



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**Estudio de modelado por homología para determinar la estructura de la
enzima arginina deiminasa de *Giardia intestinalis* y diseño de inhibidores**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Pedro Josué Trejo Soto



TUTOR: Rafael Castillo Bocanegra

AÑO: junio 2013



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	Dr. Eugene Athanas Bratoeff
Vocal	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario	Dr. Fernando Cortés Guzmán

Lugar donde se desarrolló el tema

Laboratorio 122, Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM.

Parte de este trabajo se presentó en el 30° Congreso Latinoamericano de Química y
47° Congreso Mexicano de Química

Asesor

Dr. Rafael Castillo Bocanegra

Sustentante

Q.F.B. Pedro Josué Trejo Soto

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar, brindándome todo lo necesario para forjarme personal y profesionalmente.

Agradezco al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por permitirme trabajar en su grupo de investigación, por ser mi tutor en mis estudios de maestría, por sus sabios consejos, y siempre su oportuna y valiosa opinión durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco especialmente a la M. en C. Alicia Hernández Campos, ya que fue una persona importante para el desarrollo y culminación de este trabajo. Sus aportaciones, observaciones, correcciones, y su apoyo incondicional enriquecieron esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría, becario 409406. Así mismo, agradezco al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia en congreso durante mi estancia en el posgrado.

A los miembros del jurado por la revisión oportuna y exhaustiva del presente escrito, así como por los consejos, correcciones y observaciones del mismo.

Agradezco a la DGSCA-UNAM por el soporte recibido en el uso de la supercomputadora HP Cluster Plataform 4000 Opteron dual core (KanBalam).

A Nayeli López Balbiaux por su amistad y apoyo incondicional, ayudándome e impulsándome a seguir adelante en mis objetivos.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por su opinión y observaciones oportunas al presente trabajo. A la Dra. Lilián Yépez Mulia y su grupo de trabajo por colaborar en esta investigación.

A todos los integrantes del laboratorio 122 por sus consejos y su amistad. Mención especial tienen Antonio Romo, Rodrigo Aguayo, Oscar Méndez y Jaime Pérez por cautivarme por los métodos computacionales y sobre todo ayudarme aplicarlos de la manera correcta.

Por su puesto a mis amigos Viridiana Zurita, Carlos, Piby, Laura, Mariana, Paulina, Diana Rivera, Susy, Samuel Estrada y más aún a Sujhey Hernández por estar a mi lado. La diversión, amistad y apoyo hicieron que los momentos difíciles se vieran disminuidos.

Y a las personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de esta tesis y en general a mi formación profesional y personal, muchas gracias.

Dedicada

A mis padres, Juan y Verónica. A mis hermanos César y Juan Carlos. Los amo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Epidemiología de la giardiasis	3
2.2. <i>Giardia intestinalis</i>	3
2.2.1. Ciclo de vida.....	3
2.2.2. Trofozoíto.....	4
2.2.3. Quiste.....	5
2.2.4. Metabolismo.....	5
2.2.4.1. Metabolismo de carbohidratos	5
2.2.4.2. Metabolismo de lípidos	6
2.2.4.3. Metabolismo de aminoácidos.....	6
2.3. Sintomatología de la giardiasis	6
2.4. Tratamientos	7
2.5. Antecedentes del proyecto	9
2.5.1. Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH).....	9
2.5.2. Arginina deiminasa (ADI).....	10
2.6. Bencimidazoles como alternativa al diseño de fármacos giardicidas	12
2.7. Proteómica del compuesto CMC20	14
2.8. Modelado por homología.....	16
2.9. Acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
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. Modelado por homología.....	21
6.3. Validación de los modelos	21
6.4. Determinación de la estructura secundaria	22
6.5. Estructura del dímero de Arginina deiminasa de <i>G. intestinalis</i>	22

6.6.	Estudio de acoplamiento molecular	22
6.6.1.	Preparación de la proteína	22
6.6.2.	Preparación de los ligandos	22
6.6.3.	Acoplamiento molecular	23
6.7.	Dinámica molecular	23
6.8.	Diseño de nuevos compuestos	24
6.9.	Estudios de acoplamiento molecular en las enzimas OTC y CK de <i>G. intestinalis</i>	25
6.9.1.	Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización	25
6.9.2.	Estudios de acoplamiento molecular	25
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1.	Identificación y alineamiento de secuencias	26
7.2.	Modelado por homología y validación de los modelos.....	30
7.3.	Determinación de la estructura secundaria	35
7.4.	Estructura del dímero de Arginina deiminasa de <i>G. intestinalis</i>	38
7.5.	Predicción de la <i>Druggability</i> en ADI	40
7.6.	Estudios de acoplamiento molecular.....	41
7.7.	Diseño de inhibidores	43
7.7.1.	Diseño por modificación isostérica (serie A).....	43
7.7.2.	Diseño por hibridación y posterior modificación isostérica (serie B).....	45
7.7.3.	Otros compuestos evaluados (serie C)	48
7.7.4.	<i>Virtual screening</i> (serie D).....	50
7.8.	Dinámica molecular de la ADI con ligandos.....	54
7.9.	Estudios de acoplamiento molecular en las enzimas OTC y CK de <i>G. intestinalis</i>	59
7.9.1.	Determinación de la <i>Druggability</i> en la OTC y CK.....	59
7.9.2.	Estudios de acoplamiento molecular	60
8.	CONCLUSIONES	63
9.	PERSPECTIVAS	65
10.	BIBLIOGRAFÍA	66
11.	ANEXOS	70

1. INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una infección intestinal causada por el protozoo flagelado *Giardia intestinalis*; esta protozoosis se manifiesta por diarreas severas, mala absorción de los nutrientes en el tracto intestinal y pérdida de peso. La población infantil es el sector más afectado ya que la falta de nutrientes retarda el crecimiento y su desarrollo intelectual. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se reportan 300 millones de casos de giardiasis anualmente, principalmente en países en vías de desarrollo de zonas de África, Asia y América Latina. En México, la giardiasis es la segunda causa de infecciones intestinales causada por protozoarios y/o helmintos.

