute.
<http://ffas.burnham.org/protmod-cgi/qryByAliForm.pl> [Consulta: abril de 2012]
115. Lambert, C.; *et al.* (2002). ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 18(9): 1250-1256.
<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>
[Consulta: abril de 2012]
116. Combet, C.; *et al.* (2002). Geno3D an automated protein modelling Web server, *Bioinformatics*, 18: 213-214.
geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html
[Consulta: abril de 2012]

APÉNDICE 1. Fundamentos teóricos

Este apartado fue elaborado a partir de investigación bibliográfica con el fin de incluir únicamente los aspectos relevantes del tema que permitan explicar de forma breve y concisa algunos de los fundamentos computacionales empleados en el presente trabajo. En este apartado se abordan los temas relacionados a la búsqueda bioinformática, técnicas y principios para el modelado de macromoléculas, acoplamiento molecular, dinámica molecular y diseño de fármacos asistido por computadora.

A1.1. Bioinformática

La creciente necesidad de almacenar, organizar, distribuir y recuperar la información de los avances de investigaciones en biología molecular y biotecnología, ha propiciado una fusión multidisciplinaria en la cual convergen la biología y la computación, cuya finalidad es la de facilitar la contextualización de nuevas propuestas de investigación asociada a la biología, así como el de crear perspectivas de las cuales se puedan discernir nuevos principios unificadores.⁸⁶ Para facilitar la búsqueda, selección y análisis de las bases de datos bioinformáticas, el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) y otras instituciones biotecnológicas han creado una serie de herramientas especializadas que otorgan soluciones matemáticas para la selección de resultados según la categoría a la que pertenecen (Tabla A1.1).

Tabla A1.1. Herramientas bioinformáticas⁸⁶

Categoría	Herramienta	Función
Bases de Datos	GenBank	Registro de todas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas
	UniProt	Catálogo de información y almacenamiento de secuencias aminoacídicas confirmadas
	Protein Data Bank (PDB)	Archivo de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos resueltas experimentalmente

Continuación de la Tabla A1.1

Categoría	Herramienta	Función
Búsqueda	Entrez	Acceso a secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, así como identificación de estructuras proteicas tridimensionales
	BLAST	Alineamiento de secuencias para estudios comparativos y de búsqueda
	Taxonomy Browser	Generación de relaciones taxonómicas
	Cn3D	Identificación de estructuras tridimensionales con base en alineamientos de secuencias
Análisis	ClustalW	Comparación de secuencias de amino ácidos y ácidos nucleicos
	Tcoffee	
	Phylip	Construcción de árboles filogenéticos basados en alineamientos de secuencias
	PhyML	

A1.1.1. Alineamiento de Secuencias

Una de las herramientas más utilizadas en bioinformática es el alineamiento de secuencias, la cual describe la relación existente entre secuencias nucleotídicas o aminoacídicas de dos o más especies con base en la conservación evolutiva, similitud estructural y funcional, o como resultado de un evento azaroso. Actualmente se utilizan algoritmos para la búsqueda de relaciones secuenciales (ej. BLAST), los cuales nos permiten obtener ciertos marcadores de ocurrencia de acuerdo a la probabilidad de similitud.⁸⁷ Existen varios parámetros para validar la similitud secuencial de una alineación, algunos de los cuales se describen a continuación⁸⁶:

- Brechas (*gaps*): son elementos que delimitan un segmento de alineamiento debido a la ausencia o terminación de complementos secuenciales.
- Porcentaje de cobertura (*query coverage*): valor que indica el grado de similitud entre las secuencias en función de su longitud.
- Valor E: la probabilidad de que un alineamiento sea resultado de un evento azaroso.
- Porcentaje de Identidad (ID): valor que indica el grado de similitud de las secuencias en función de su composición nucleotídica o aminoacídica.

A1.2. Técnicas de predicción de estructuras macromoleculares

Cuando no se tiene la estructura tridimensional de una proteína debido a la falta de elucidación estructural experimental, generalmente se emplean herramientas bioinformáticas que permiten la predicción de un modelo plausible a partir de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos. Actualmente existen varias estrategias para la predicción de modelos, como son el Modelado *de novo* y el Modelado comparativo.⁸⁸

A1.2.1. Modelado *de novo*

Cuando no se tiene registro de alguna estructura tridimensional que pueda ser utilizada como *plantilla* (*template*), o la identidad de similitud entre la *plantilla* y la secuencia es baja (ID < 40%), entonces se utiliza como alternativa el modelado *de novo*. Esta técnica modela el plegamiento de aminoácidos a partir de la implementación de métodos estadísticos que predicen conformaciones estructurales basadas en composiciones aminoacídicas, por lo que se limita a resolver estructuras proteicas pequeñas. La resolución estructural se puede lograr mediante la implementación de supercomputadoras o por distribución de trabajo, como en el caso del servidor *Rosetta*, el cual pone a disposición del público el programa *Fold-It* con el cual miles de usuarios logran construir modelos basados en las restricciones estructurales conocidas.^{89,90}

A1.2.2. Modelado comparativo

La elucidación de la estructura tridimensional de una secuencia aminoacídica se puede obtener a partir de un estudio comparativo con estructuras resueltas experimentalmente, las cuales se utilizan como *plantilla* para plegar la secuencia en cuestión. Esta metodología es de gran relevancia puesto que recientemente se han registrado un gran número de estructuras macromoleculares, lo que permite, en la mayoría de los casos, utilizar modelos con gran similitud estructural y funcional, dando una mayor validez al modelo final.⁸⁸ Algunas de las técnicas más empleadas son los modelados por homología, por enhebrado de proteínas y por reemplazo de residuos, los cuales se describen a continuación.

A1.2.2.1. Modelado por Homología

Esta técnica se basa en la suposición razonable de que dos proteínas homólogas compartirán estructuras muy similares puesto que un plegado proteico está evolutivamente

más conservado que su secuencia. Una alta similitud secuencial permite asegurar la existencia de una relación evolutiva entre dos organismos, por lo que secuencias prácticamente similares generalmente se plegaran de forma idéntica. La técnica garantiza la confiabilidad del modelo al fundamentar su búsqueda en la similitud de cobertura y en el porcentaje de identidad (ID). Actualmente existen varios servidores (ej. Swiss-Model) y programas (ej. Modeller) que permiten generar modelos por homología a partir del seguimiento de una serie de pasos ordenados, los cuales se describen y esquematizan en la Figura A1.1.^{91,92}

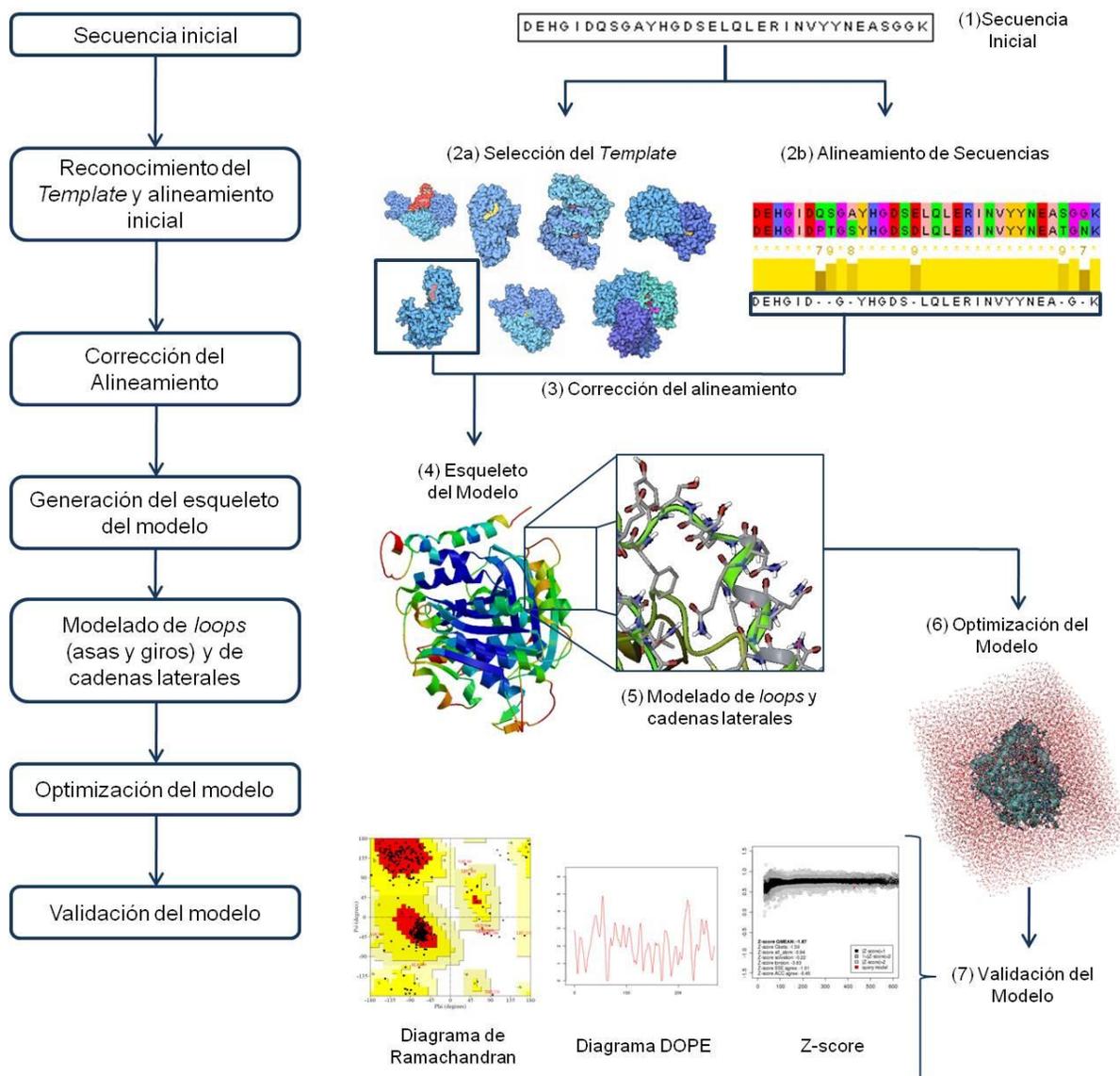


Figura A1.1. Procedimiento para el modelado por homología.