El metronidazol es el fármaco de elección usado desde hace más de 40 años contra la giardiasis; sin embargo, presenta efectos adversos que impiden se complete con el tratamiento; por tal motivo los reportes de cepas resistentes ha ido en aumento. Por lo que se destaca la urgente necesidad de desarrollar nuevos y eficaces fármacos antiprotozoarios, especialmente giardicidas.

En los últimos años, los métodos computacionales han tomado una gran importancia en el estudio y diseño de fármacos. Estas metodologías, sin duda, son hoy en día una herramienta muy importante para dirigir la búsqueda de nuevos fármacos de una manera eficiente.

Por otra parte, diversos grupos de investigación se han enfocado a encontrar blancos terapéuticos a nivel molecular, especialmente de las vías metabólicas, para el desarrollo de nuevos fármacos. El metabolismo del aminoácido arginina, por la vía Arginina Dehidrolasa, en *Giardia* muestra ser un ser una alternativa para el diseño de fármacos giardicidas; además de que esta enzima es exclusiva de *Giardia*. La enzima Arginina deiminasa (ADI) es la primera de tres enzimas involucradas en el metabolismo de arginina para la obtención de energía. La ADI también participa en la evasión del sistema inmune y en el proceso de enquistación. A pesar de su importancia, la estructura tridimensional de la ADI no se ha podido obtener, por lo que no hay reportes de su estructura cristalográfica en las bases de datos especializadas.

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en la síntesis de derivados del bencimidazol como agentes antiprotozoarios y en su efecto sobre la estructura de algunos parásitos. Estudios de proteómica realizados en *Giardia* de compuestos obtenidos por nuestro grupo muestran que, entre otras enzimas, la expresión de la ADI se ve afectada por algunos

bencimidazoles, por ejemplo el compuesto CMC20 que además resultó ser potente giardicida en los ensayos in vitro, lo que parece indicar que estos compuestos inhiben su función.

Considerando la problemática que representa la giardiasis en el mundo y el potencial que ofrece la enzima ADI para el diseño de fármacos giardicidas, en este trabajo se usaron herramientas computacionales de modelado por homología para proponer un modelo de la estructura tridimensional de la enzima ADI de *G. intestinalis*; así mismo, se evaluó la capacidad de que la ADI fuese una diana farmacológica *druggable* a la cual se puedan unir moléculas que pueden alterar su función. Mediante estudios de acoplamiento molecular o *docking* se determinó el sitio de unión y las interacciones a nivel molecular de compuestos bencimidazólicos en la enzima. Esto llevó al diseño de nuevos inhibidores, a partir de modificaciones moleculares y por acoplamiento molecular, los cuales presentaron en algunos casos mayor afinidad por la enzima.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de la giardiasis

La giardiasis es una de las infecciones intestinales causadas por uno de los protozoarios más comunes en el mundo, siendo el agente etiológico de la infección el protozoario flagelado *Giardia intestinalis* (sin. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*). Se estima se presentan 300 millones de casos de la infección cada año, frecuentemente en países en vías de desarrollo y en menor medida en países industrializados.¹ En países en vías de desarrollo la prevalencia de la giardiasis es ~20%, comparado con los países industrializados donde la prevalencia es de ~5%, asociándose al flujo migratorio, viajes y brotes transmitidos por agua contaminada; adicional a esto, los desastres naturales, crisis humanitarias, guerras y pobres condiciones higiénicas facilitan el contagio.²⁻⁴

En lo que respecta a México, la Secretaría de Salud (SSA) tiene catalogada a la giardiasis como la segunda causa de infecciones intestinales causada por protozoarios.⁵ La morbilidad en la población infantil, particularmente entre 1-4 años, tiene una incidencia de >200 casos/100 000 habitantes; el resto de la población tiene tasas de incidencia <100/100 000 habitantes.⁶

Debido a la escasez de suministro de agua potable especialmente en las zonas marginadas por la pobreza, por la guerra, los desastres naturales, y, aunado al fenómeno de la globalización, la prevalencia de las enfermedades diarreicas, incluida la giardiasis, parece continuar. Por otro lado, hasta ahora no hay vacunas para prevenir las infecciones parasitarias y el desarrollo de fármacos antiparasitarios ha sido poco efectivo debido a que hay pocos incentivos comerciales para la producción de medicamentos que son requeridos principalmente en los países en vías de desarrollo. Esta problemática hace importante que los grupos de investigación continúen con la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento para la disminución de las parasitosis intestinales aumentando con ello el índice de supervivencia infantil, propiciando un mejor desarrollo cognitivo y corporal de los niños en los países en desarrollo.

2.2. *Giardia intestinalis*

2.2.1. Ciclo de vida

Giardia es un organismo que presenta dos formas o estadios en su ciclo biológico: el quiste que es la forma latente responsable de la transmisión de la giardiasis y el trofozoíto que es la

forma infectiva del protozoo. La infección se transmite por la ingesta de agua o comida contaminada con quistes; o bien, vía la transmisión de persona a persona. Se requieren de 10-100 quistes para iniciar la infección, haciendo a la giardiasis una infección altamente contagiosa.⁷ En el estómago, por exposición a los ácidos gástricos y enzimas pancreáticas, el quiste se convierte en trofozoíto en un proceso conocido como exquistamiento. Cada quiste genera dos trofozoítos. En el intestino delgado, los trofozoítos se multiplican por división binaria invadiendo el tejido epitelial del intestino. Cuando los trofozoítos pasan al intestino grueso se transforman en quistes, los cuales son expulsados en las heces.^{8,9}

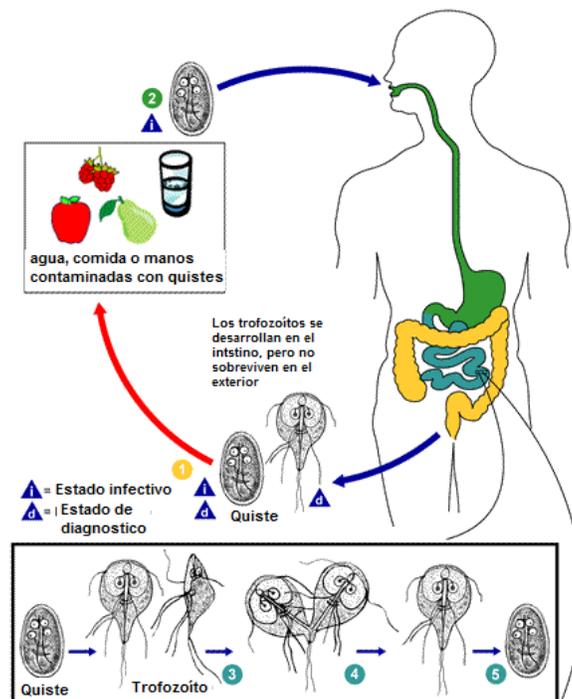


Figura 1. Ciclo biológico de *G. intestinalis* y estadios que presenta el protozoo en su desarrollo.¹⁰

2.2.2. Trofozoíto

El trofozoíto de *G. intestinalis* tiene una longitud de 12-15 μm , unicelular y dinucleado. En la parte lateral del protozoo presenta flagelos, los cuales le permiten moverse e invadir distintas zonas del intestino delgado. La característica estructural más importante en *Giardia* es el disco de adhesión que le permite adherirse al hospedero y obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. En el ambiente externo al hospedero, el trofozoíto es muy susceptible a las condiciones del medio y no puede desarrollarse. En las heces diarreicas es común encontrar trofozoítos; sin embargo, éstos no tienen la capacidad de infectar a otros hospederos.¹¹

2.2.3. Quiste

El quiste es el responsable de la transmisión de la giardiasis cuando se ingiere en el agua o comida contaminadas. Es resistente a las condiciones externas por días o semanas. Tiene un diámetro aproximado 7-10 μm y está cubierto por una capa interna membranosa y una externa filamentosa que le brinda protección.¹²

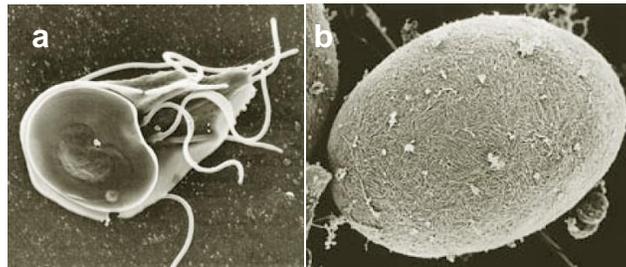


Figura 2. Estadios de *G. intestinalis* durante su ciclo de vida. (a) trofozoíto, (b) quiste.

2.2.4. Metabolismo

El metabolismo de *G. intestinalis* es fermentativo. El protozooario vive en un ambiente con condiciones bajas de oxígeno, por lo que la fosforilación oxidativa vinculada a la cadena respiratoria no está presente como una fuente importante de obtención de energía.^{13,14} La glicólisis y la vía de la arginina dehidrolasa son la fuente principal de obtención de energía en forma de ATP.¹⁵

2.2.4.1. Metabolismo de carbohidratos

La glucosa no es oxidada hasta CO_2 y agua en este protozooario; sin embargo, los productos parciales del catabolismo de la glucosa, como son acetato, etanol, CO_2 y alanina, se producen dependiendo de las concentraciones de oxígeno. En ausencia de oxígeno, la alanina es el principal producto final generado. Cuando las concentraciones de O_2 son moderadas ($< 25 \mu\text{M}$), la producción de alanina desaparece, mientras que la formación de etanol se incrementa. Finalmente, cuando las concentraciones de oxígeno son de $45 \mu\text{M}$, la alanina y el etanol se consumen, produciendo CO_2 y acetato.¹⁶⁻¹⁸ En el intestino las condiciones de oxígeno oscilan entre $0-60 \mu\text{M}$.⁹

La glucosa promueve el crecimiento de los trofozoítos, pero no es esencial. Cuando se reemplaza la glucosa por otros monosacáridos, como fructosa o ribosa, se tiene el mismo efecto de crecimiento;^{18,19} por lo que otras fuentes de carbono que contribuyen al metabolismo energético provienen probablemente del metabolismo de aminoácidos y proteínas.