La identificación de la *plantilla* y el alineamiento inicial de secuencias se obtienen a partir de calcular una serie de matrices de alineamiento que le permiten al servidor (ej. BLAST)

identificar las diferencias y similitudes con estructuras almacenadas (ej. PDB). Posteriormente, las pequeñas diferencias clasificadas como *brechas* en el alineamiento inicial son reevaluadas, y se les asigna un distintivo de similitud durante la corrección del alineamiento. El esqueleto del modelo permite obtener un primer plano de visualización de la estructura final, lo que permite asignar rotaciones y orientaciones permitidas a los *loops* y a los residuos de cadenas laterales. Una vez que se tiene la estructura final, se procede a la optimización energética de la misma, lo cual consiste en realizar un proceso iterativo de predicciones en las rotaciones de cadenas laterales hasta alcanzar un mínimo energético estructural. Finalmente, se realiza una validación del modelo obtenido mediante el empleo de gráficos y parámetros generados a partir de programas especializados que analizan la estructura de forma comparativa con el modelo y/u otros modelos, así como también evalúan las características de conformación de los aminoácidos.⁹¹

A1.2.2.2. Modelado por enhebrado de proteínas

A diferencia del modelado por homología, en esta técnica primero se contrasta la secuencia de aminoácidos de estructura desconocida contra una base de datos de estructuras resueltas, sin importar la homología que existe entre éstas. La probabilidad de plegamiento de la secuencia está evaluada en función de los marcadores de compatibilidad obtenidos durante el ensamblaje los fragmentos estructurales pertenecientes a la *plantilla*, los cuales son evaluados y clasificados posteriormente para generar los posibles modelos. I-TASSER es el servidor predilecto para la generación de este tipo de modelos, debido a que utiliza varios programas para la obtención de las estructuras finales.⁹³

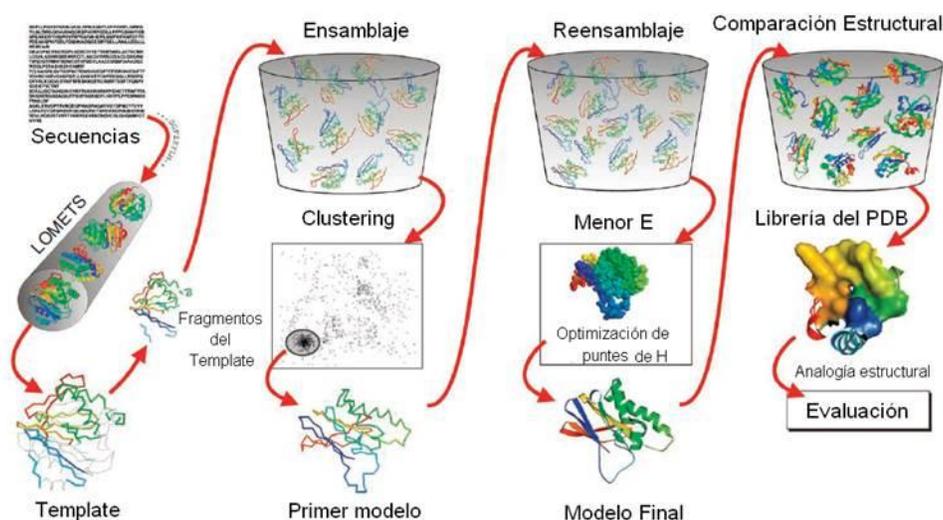


Figura A1.2. Metodología del modelado por enhebrado de proteínas.⁹³

A1.2.2.3. Modelado por reemplazo de residuos

Las correlaciones observadas entre pares de secuencias de proteínas homólogas normalmente permiten asumir que existe una alta similitud en la distribución estructural tridimensional (ID > 90%), por lo que en esta técnica el modelo se construye a partir de la sustitución en la *plantilla* de los aminoácidos que difieren entre ambas secuencias. Para esta técnica se pueden emplear programas que permitan realizar mutaciones puntuales, por ejemplo, *UCSF Chimera v1.6.1*, *PyMOL*, *VMD*, entre otros.⁹⁴

A1.2.3. Validación de modelos proteicos

Todo modelo posee una cierta cantidad de errores, los cuales se pueden deber al porcentaje de identidad entre la *plantilla* y la secuencia inicial; a la resolución de la *plantilla* o por la asignación poco favorecida de las cadenas laterales y *loops*.⁹¹ Para esto se han desarrollado varios elementos que permiten evaluar y validar la estructura tridimensional final, algunos de los cuales se describen a continuación:

- Desviación cuadrática media o RMSD (*Root Mean Square Deviation*): es el valor resultante de la superposición de la estructura de la cadena principal del modelo final con la *plantilla*, para indicar similitudes estructurales dimensionales con base en sus coordenadas atómicas. Un valor menor de 2.0 Å se considera aceptable, y entre menor sea el valor de la desviación, mayor será la similitud estructural.⁹⁵
- Puntuación DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*): es un parámetro que evalúa la energía de interacción de los aminoácidos estructurales. Entre menor sea este valor, menor será el nivel de energía de la estructura y por tanto será un modelo más estable. El gráfico DOPE permite realizar un análisis comparativo con la *plantilla*.⁹⁶
- Esquema de errores por residuo: es una representación esquemática de la estructura tridimensional del modelo generado, en el cual se muestran las regiones de la estructura, mediante un gradiente de colores, de acuerdo a las variaciones que está presente. El gradiente de color va del azul al rojo, en donde las regiones coloreadas de azul representan las zonas de mayor confianza (RMSD < 1.0 Å), mientras que las zonas rojas representan las regiones de menor confianza (RMSD > 3.5 Å).⁹⁷

- Puntuación Z (Z-score): es una medida de la significancia estadística del modelo como resultado de una alineación múltiple con otras estructuras conocidas. Este valor permite evaluar la calidad del modelo basado en el tipo de interacciones C β , distorsiones angulares, interacciones atómicas, potencial de solvatación y al grado de conformidad con base en comparaciones secuenciales, estructura secundaria y accesibilidad de solvatación (SSE & ACC). La evaluación de los parámetros anteriores da como resultado una cifra que representa la calidad del modelo, la cual puede ser negativa (baja calidad) o positiva (alta calidad), cuyo valor absoluto se espera sea cercano a cero (Figura A1.3).⁹⁷
- Puntuación QMEAN (QMEANscore): es el valor del grado de confiabilidad del modelo al ser comparado con otras estructuras, e involucra los parámetros anteriores para su designación. Los rangos de calidad estimada que maneja este parámetro van del 0 al 1, en donde los mejores modelos presentan un valor más cercano a 1 (Figura A1.3).⁹⁷

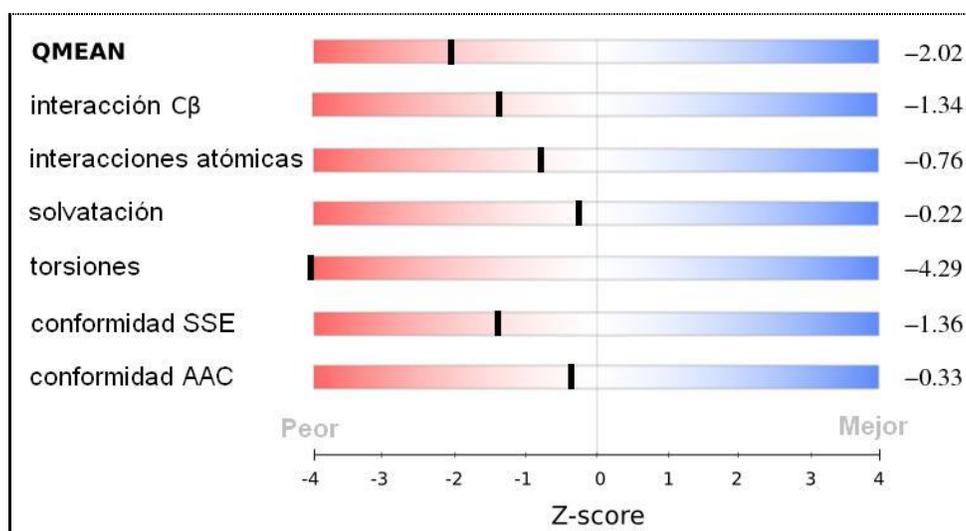


Figura A1.3. Representación esquemática de los parámetros de validación Z-score y QMEANscore.⁹⁷

- Diagrama de Ramachandran: gráfico que representa las combinaciones angulares ψ (psi) y ϕ (phi) de todos los aminoácidos que constituyen a una proteína (Figura A1.4a). Permite visualizar el comportamiento conformacional de los aminoácidos al representarlos dentro de un esquema de cuatro cuadrantes, cuya localización dependerá del tipo de estructura secundaria que estén conformando. En la Figura

A1.4b se muestra una representación de Ramachandran, en la que se observa a las alfa hélices y la conformación beta en los primeros 3 cuadrantes, dentro de las regiones permitidas estéricamente. La mayor parte de los valores angulares obtenidos se encuentran dentro de las regiones esperadas; sin embargo, existen excepciones como el caso de la glicina, que gracias a que su cadena lateral es un hidrógeno puede adoptar muchas conformaciones estéricamente prohibidas, y la prolina, debido a que es el único aminoácido capaz de generar enlaces *cis* y *trans*. También existe la posibilidad de que el diagrama se vea alterado debido a la presencia de un ligando.⁹⁸

Estos elementos de validación son empleados por diferentes servidores (ej. PROCHECK, Verify3D, Errat, entre otros) para asegurar que el modelo generado es confiable y puede ser utilizado para estudios *in silico*.

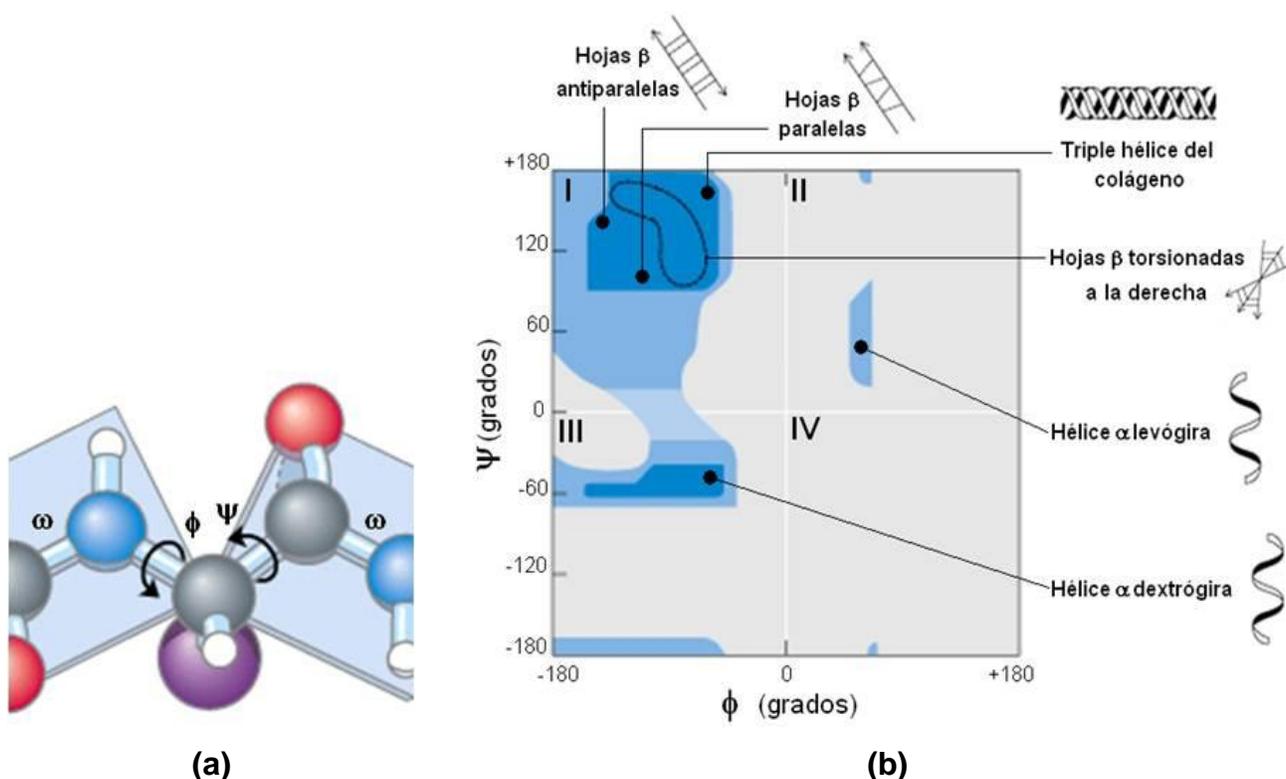


Figura A1.4. (a) Representación de los ángulos de enlace rotables ϕ y ψ , (b) representación del diagrama de Ramachandran.⁹⁸