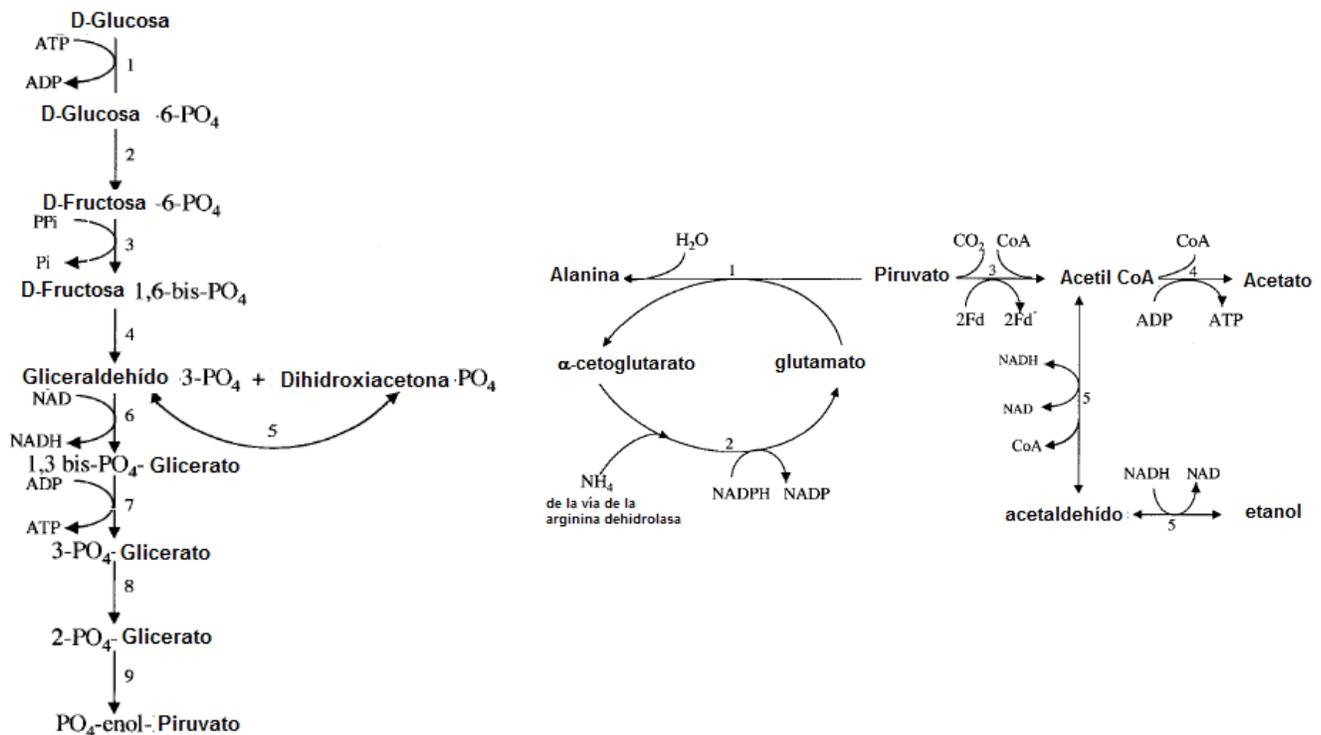


Figura 3. Metabolismo de la glucosa a fosfoenolpiruvato y productos parciales del metabolismo fermentativo.

2.2.4.2. Metabolismo de lípidos

Los trofozoítos de *G. intestinalis* no tienen la capacidad sintetizar *de novo* ácidos grasos de cadena larga.²⁰ Los ácidos grasos libres son tóxicos para los trofozoítos, con una DL₅₀ de 2 a 12 μM. Sin embargo, los ácidos grasos de la dieta junto con los ácidos biliares promueven la enquistación.^{21,22}

2.2.4.3. Metabolismo de aminoácidos

La producción de energía *Giardia* depende en mayor medida del metabolismo de aminoácidos. El aminoácido alanina es el producto principal generado del metabolismo, por lo que altos niveles de alanina son esenciales para la vida del trofozoíto.^{23,24}

Por otra parte, el metabolismo de la arginina, por la vía de la arginina dehidrolada (ADH), tiene un rol muy importante y significativo en la producción de energía, ya que se producen de 7-8 veces más energía por esta vía que por el metabolismo de la glucosa.²⁵

2.3. Sintomatología de la giardiasis

La mayoría de los pacientes infectados con *G. intestinalis* son asintomáticos. Sin embargo, los síntomas clínicos típicos comienzan de 1-3 semanas después de la ingesta de quistes, los cuales suelen ser diarrea, dolor abdominal, náuseas, flatulencias, heces grasosas y

fatiga; otros síntomas incluyen anorexia y pérdida de peso.²⁶ El vómito y fiebre son poco comunes, y la presencia de sangre en heces es poco frecuente. Cuando la infección es crónica, hay mala absorción de grasas y carbohidratos, así como de vitaminas A y B₁₂ principalmente.²⁸

2.4. Tratamientos

En la década entre 1950 y 1960 se introdujo al mercado un grupo de compuestos conocido como los nitroheterociclos, fármacos efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram positivas, gram negativas y protozoarios patógenos.²⁸ Esta clase de fármacos incluyen al metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol. El metronidazol fue el primer fármaco nitroheterociclo reportado usado para el tratamiento de la giardiasis.²⁹ Desde su introducción al mercado en 1962, el metronidazol se convirtió en el tratamiento de elección para la terapia contra esta protozoosis.

El tinidazol, ornidazol y secnidazol son fármacos con una actividad similar al metronidazol; sin embargo, presentan biodisponibilidad y tiempos de vida media mejores que metronidazol, por lo que pueden ser tomados en una sola dosis. A pesar de esto, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) no tiene la aprobación para su uso por lo que no se encuentran disponibles, al menos en los Estados Unidos de América (EUA).³⁰

La furazolidona es un fármaco del tipo de los nitrofuranos con un amplio espectro antibacterial. En 1962 se introdujo para el tratamiento de la giardiasis con una efectividad menor a la del metronidazol.³¹ Es de los pocos fármacos aprobados para su uso en los EUA.^{30,32}

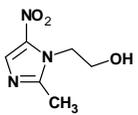
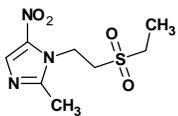
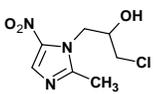
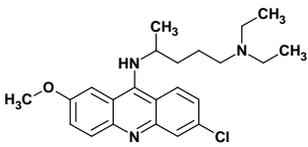
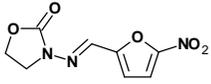
De esta familia, la nitaxozanida es uno de los fármacos más recientes en el mercado tras más de 40 años de la falta de introducción de nuevos tratamientos. Es un fármaco del tipo nitrotiazol benzamida con una alta y amplia efectividad contra infecciones intestinales causadas por protozoarios y helmintos. Se introdujo al mercado Latinoamericano en 1996 y en 2002 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la diarrea causada por *G. intestinalis*.^{30,33}

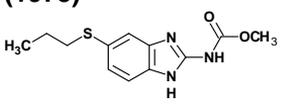
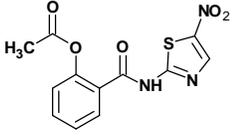
Otros compuestos que se han empleado en la quimioterapia son la quinacrina, una acridina, que se introdujo inicialmente para el tratamiento de la malaria en 1930. Su efectividad contra *G. intestinalis* era buena (> 90%). A pesar de ello, su venta era limitada y fue discontinuada en 1992.³⁰ La Paromomicina es un aminoglucósido que se aisló en 1956, indicado

inicialmente para el tratamiento de infecciones causadas por *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. Es un fármaco que se absorbe poco en el intestino. Su efectividad es menor que los fármacos antes mencionados debido a su baja absorción.^{30,34}

El albendazol y mebendazol son dos fármacos bencimidazólicos usados como antihelmínticos que a partir de la década de 1990 se propusieron para el tratamiento de la giardiasis.^{35,37} Este tipo de fármacos son 30-50 veces más efectivos que el metronidazol.³⁸

Tabla 1. Dosis recomendada y efectos adversos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la giardiasis³⁰

Fármaco	Dosis Adulto (A), Pediátrico (P)	Efectos adversos	Nota
Metronidazol (1962) 	A: 250 mg, 5-7 días P: 5 mg/kg, 5-7 días	Dolor de cabeza, vértigo, náuseas, sabor metálico, urticaria. Otros síntomas menos comunes incluyen	No aprobado para su indicación por la FDA
Tinidazol (1962) 	A: 2 g, dosis única P: 50 mg/kg, dosis única (max. 2 g)	pancreatitis, toxicidad en sistema nervioso central. Carcinogénico y mutagénico en duda.	No está disponible en los EUA
Ornidazol (1962) 	A: 2 g, dosis única P: 40-50 mg/kg dosis única (max. 2 g)		No está disponible en los EUA
Quinacrina (1956) 	A: 100 mg, 5-7 días P: 2 mg/kg, 7 días	Náuseas y vómito, dolor de cabeza, coloración amarilla en piel y mucosas. Psicosis tóxica.	No está disponible en los EUA
Furazolidona (1962) 	A: 100 mg, 7-10 días P: 2 mg/kg, 10 días	Náuseas, vómito, diarrea. Coloración café en orina. Carcinogénico en duda.	Disponible en EUA en forma de suspensión
Paromomicina (1956)	A: 500 mg, 5-10 días P: 30 mg/kg/días en 3 dosis, 5-10 días	Ototóxico y nefrotóxico en administración sistémica.	No aprobado para su indicación por la FDA

<p>Albendazol (1973)</p> 	<p>A: 400 mg, 5 días P: 15 mg/kg/day, 5 –7 días (max. 400 mg)</p>	<p>Anorexia y constipación. Neutropenia reversible y función elevada del hígado.</p>	<p>No aprobado para su indicación por la FDA</p>
<p>Nitazoxanida (1996)</p> 	<p>A: 500 mg, 3 días P: 100-200 mg, 3 días</p>	<p>Dolor abdominal, náuseas, diarrea.</p>	<p>Aprobado para su uso por la FDA</p>

2.5. Antecedentes del proyecto

2.5.1. Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH)

Esta vía metabólica se encuentra en organismos procariontes, pero sólo se ha reportado en algunos organismos eucariontes como *Trichomonas vaginalis*, *G. intestinalis* y algunas algas verdes. Se ha demostrado que el incremento de las concentraciones de arginina en medios de cultivo acelera el crecimiento de los trofozoítos de *G. intestinalis*.³⁹

En la vía metabólica de la ADH participan tres enzimas que transforman a la arginina en ornitina, amoníaco, CO₂ y ATP; estas enzimas son la arginina deiminasa (ADI), ornitina carbamoiltransferasa (OTC) y la carbamato cinasa (CK). La vía de la ADH es la mayor fuente de energía en todos los estados del crecimiento de *G. intestinalis*. La producción de ATP por esta vía es 7-8 veces mayor que la obtenida por la vía de la glucólisis.^{25,40}

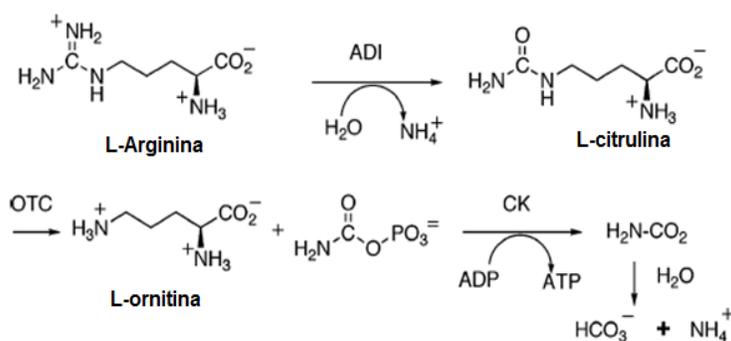


Figura 4. Vía metabólica de la arginina dehidrolasa (ADH).

La arginina es tomada del medio extracelular por un antitransportador arginina-ornitina, en el cual la arginina es introducida al interior de la célula mientras la ornitina es liberada al medio.⁴⁰ Este gradiente elimina la necesidad de utilizar ATP. Sólo una pequeña parte de ornitina es utilizada para la síntesis de poliaminas.