A1.3. Acoplamiento Molecular (*Docking*)

El acoplamiento molecular (*Docking*) es una técnica computacional que permite predecir la conformación y orientación del ligando en el sitio de unión de la proteína blanco, así como plantear nuevas aproximaciones al diseño de fármacos.⁹⁹ Esta técnica se emplea cuando la estructura de la diana es conocida, usualmente a partir de estudios de cristalografía de rayos X, por resonancia magnética nuclear (RMN) o bien por técnicas bioinformáticas de predicción estructural, como las que se mencionaron en el punto anterior. El conocimiento estructural del receptor abre la posibilidad de examinar la inducción de cambios estructurales en el ligando para predecir la orientación más estable dentro del sitio de unión. Esto se realiza mediante una exploración exhaustiva del espacio conformacional del ligando, así como una discriminación entre los diferentes modos de unión que pueda adoptar el ligando en la proteína, y finalmente se estima la energía de unión con el receptor. La energía de unión del complejo ligando-receptor, generalmente expresada en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs ($\Delta G_{\text{unión}}$), considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, así como de energía de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.¹⁰⁰

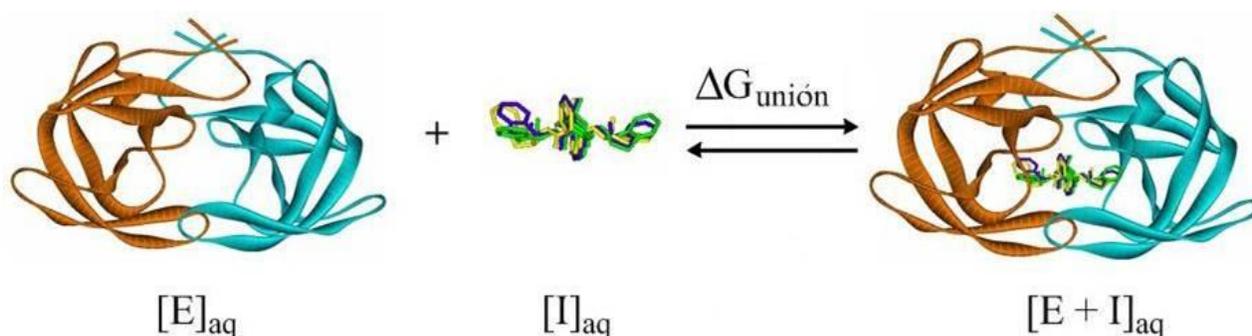


Figura A1.5. Esquematización del fundamento del acoplamiento molecular, en donde el inhibidor (I) se une a la enzima (E) y forma el complejo inhibidor-enzima (E + I).¹⁰¹

Durante el estudio de acoplamiento se formulan una serie de valores que contemplan la orientación, conformación y translación del ligando en el receptor, cuyo estado y coordenadas provienen de un algoritmo, al cual se le denomina algoritmo genético.¹⁰²

Existen varias técnicas para la identificación del modo de unión del ligando al receptor, pero de forma general éstas contemplan: un espacio delimitado mediante la generación de una

mallla (grid) de energía potencial, la cual almacena la información de la contribución energética del potencial electrostático y de van der Waals del receptor en ciertos puntos; la búsqueda del espacio conformacional del ligando mediante la implementación de métodos estocásticos (Monte Carlo) o azarosos (algoritmos genéticos), para la evaluación y posicionamiento (*rank*) final a partir del puntaje (*score*) de las conformaciones finales.⁹⁹

En el caso del programa *AutoDock*®, la energía de unión se describe en términos aditivos de varios componentes que contribuyen a la energía de formación del complejo ligando-receptor, mostrados en la siguiente ecuación¹⁰³:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{tr}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

Donde:

- $\Delta G_{\text{disolvente}}$ es la contribución debida a efectos del disolvente, como interacciones disolvente-ligando, disolvente-proteína y disolvente complejo ligando-receptor.
- $\Delta G_{\text{conformación}}$ es la energía debida a cambios conformacionales en la proteína y el ligando.
- $\Delta G_{\text{interacción}}$ es la energía libre asociada a las interacciones ligando-receptor.
- $\Delta G_{\text{rotación}}$ es la pérdida de energía asociada a la pérdida de grados de libertad de rotación interna de la proteína y el ligando.
- ΔG_{tr} es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.
- $\Delta G_{\text{vibración}}$ corresponde a los cambios de energía libre debido a cambios en los modos vibracionales.

Uno de los aspectos más críticos de esta técnica es la dificultad de explorar de forma completa los cambios conformacionales que puedan ocurrir en el receptor, tanto en las cadenas laterales de los residuos como especialmente en cambios que afecten la disposición del sitio de unión. En los últimos años se han producido avances importantes en la resolución de dichas dificultades, como el uso de funciones de puntuación consenso (*hit consensus*), que consiste en seleccionar los confórmeros con base en resultados obtenidos por más de dos *softwares* diferentes, y la re-evaluación *a posteriori* de las afinidades y conformaciones mediante el empleo de técnicas de dinámica molecular o metadinámica.¹⁰⁰

A1.4. Dinámica Molecular

Los métodos de simulación dinámica son ampliamente utilizados para obtener información acerca de la evolución conformacional, cinética y termodinámica de proteínas, u otras macromoléculas biológicas, durante un determinado periodo de tiempo. Los diferentes procesos dinámicos, que pueden ser caracterizados para proteínas, presentan escalas de tiempo que van desde los femtosegundos hasta las horas, para cada uno de los cuales existe un extenso rango de amplitudes y energías obtenidos a partir de la integración de una serie de algoritmos matemáticos a la ecuación de movimiento. El tiempo de movimiento a designar dependerá de la función bioquímica a evaluar. Las reacciones enzimáticas son rápidas y localizadas (10^{-11} – 10^{-7} segundo); el acoplamiento alostérico y el proceso de plegamiento son movimientos lentos (10^{-5} – 1 segundo); mientras que la asociación de subunidades ocurre en un mayor número de movimientos (>1 segundo).¹⁰⁴

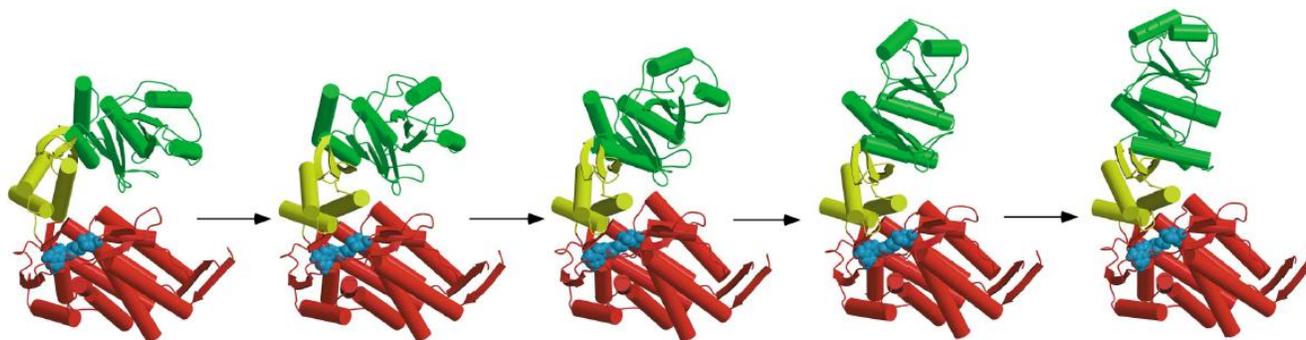


Figura A1.6. Ejemplificación de una simulación de acoplamiento alostérico, en donde el GTP (azul) induce un cambio conformacional en la proteína.¹⁰⁵

Los sistemas macromoleculares son complejos y consisten de un gran número de partículas, por lo que este tipo de simulaciones se llevan a cabo empleando cálculos de mecánica molecular (MM) que permiten describir superficies de energía potencial y propiedades físicas acerca del comportamiento atómico. En estas simulaciones se involucra un cálculo numérico iterativo de las fuerzas instantáneas presentes en el sistema MM y los movimientos correspondientes de dicho sistema. Los modelos de MM representan a los átomos como esferas y a los enlaces como resortes, por lo que al final el sistema macromolecular consiste en un grupo de partículas que presentan movimiento en respuesta a sus interacciones y distancias, de acuerdo a las ecuaciones de movimiento definidas por la Mecánica Clásica.

El proceso de dinámica molecular (DM) considera una serie de factores entre los que se encuentran los siguientes: ¹⁰⁴

- El ambiente simulado: el reproducir las condiciones experimentales permite evaluar el comportamiento real de la proteína en un organismo. La proteína se puede estudiar como una entidad aislada (al vacío) o como un sistema rodeado por moléculas de agua, iones y/o por proteínas vecinas (ambiente cristalino). La simulación de la solvatación de la proteína incluye la posibilidad de establecer un sistema electrostático, implícito (se desprecian las interacciones solvente-proteína para reducir tiempo de cálculo) o explícito (en él se consideran las interacciones estéricas y electrónicas del disolvente con la macromolécula). En este último, el sistema se encuentra delimitado por un espacio cúbico que permite establecer el comportamiento cinético y termodinámico de la estructura principal con la secundaria (solvente o macromoléculas).
- Longitud de la simulación: se encuentra delimitada por una serie de factores a considerar, entre los cuales se encuentran el costo computacional (tiempo de máquina) para evaluar las interacciones, el número de interacciones necesarias para evaluar cada periodo de tiempo, los periodos de tiempo para ese proceso, y el número de grados de libertad para la propagación.
- Condiciones experimentales: debido a la importancia de replicar las condiciones experimentales, la DM considera factores como presión y temperatura para reproducir las condiciones físicas reales.

A1.5. Diseño de fármacos asistido por computadora

El diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC) es un área del diseño racional de fármacos y consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora con la finalidad de descubrir nuevos fármacos en un menor tiempo y costo. El DiFAC tiene como objetivos principales el descubrir nuevos líderes moleculares, optimizar a los líderes ya existentes y seleccionar, de una biblioteca de moléculas, a los candidatos que tienen mayor probabilidad (o menor probabilidad) de convertirse en fármacos exitosos. Desde luego, las predicciones obtenidas con el DiFAC, como en muchas otras disciplinas científicas, deben someterse a pruebas experimentales.