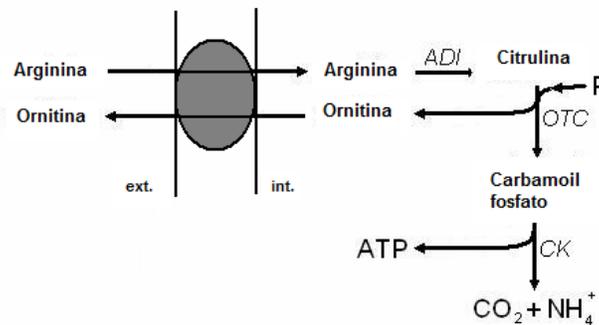


Figura 5. Mecanismo de operación del antitransportador arginina-ornitina para la toma de arginina del medio extracelular con liberación de ornitina sin la utilización de ATP.

Estudios recientes han demostrado que las enzimas ADI y OTC son parte del grupo de 16 proteínas inmunoreactivas durante la infección⁴¹. Además, se ha visto que estas enzimas son liberadas por el protozario al medio extracelular, permitiendo la evasión del sistema inmune facilitando su proliferación.^{42,43}

Los hechos mencionados arriba sugieren que la vía metabólica de la ADH brinda blancos interesantes para el diseño de fármacos giardicidas.⁴²

2.5.2. Arginina deiminasa (ADI)

Como ya se mencionó, la ADI es la primera enzima en la vía de la ADH y cataliza la conversión de arginina a citrulina con liberación de amoníaco. Este tipo de enzima pertenece a la superfamilia de enzimas que metabolizan arginina o sus análogos *N*-metilados. Algunos otros miembros de esta familia de hidrolasas son la peptidilarginina deiminasa (PAD), agmatina deiminasa (AgD) y la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH).⁴⁴

La ADI de *G. intestinalis* es una enzima de 580 aminoácidos (aa) siendo la enzima de mayor tamaño reportada; tiene aproximadamente 145 aa más de extensión en su C-terminal, en comparación con otras ADI reportadas.^{45,46} Estudios de electroforesis y de espectrometría de masas indican que tiene un peso de 64.2 kDa y está presente en forma de dímero.^{46,47} El alineamiento de secuencias con otras enzimas ADI reportadas muestra que el sitio catalítico se encuentra altamente conservado, en donde los aminoácidos del sitio catalítico se identifican como Cys424, His280, Asp175, Glu226 y Asp282. Hasta hoy no se ha logrado obtener una estructura cristalográfica en la enzima.

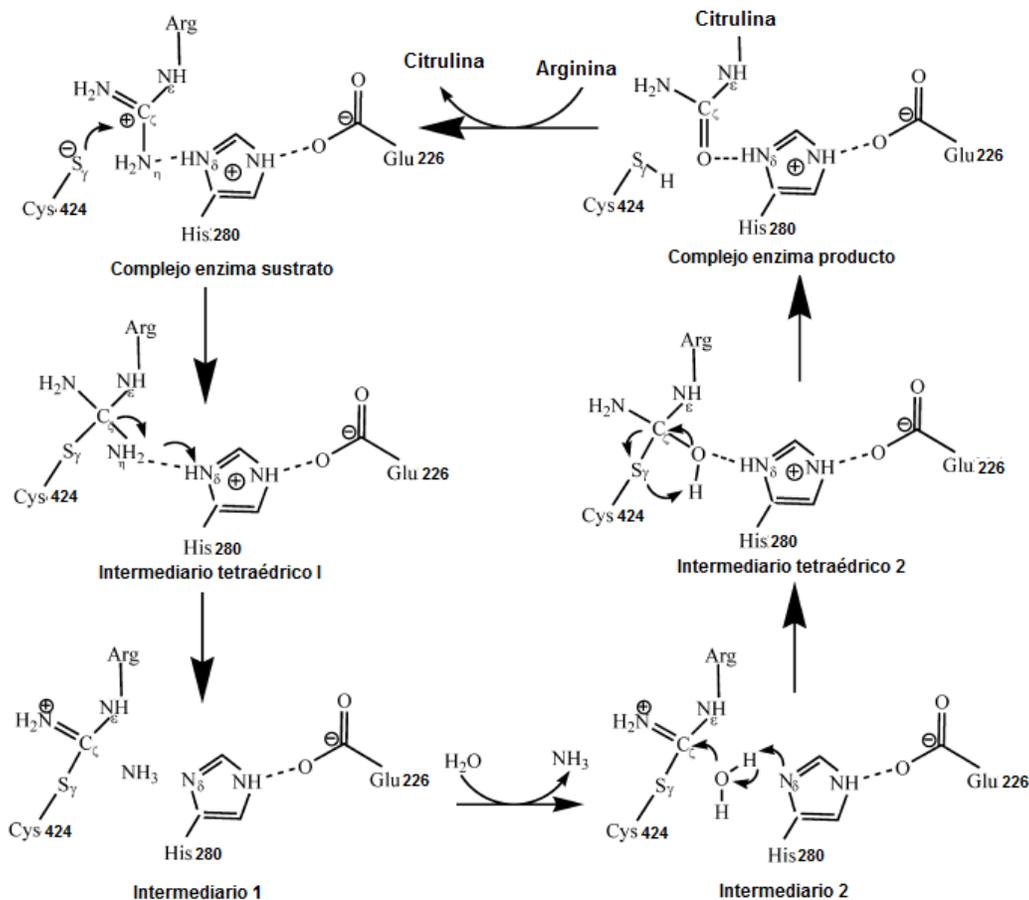


Figura 6. Mecanismo propuesto para la transformación de arginina a citrulina catalizada por ADI. Los aminoácidos que participan en la transformación se determinaron por el alineamiento de secuencias de la ADI de *G. intestinalis* con la de otros organismos.⁴⁶