Los métodos del DiFAC pueden agruparse en dos áreas principalmente: métodos basados en el ligando, cuando se conoce la estructura de una serie de moléculas con la misma actividad biológica (ej. relaciones estructura-actividad), y métodos basados en el receptor. Este último método se emplea cuando se conoce la estructura del receptor, determinando la zona con la cual interaccionará el ligando mediante la identificación del sitio activo o alostérico. Los métodos de diseño basado en la estructura del receptor más conocidos son el diseño *de novo*, el cual consiste en construir moléculas directamente en el receptor, y el acoplamiento molecular automatizado (*docking*). Para estos métodos generalmente se ensayan una serie de bibliotecas moleculares que permiten identificar algunas de las estructuras que pueden ser empleadas como líderes para el diseño de nuevos fármacos, a lo cual se le conoce como *screening* virtual (*virtual screening*).¹⁰⁶

A1.5.1. *Screening* virtual

Se denomina *screening* virtual al conjunto de métodos computacionales destinados a seleccionar de entre grandes bases de datos a aquellos compuestos que, por reunir ciertas características estructurales, son candidatos a presentar una propiedad o actividad biológica determinada. Esta técnica permite identificar, en un tiempo relativamente breve, nuevas estructuras líderes que facilitarán el diseño de nuevos fármacos. El *screening virtual* tiene varias ventajas, como son: minimización de tiempo y costos inherentes al desarrollo de un nuevo fármaco, maximización de probabilidades de éxito en las etapas preclínica y clínica, así como también posee un fuerte fundamento bioético al disminuir estudios que involucren animales y humanos.¹⁰⁷

A1.5.2. Propiedades ADMET

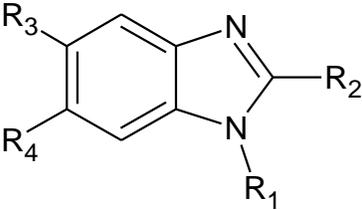
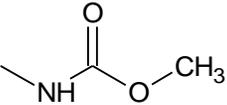
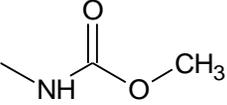
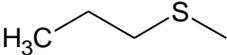
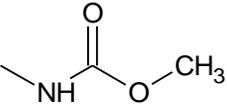
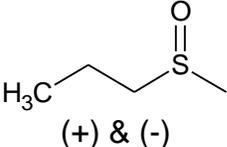
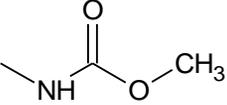
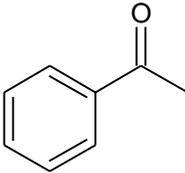
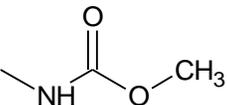
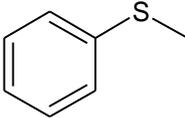
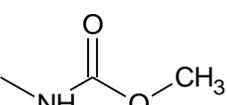
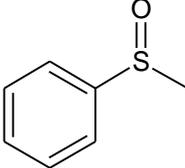
Un concepto adicional que se debe considerar durante el diseño de fármacos, es el comportamiento de dichas moléculas en un organismo biológico durante el mecanismo de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco, así como la toxicidad que pudiese presentar. Las propiedades estructurales de las moléculas juegan un papel importante en los mecanismos farmacocinéticos, es por esto que actualmente se han propuesto una serie de reglas que permiten predecir el comportamiento del fármaco en el organismo, basándose principalmente en las propiedades estructurales y fisicoquímicas de los compuestos.¹⁰⁸ Algunas de las reglas más empleadas son las siguientes:

-
- (a) Regla de los 5 de Lipinski: esta regla establece que para que un fármaco presente buena absorción oral y permeabilidad celular es necesario que cumpla lo siguiente: tener un peso molecular menor o igual a 500 Daltons ($PM \leq 500 \text{ Da}$); cinco o menos grupos donadores de puentes de hidrógeno ($DPH \leq 5$); diez o menos grupos aceptores de puentes de hidrógeno ($APH \leq 10$); y un coeficiente de partición octanol-agua menor o igual a 5 ($\log \leq 5$). Si dos o más de las propiedades se encuentran fuera de los valores establecidos, entonces se considera la posibilidad de que el fármaco presente una pobre absorción o permeabilidad.⁸²
- (b) Regla de Veber: con esta regla Veber y colaboradores establecieron las propiedades que determinan la biodisponibilidad del fármaco, entre las que están: no más de 10 enlaces rotables ($ERot \leq 10$); una superficie polar del espacio topológico no mayor a 140 Å ($tPSA \leq 140 \text{ Å}$) o que la suma de grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno sea menor o igual a 12 ($APH + DPH \leq 12$).⁸³
- (c) Regla de Egan: al igual que en la de Veber, en esta regla se establecen algunos parámetros estructurales para beneficiar la biodisponibilidad del fármaco, tales como: poseer una superficie polar del espacio topológico entre 0 y 132 Å ($0 \geq tPSA \leq 132$) y un coeficiente de partición octanol-agua mayor a -1 y menor a 6 ($-1 \geq \log P \leq 6$).⁸⁴

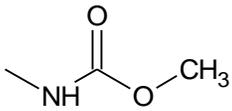
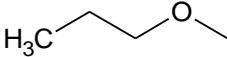
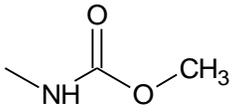
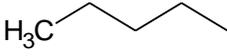
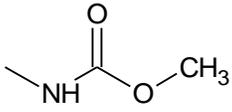
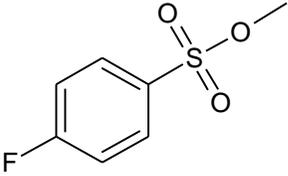
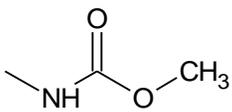
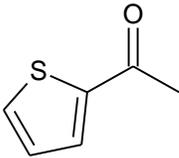
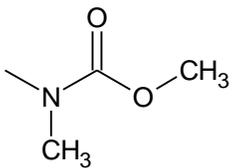
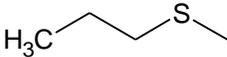
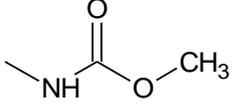
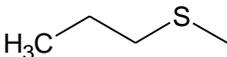
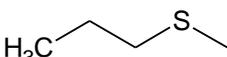
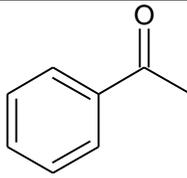
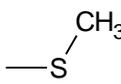
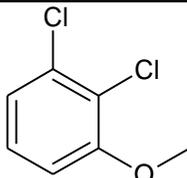
APÉNDICE 2. Principales derivados bencimidazólicos

En la Tabla A2.1 se enlistan los diferentes derivados bencimidazólicos considerados para el estudio realizado en el presente trabajo.

Tabla A2.1. Principales derivados bencimidazólicos

				
Fármaco	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
CBZ (carbendazim)	H		H	H
ABZ (albendazol)	H			H
ABZSO (sulfóxido de albendazol)	H		 (+) & (-)	H
MBZ (mebendazol)	H			H
FBZ (fenbendazol)	H			H
FBZSO (sulfóxido de fenbendazol)	H		 (+) & (-)	H

Continuación de la Tabla A2.1

Fármaco	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
OBZ (oxibendazol)	H			H
PBZ (parbendazol)	H			H
LBZ (luxabendazol)	H			H
NZ (nocodazol)	H			H
FPA1⁹	H			H
FPA2⁹	CH ₃			H
GNV-ABZ⁷	CH ₃	—CF ₃		H
GNV-MBZ⁷	CH ₃	—CF ₃		H
TCBZ (triclabendazol)	H			Cl

APÉNDICE 3. Identificación de las secuencias de las isoformas de β -tubulina

En la Tabla A3.1 se reportan todas las secuencias silvestres (WT) y, en algunos casos, secuencias con alguna mutación (MT) de los diferentes isotipos (Isot.) de la β -tubulina encontrados para cada uno de los organismos de interés. Así mismo se reporta el número de aminoácidos que posee la secuencia (No. AA) y el número de acceso de identificación de la secuencia en el *Proteinbank* del NCBI⁶⁰.

Tabla A3.1. Secuencias de β -tubulina reportadas en el servidor NCBI

Grupo	Organismos	Isot.	WT/MT	No. AA	No. de acceso (<i>Proteinbank</i>)
Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	BT1	WT	451	CAC09371
		BT2A	WT	445	CAD70628
		BT2B	WT	445	CAI40952
		BT2C	WT	445	CAA26203
		BT3	WT	450	AAC52035
		BT4	WT	450	BAD96759
		BT5	WT	444	BAE78618
	<i>Bos taurus</i>	BT2B	WT	451	AAT84374
		BT2C	WT	445	AAI05182
		BT3	WT	450	AAI11296
		BT4	WT	444	AAI03099
		BT5	WT	444	AAI05402
		BT6	WT	446	AAI13261
	<i>Ovis aries</i>	-	WT	445	D0VWY9 ^a
	<i>Mus musculus</i>	BT1	WT	451	CAM26336
		BT2	WT	445	BAE22178
		BT3	WT	450	BAE28719
		BT6	WT	447	AAH08225

Continuación de la Tabla A3.1

Grupo	Organismos	Isot.	WT/MT	No. AA	No. de acceso (Proteinbank)
Nematodos	<i>Trichinella spiralis</i>	-	WT	444	EFV50889
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	BT1	WT	448	ABN58791
	<i>Haemonchus contortus</i>	BT1	WT	448	ACS29564
		BT1	MT (200)	448	ABM92348
		BT1	MT (198)	448	ACS29568
		-	MT (167)	-	- - -
		BT2	WT	448	ACS29571
		BT2	MT (198)	448	ACS29574
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	-	WT	448
	BT1 ^b		MT (200)	93	ACY00507
	-		MT (167)	-	- - -
	<i>Brugia malayi</i>	-	WT	448	AAU12501
	<i>Trichuris trichiura</i>	-	WT	444	AAB99949
		-	MT (200)	-	- - -
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	BT1	WT	450	ADY45466
		BT1 ^c	MT (200)	451	ADY45556
BT2		WT	455	ADY46197	
BT4		WT	444	ADY46359	
Trematodo	<i>Fasciola hepatica</i>	BT1	WT	436	CAC82577
		BT2 ^d	WT	443	CAO79608
		BT3	WT	444	CAO79609
		BT4	WT	442	CAO79610
		BT5	WT	431	CAO79611
		BT6	WT	430	CAO79612
Cestodos	<i>Echinococcus multilocularis</i>	BT1 ^d	WT	448	CAB91640
		BT2 ^e	WT	445	CAB91641
		BT3	WT	443	CAB91642
	<i>Moniezia expansa</i>	BT1	WT	444	AFD03594
		BT2 ^b	WT	372	AFD03595

Continuación de la Tabla A3.1

Grupo	Organismos	Isot.	WT/MT	No. AA	No. de acceso (Proteinbank)
Protozoarios	<i>Giardia intestinalis</i>	-	WT	445	CAA29923
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	WT	446	AAA67546
	<i>Leishmania mexicana</i>	-	WT	443	AAK31149
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	WT	442	AAA91956
	<i>Toxoplasma gondii</i>	-	WT	449	AAA30146
	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	WT	458	EAL49403

Notas:

- (a) Clave de UniProt.
- (b) Secuencia incompleta.
- (c) Sin resistencia confirmada.⁴⁵
- (d) Isoforma que parece ser más susceptible a carbamatos bencimidazólicos.²³
- (e) Isoforma cuya expresión podría ser la causante de la baja afinidad de los bencimidazoles.⁵⁷

APÉNDICE 4. Selección del servidor para generar los modelos de β -tubulina

En la Tabla A4.1 se muestran los resultados de la validación de los modelos obtenidos con la *plantilla* 3N2G_D a partir de la implementación de varios servidores que emplean la técnica de modelado por homología, entre los cuales se encuentran: I-TASSER (ITS)⁶⁴, Swiss-Model (SWM)¹⁰⁹, 3D-Jigsaw (3DJ)¹¹⁰, HOMER (HOM)¹¹¹, (PS)^{2-v2} (PS2)¹¹², SCWRL (SWL)¹¹³, Jackal (JAK)¹¹⁴, ESyPred3D (E3D)¹¹⁵, GENO3D (G3D)¹¹⁶ & Modeller 9v10 (MOD)⁶⁵. Todos los modelos fueron comparados y evaluados a fin de seleccionar aquel cuyos resultados de validación fueran lo más aproximados a los parámetros establecidos.

Tabla A4.1. Resultados de los modelos generados con la técnica de modelado por homología

Servidor	No. Modelo	QMEANscore	Z-score	RMSD (Å)	Ramachandran plot (%)			
					F	P	G	NP
<i>ITS</i>	1	0.576	-2.263	0.153	83.5	14.7	1.5	0.3
<i>SWM</i>	1	0.612	-1.832	0.076	69.8	23.7	4.0	2.4
<i>3DJ</i>	1	0.540	-2.680	0.104	71.6	21.5	3.9	3.0
<i>HOM</i>	1 ^a	0.180	-6.975	6.015	70.7	20.9	4.4	4.1
<i>PS2</i>	1 ^a	0.630	-1.613	0.167	85.5	11.0	2.7	0.8
<i>SWL</i>	1	0.581	-2.202	0.094	70.6	23.5	3.5	2.4
<i>JAK</i>	1	0.596	-2.022	0.096	69.8	24.0	3.8	2.4
<i>E3D</i>	1	0.597	-2.016	2.784	85.4	11.1	1.9	1.6
<i>G3D</i>	1	0.597	-2.000	0.906	74.5	21.4	1.9	2.2
	2	0.602	-1.946	0.909	77.0	17.6	3.3	2.2
	3	0.585	-2.139	1.000	77.0	20.1	1.9	1.1
<i>MOD</i>	1	0.617	-1.769	0.135	86.6	9.7	2.7	1.1
	2 ^a	0.622	-1.717	0.126	86.6	9.9	2.4	1.1
	3	0.610	-1.858	0.129	85.8	10.8	2.4	1.1
	4	0.605	-1.918	0.137	86.0	10.2	2.4	1.3
	5	0.604	-1.924	0.126	86.8	9.1	3.0	1.1

Nota: (a) Modelos cuyo sitio de unión se encontró cerrado después de la optimización. Regiones del diagrama de Ramachandran: (F) Favorecida; (P) Permitida; (G) Generosamente Permitida & (NP) No Permitida.

APÉNDICE 5. Validación de los modelos

En este apartado se presentan los resultados de la validación de las estructuras creadas a partir del modelado por homología con la *plantilla* 3N2G_D para *T. spiralis*, *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *E. mitilocularis* y *F. hepatica*.

a) *Trichinella spiralis*

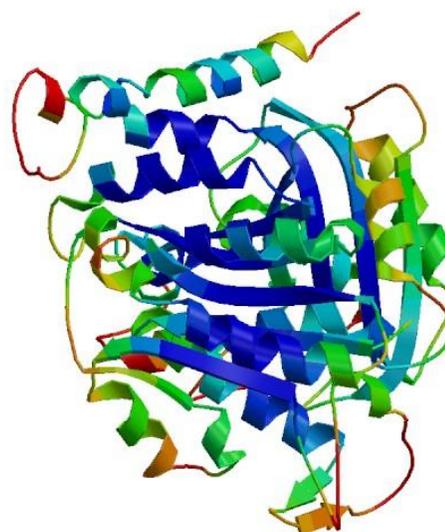
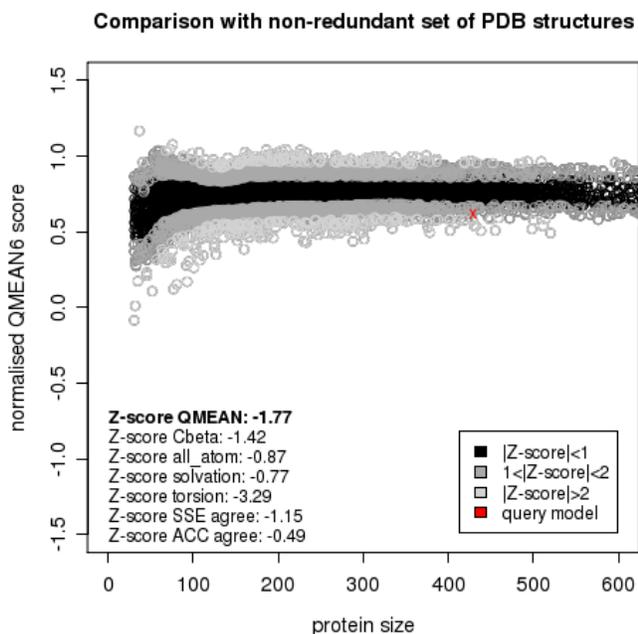


Figura A5.1. Gráfico de Z-score para el modelo de *T. spiralis*.

Figura A5.2. Esquema de errores por residuo para el modelo de *T. spiralis*.

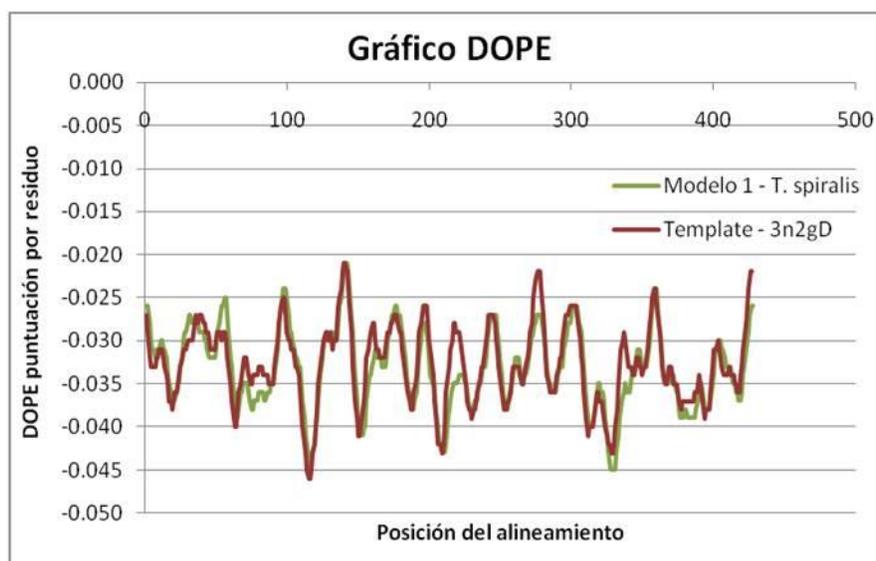


Figura A5.3. Gráfico DOPE para el modelo de *T. spiralis*.

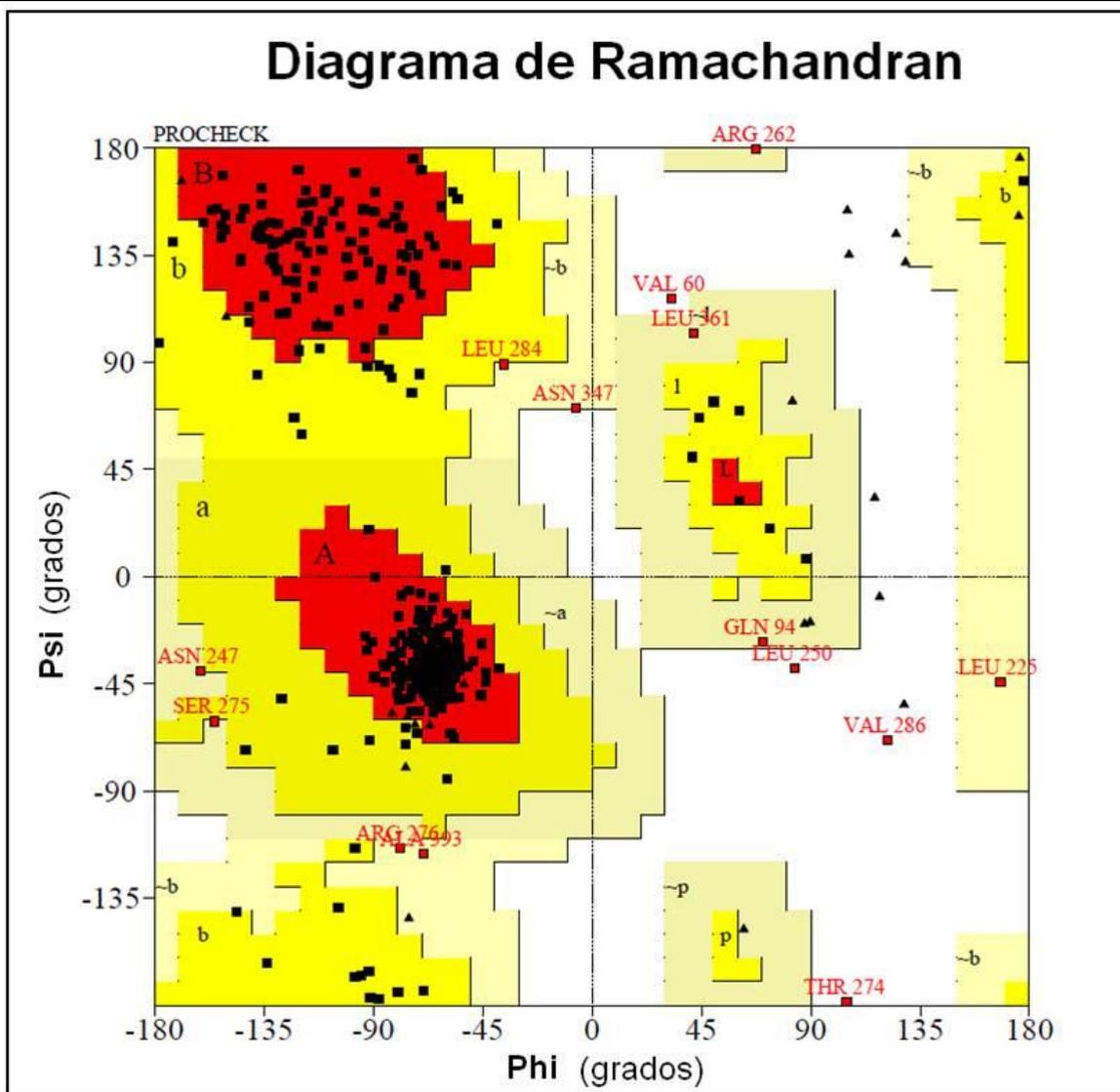


Figura A5.4. Diagrama de Ramachandran para el modelo de *T. spiralis*.