La importancia que tiene la ADI en la sobrevivencia de *G. intestinalis* es muy importante. Cuando se utilizan nucleótidos antisentido para el silenciamiento del gen de ADI los trofozoítos no se desarrollan.⁴⁷

Además de la importancia que tiene la ADI en la obtención de energía, la evasión del sistema inmune es otra de las funciones vitales que presenta. Cuando el trofozoíto llega al intestino delgado libera las enzimas ADI, OTC y enolasa (enzima que participa en metabolismo de carbohidratos) en las células epiteliales del hospedero; éstas a su vez liberan arginina, como estímulo de la infección, la cual se metaboliza para generar óxido nítrico (NO). El NO es un segundo mensajero que desencadena la cascada de señalización para la producción de citocinas ($\text{IL-1}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$) en la respuesta inmune innata; por lo que, cuando se secreta la ADI la producción de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) en el epitelio se ve disminuida significativamente.

De esta manera, ADI interfiere directamente con la evasión del sistema inmune facilitando la infección.^{41,43,48}

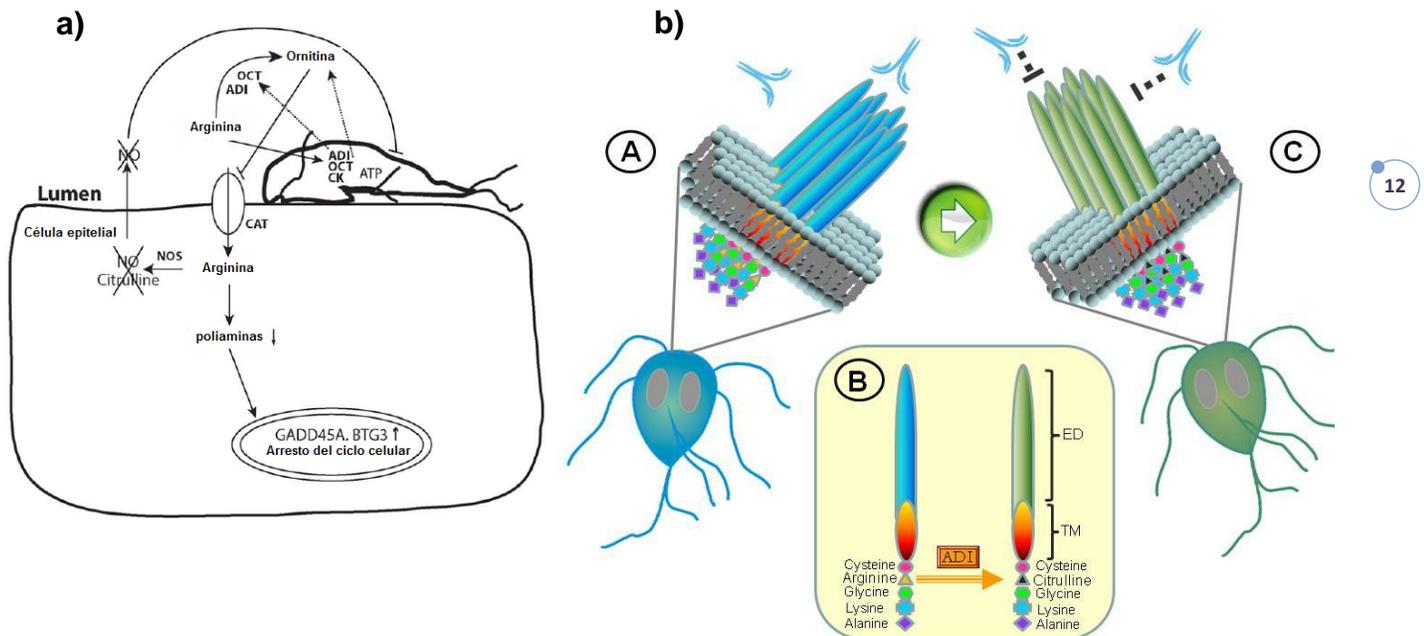


Figura 7. El rol de la arginina y ADI en la infección intestinal. (a) La arginina es tomada del exterior por el trofozoíto y transformada a ornitina NH_3 y CO_2 . Por otra parte, la arginina es degradada extracelularmente por la liberación de ADI y OTC por *Giardia*, disminuyendo la producción de NO lo que permite la evasión de la respuesta inmune. Adicionalmente, la toma de arginina por el trofozoíto causa una disminución en la síntesis de poliaminas de las células epiteliales del intestino, causando arresto celular y apoptosis. (b) Participación de la ADI en la variación antigénica. A) Después de la enquistación una población de los trofozoítos expresan diferentes proteínas de superficie, las cuales son reconocidas por el hospedero generando anticuerpos. B) La ADI convierte la arginina presente en la cola citoplasmática de las proteínas de superficie a citrulina, lo que favorece la variación antigénica. C) Esta modificación genera diferentes proteínas de superficie lo que permite la evasión del sistema inmune humoral.^{43,48}

Adicional a esto, ADI participa en procesos de variación antigénica. En la superficie del trofozoíto las proteínas de superficie son antigénicas, las cuales son reconocidas por el hospedero generando anticuerpos. La ADI modifica la cola hidrofóbica de estas proteínas alterando su estructura, haciéndolas resistentes a enzimas proteolíticas e impidiendo que los anticuerpos se unan a ellas.^{48,49,50}