Estadísticas del Diagrama

Residuos en las regiones más favorecidas [A,B,L]	322	86.6%
Residuos en las regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	36	9.7%
Residuos en las regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	10	2.7%
Residuos en las regiones no permitidas	4	1.1%
	-----	-----
Número de residuos (excluyendo Gly y Pro)	372	100.0%
Número de residuos terminales	2	
Número de glicinas	35	
Número de prolinas	19	

Número total de residuos en la estructura	428	

b) *Giardia intestinalis*

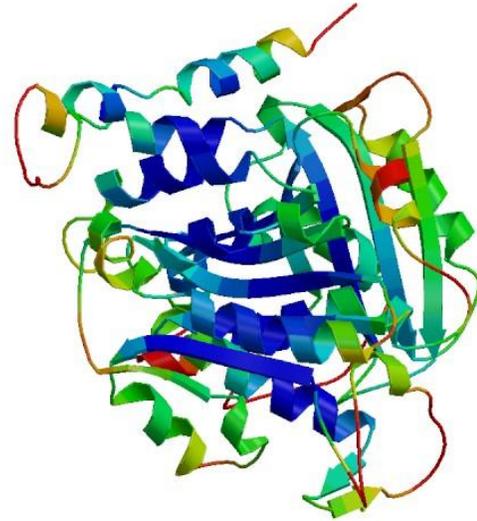
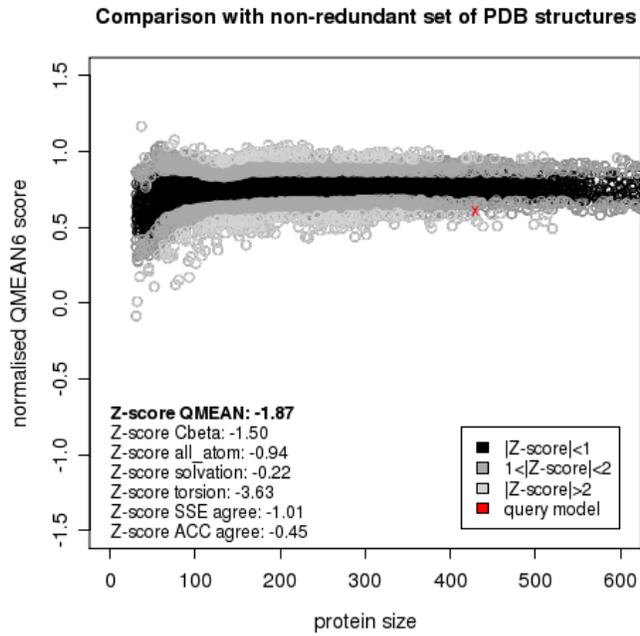


Figura A5.5. Gráfico de Z-score para el modelo de *G. intestinalis*.

Figura A5.6. Esquema de errores por residuo para el modelo de *G. intestinalis*.

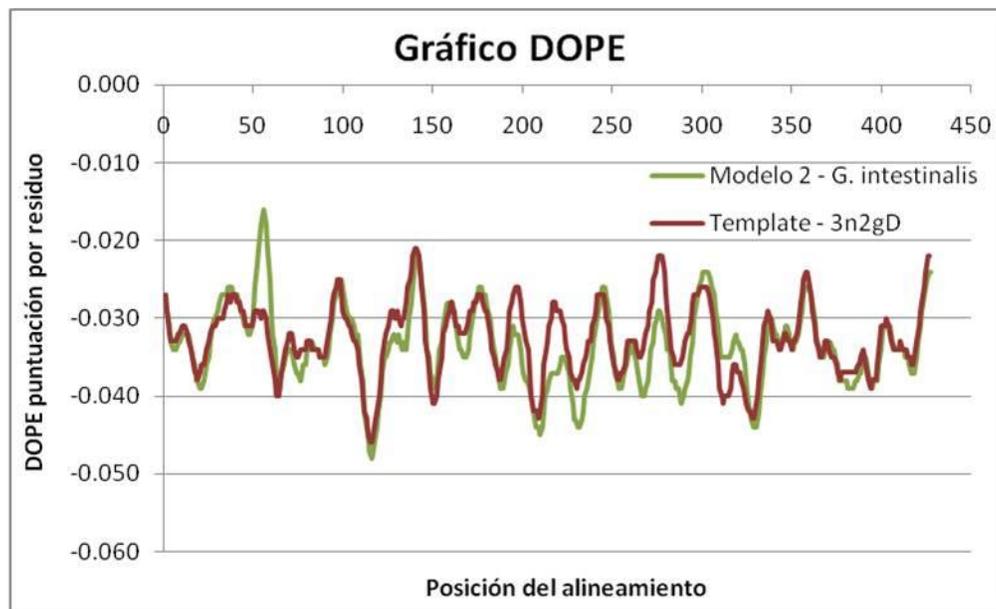


Figura A5.7. Gráfico DOPE para el modelo de *G. intestinalis*.

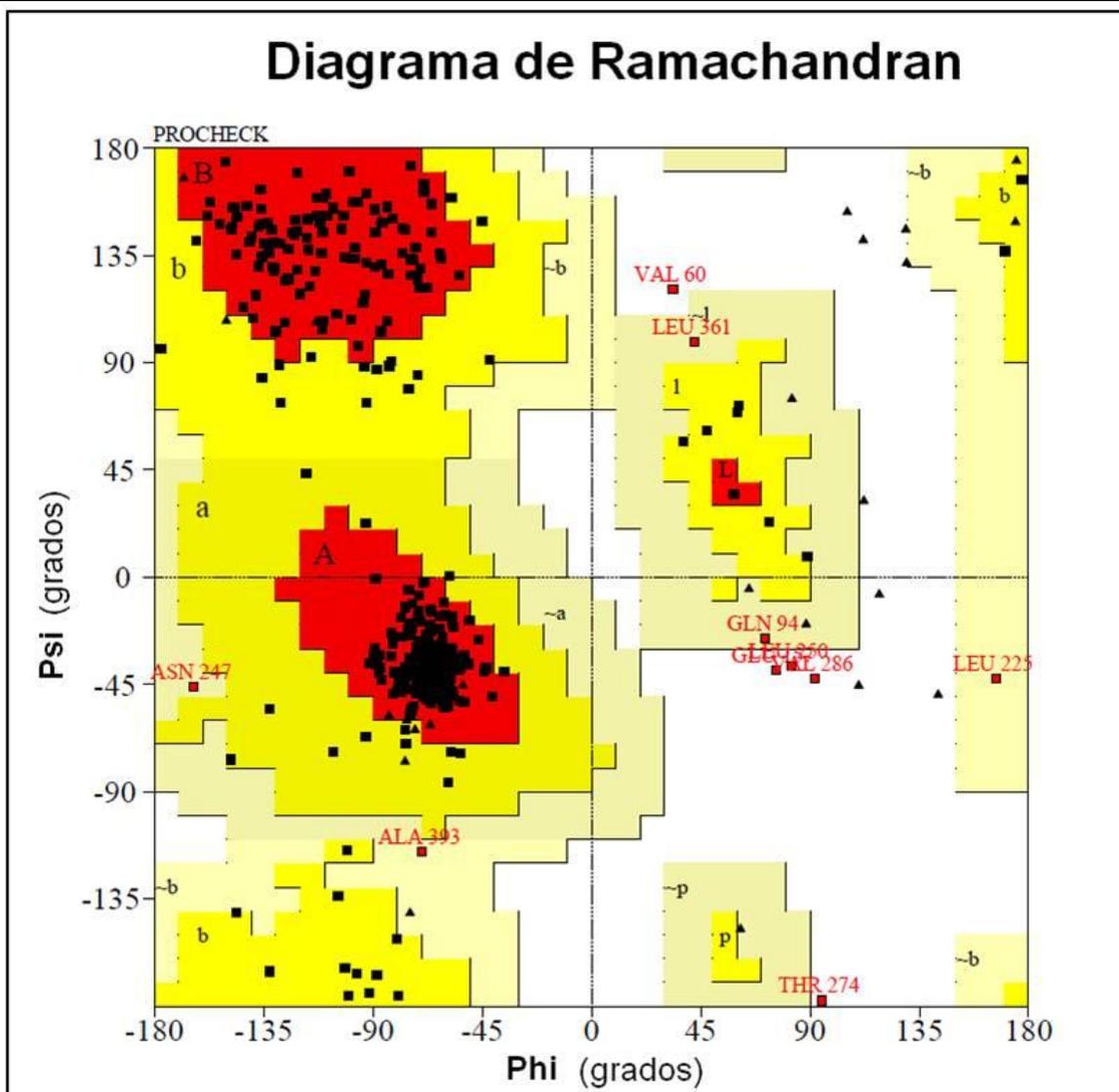


Figura A5.8. Diagrama de Ramachandran para el modelo de *G. intestinalis*.

Estadísticas del Diagrama

Residuos en las regiones más favorecidas [A,B,L]	320	86.0%
Residuos en las regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	42	11.3%
Residuos en las regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	5	1.3%
Residuos en las regiones no permitidas	5	1.3%
	-----	-----
Número de residuos (excluyendo Gly y Pro)	372	100.0%
Número de residuos terminales	2	
Número de glicinas	35	
Número de prolinas	19	

Número total de residuos en la estructura	428	

c) *Entamoeba histolytica*

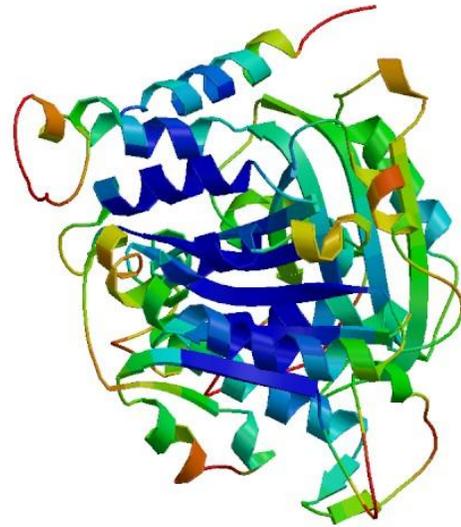
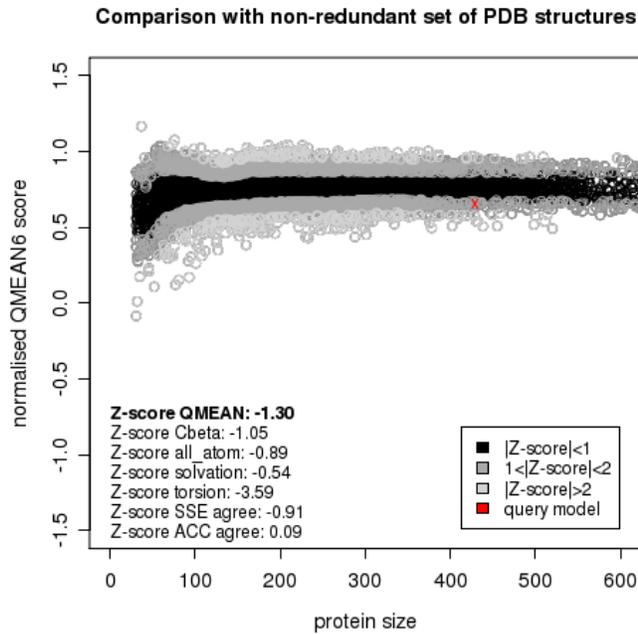


Figura A5.9. Gráfico de Z-score para el modelo de *E. histolytica*.

Figura A5.10. Esquema de errores por residuo para el modelo de *E. histolytica*.

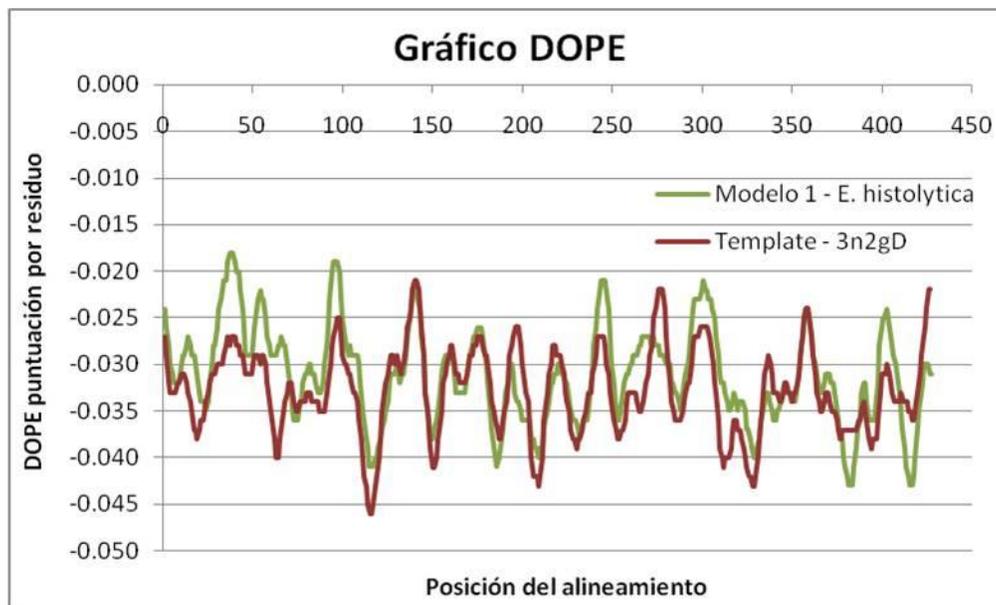


Figura A5.11. Gráfico DOPE para el modelo de *E. histolytica*.

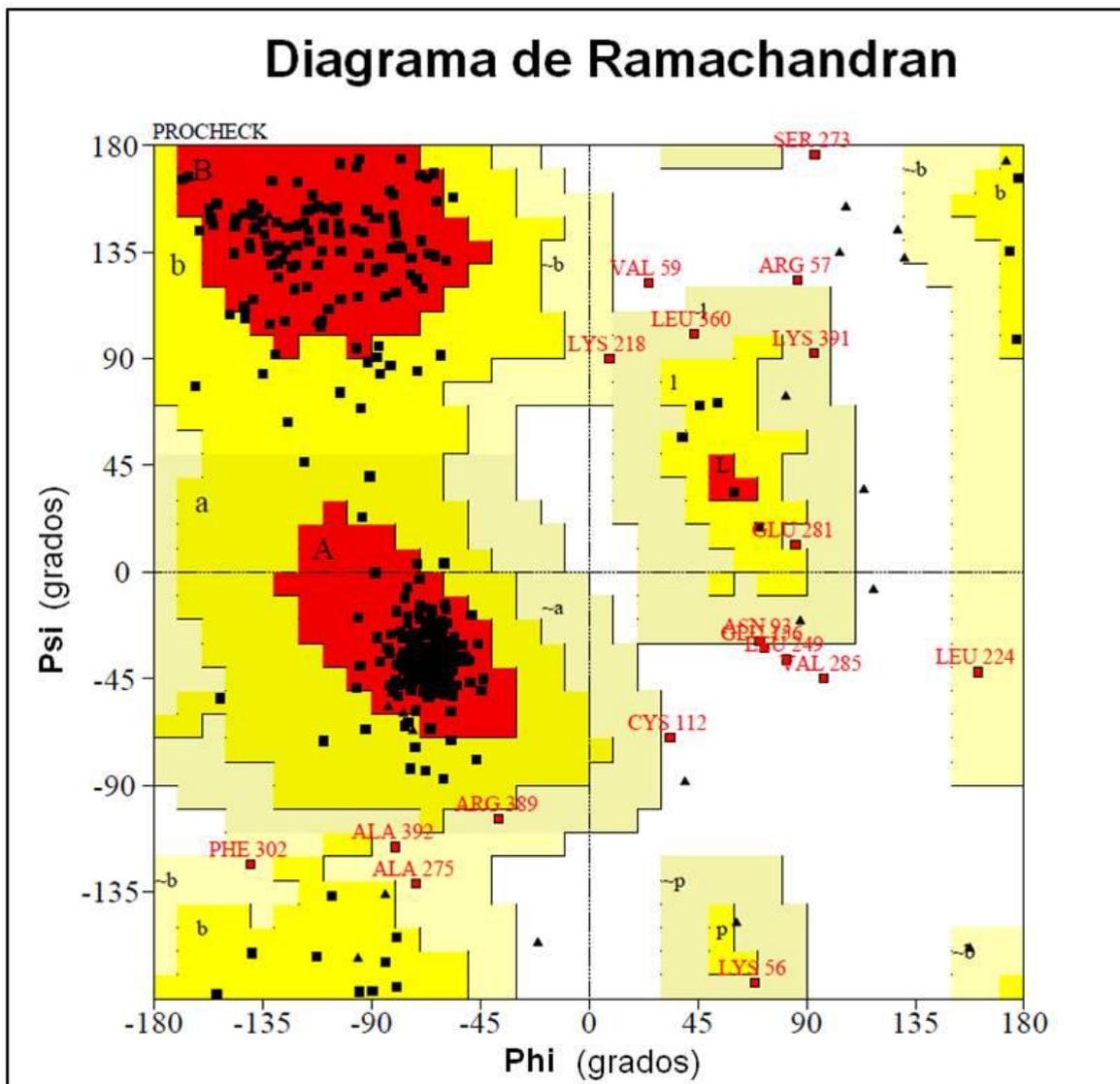


Figura A5.12. Diagrama de Ramachandran para el modelo de *E. histolytica*.

Estadísticas del Diagrama

Residuos en las regiones más favorecidas [A,B,L]	318	84.1%
Residuos en las regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	42	11.1%
Residuos en las regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	11	2.9%
Residuos en las regiones no permitidas	7	1.9%
	-----	-----
Número de residuos (excluyendo Gly y Pro)	378	100.0%
Número de residuos terminales	1	
Número de glicinas	30	
Número de prolinas	19	

Número total de residuos en la estructura	428	

d) *Echinococcus multilocularis*

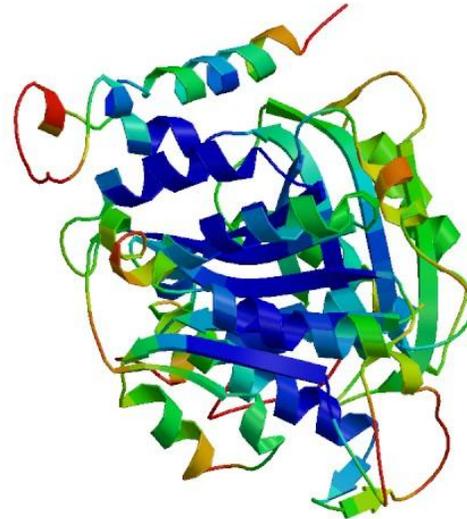
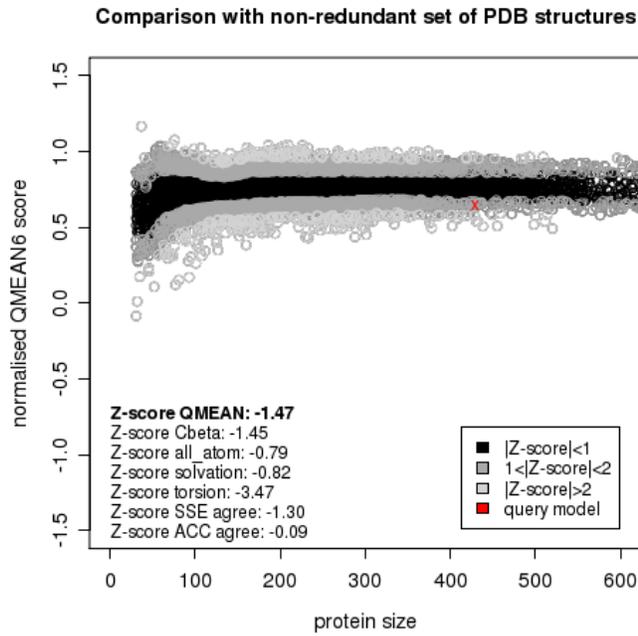


Figura A5.13. Gráfico de Z-score para el modelo de *E. multilocularis*.

Figura A5.14. Esquema de errores por residuo para el modelo de *E. multilocularis*.

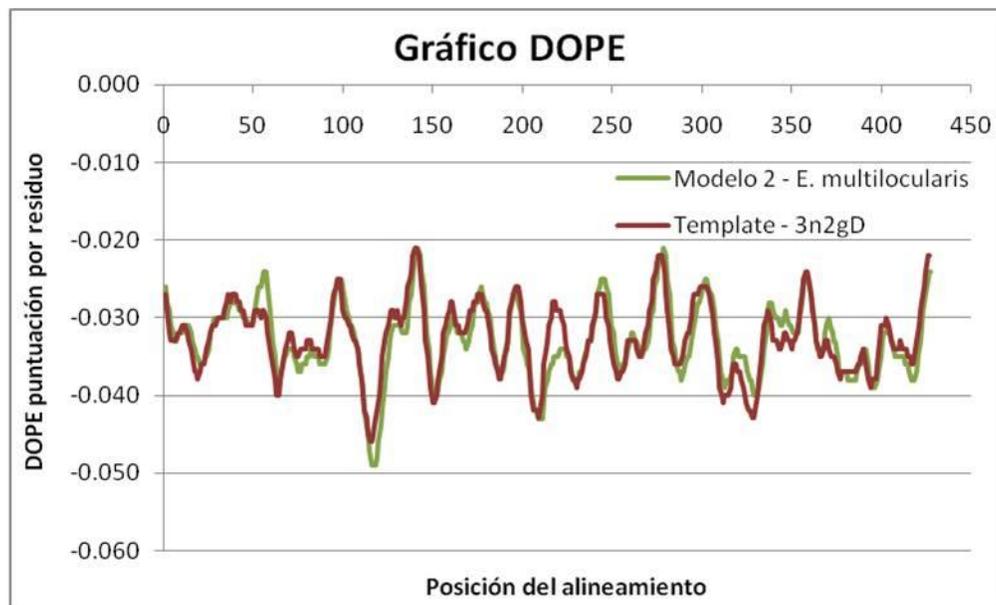


Figura A5.15. Gráfico DOPE para el modelo de *E. multilocularis*.

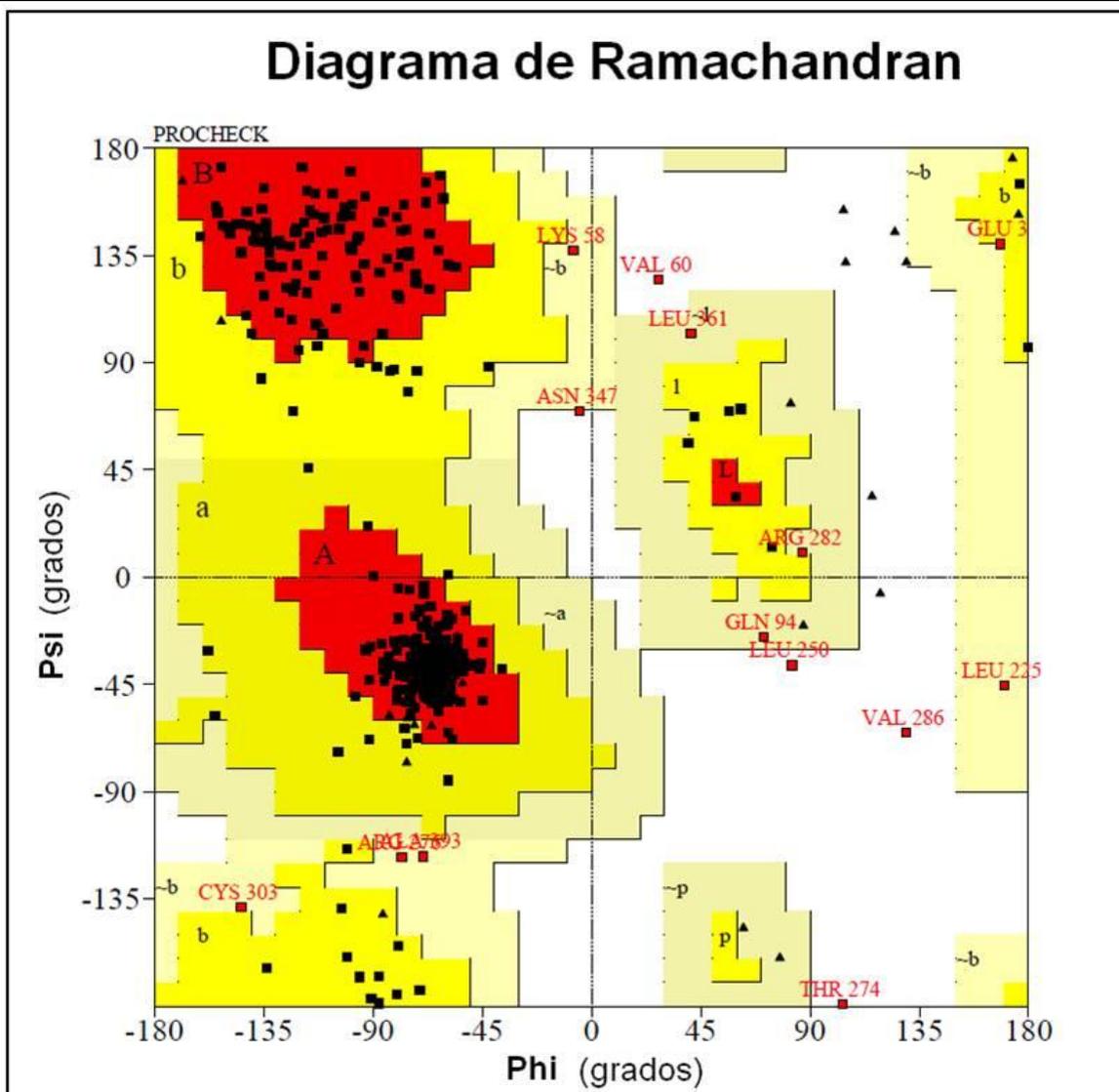


Figura A5.16. Diagrama de Ramachandran para el modelo de *E. multilocularis*.

Estadísticas del Diagrama

Residuos en las regiones más favorecidas [A,B,L]	322	86.3%
Residuos en las regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	38	10.2%
Residuos en las regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	8	2.1%
Residuos en las regiones no permitidas	5	1.3%
	-----	-----
Número de residuos (excluyendo Gly y Pro)	373	100.0%
Número de residuos terminales	2	
Número de glicinas	34	
Número de prolinas	19	

Número total de residuos en la estructura	428	

e) *Fasciola hepatica*

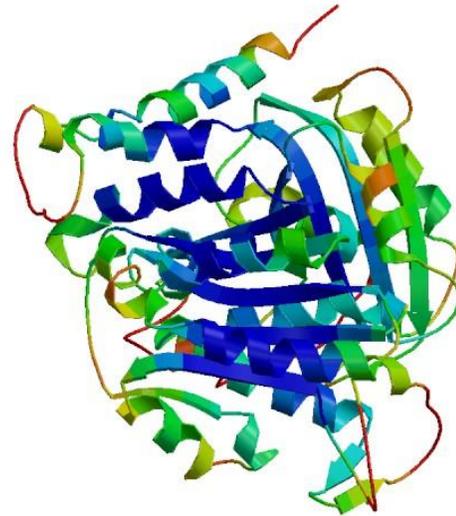
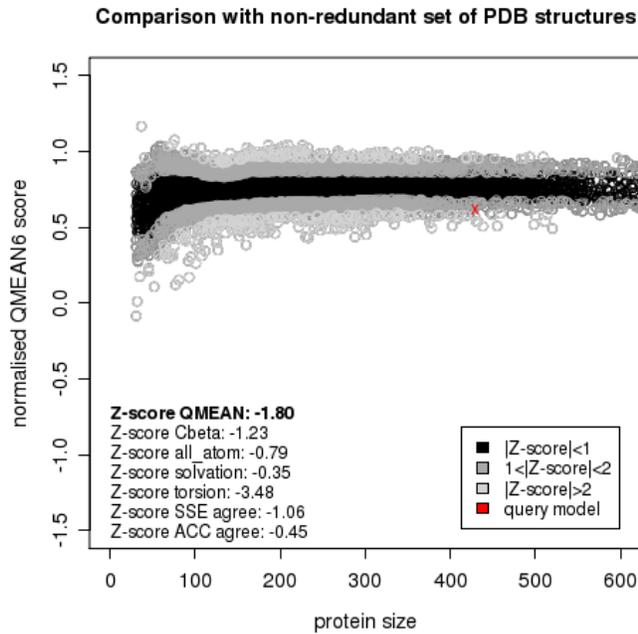


Figura A5.17. Gráfico de Z-score para el modelo de *F. hepatica*.

Figura A5.18. Esquema de errores por residuo para el modelo de *F. hepatica*.

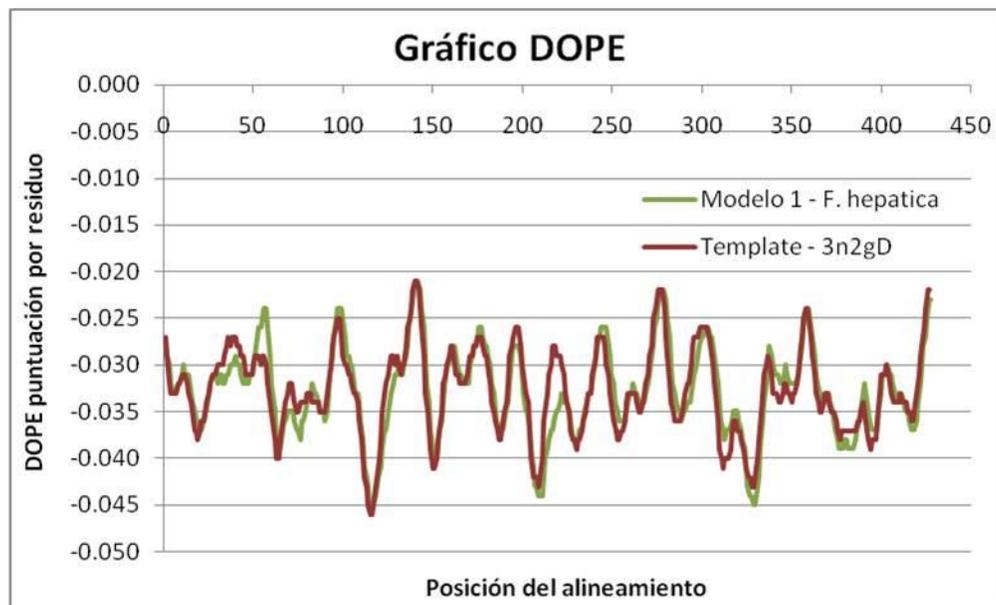


Figura A5.19. Gráfico DOPE para el modelo de *F. hepatica*.

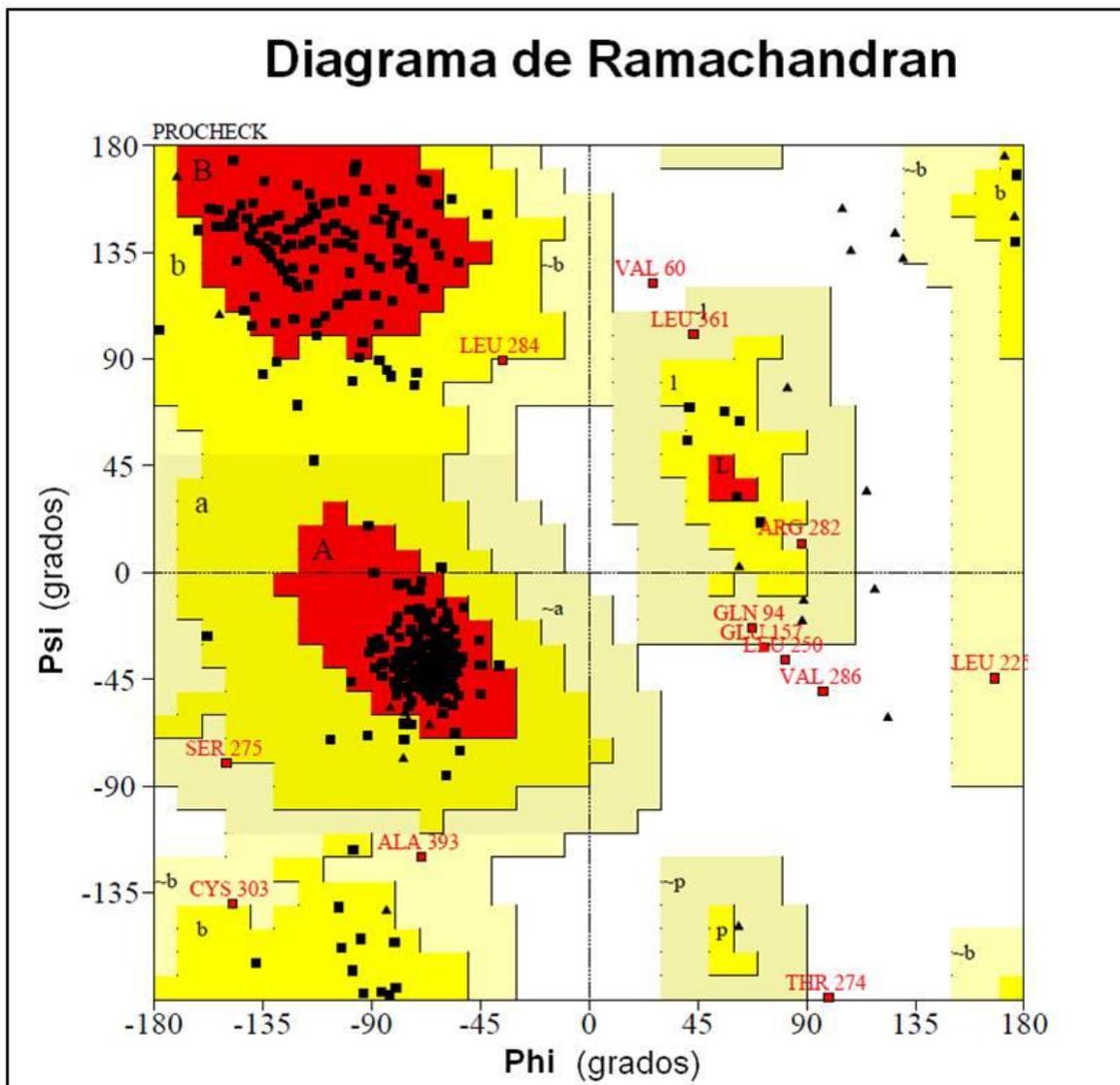


Figura A5.20. Diagrama de Ramachandran para el modelo de *F. hepatica*.

Estadísticas del Diagrama

Residuos en las regiones más favorecidas [A,B,L]	323	86.8%
Residuos en las regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	36	9.7%
Residuos en las regiones generosamente permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]	8	2.2%
Residuos en las regiones no permitidas	5	1.3%
	-----	-----
Número de residuos (excluyendo Gly y Pro)	372	100.0%
Número de residuos terminales	2	
Número de glicinas	34	
Número de prolinas	20	

Número total de residuos en la estructura	428	