2.6. Bencimidazoles como alternativa al diseño de fármacos giardicidas

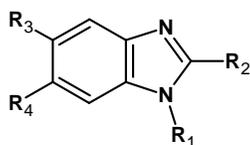
Los bencimidazoles se introdujeron al mercado primeramente para controlar infecciones por nemátodos en animales; su amplio espectro, baja toxicidad y eficacia los hicieron fármacos de elección como antihelmínticos de uso en humanos.⁵¹ El primer bencimidazol que se introdujo para infecciones en humanos fue el tiabendazol en 1961, efectivo pero con muchos efectos adversos. Posteriormente, los bencimidazoles 2-carbamatos de metilo (BC) como el

mebendazol y el albendazol tuvieron un gran éxito debido a que pueden eliminar cestodos y trematodos.⁵² Estos compuestos son muy efectivos, los efectos adversos son mínimos y presentan baja toxicidad, por lo que son de uso común en la clínica para el tratamiento de enfermedades parasitarias. A principio de la década de 1990 se demostró que también los bencimidazoles presentan actividad contra protozoarios.³⁵⁻³⁷

Si bien estos compuestos son efectivos, la baja solubilidad y rápido metabolismo limitan esta efectividad, haciendo que las dosis sean altas y por tiempos prolongados. El mecanismo de acción por el cual actúan los BC es inhibiendo la polimerización de la tubulina en los microtúbulos del parásito generando pérdida de funciones enzimáticas y de movimiento llevando al parásito a la muerte.⁵³ También participan impidiendo la toma de glucosa exógena consumiendo el glucógeno endógeno lo cual consume el ATP producido; y algunos pueden inhibir la enzima fumarato reductasa bloqueando la formación de succinato, el cual es necesario para generar ATP.⁵⁴

El grupo de investigación del laboratorio 122 del departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM, ha sintetizado y evaluado derivados de bencimidazol, no carbamatos y carbamatos, que han sido efectivos en pruebas *in vitro* contra protozoarios, incluyendo *G. intestinalis*.⁵⁵⁻⁵⁷ Muchos de estos compuestos presentaron mayor actividad que los fármacos de elección para el tratamiento de la giardiasis. Dentro de este grupo de compuestos estudiados destacan aquellos que se desarrollaron mediante el método de hibridación molecular, híbridos entre nitrohetociclos y bencimidazoles, de los cuales algunos se muestran en la **Tabla 2.**⁵⁸⁻⁶⁰

Tabla 2. Resultados de actividad biológica de algunos compuestos híbridos sintetizados y de algunos fármacos utilizados para la giardiasis



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	CI ₅₀ (μM) <i>G. intestinalis</i>
RSD8	CH ₃	SCH ₃	Cl	H	0.122
JGM1	H	CF ₃	NTAC ¹	Cl	0.203
JGM2	CH ₃	CF ₃	NTAC	Cl	0.021
JGM3	CH ₃	CF ₃	Cl	NTAC	0.021
OS11	CH ₃	NHCOOCH ₃	NTAC	Cl	0.1168
OS14	CH ₃	NHCOOCH ₃	Cl	NTAC	0.0413
CMC12	H	SCH ₃	NTAC	Cl	0.005
CMC19	CH ₃	SCH ₃	NTAC	Cl	0.010
CMC20	CH ₃	SCH ₃	Cl	NTAC	0.005
ABZ					0.037
MTZ					1.228
NTZ					0.013

¹NTAC: 5-nitro-1,3-tiazol-2-il-aminocarbonilo

2.7. Proteómica del compuesto CMC20

Los resultados de los ensayos *in vitro* mostraron que el compuesto CMC20 fue uno de los compuesto más activos contra *G. intestinalis*. Tras la exposición al tratamiento con este compuesto *G. intestinalis* pierde su morfología característica, hay pérdida de los flagelos así como de la membrana, mientras que el disco de adhesión sufre un daño importante. Dado que CMC20 es un híbrido entre un nitroheterociclo y núcleo de bencimidazol se esperaría que el daño fuese similar al causado por el ABZ y NTZ, pero esto no fue del todo cierto, lo que permite pensar que el mecanismo de acción de este compuesto es diferente.⁵⁸

Méndez-Cuesta C. reporta en su tesis de maestría el estudio de la proteómica de *G. intestinalis* tratada con CMC20, así como con los fármacos de referencia, para determinar el efecto a nivel macromolecular de estos compuesto en el protozario y con ello tener una aproximación sobre el posible mecanismo de acción.⁵⁸

El análisis electroforético en 2D de las proteínas del trofozoíto de *G. intestinalis* en ausencia del compuesto CMC20 y con el mismo, permitió identificar la modificación en la expresión de algunas proteínas las cuales fueron identificadas por espectrometría de masas, las proteínas identificadas se muestran en la **Tabla 3**. Se identificó un aumento en la producción de proteínas destoxicantes como la tiorredoxin peroxidasa, la cual elimina especies reactivas de oxígeno (ROS) que son peligrosas para el protozoario. Por otra parte, hay una disminución significativa en la expresión de proteínas estructurales como la β -tubulina y del metabolismo, entre las cuales se identificó a la ADI, esto genera que el protozoario muera por la falta de soporte estructural y/o por la falta de obtención de energía.

Tabla 3. Enzimas que se observaron alteradas en su expresión en trofozoítos de *G. intestinalis* al exponerse con el compuesto CMC20⁵⁸

Proteína	Peso molecular determinado	Expresión	Función
β -tubulina	50701	Disminuye	Estructura del citoesqueleto
Enolasa	48816	Disminuye	Enzima del metabolismo de la glucosa. Cataliza la conversión de glicerol 2-fosfato a fosfoenolpiruvato
UPL-1	34717	Disminuye	Enzima que incorpora uridina exógena
Arginina deiminasa	65003	Disminuye	Enzima de la ruta de la ADH. Cataliza la conversión de arginina a citrulina
Factor de elongación de traducción	45815	Disminuye	Factor de elongación de la traducción
Tiorredoxin peroxidasa	22924	Aumenta	Protección contra ROS
α -giardina	33513	Disminuye	Proteína estructural asociada a membrana y pared del quiste
GLP	65548	Disminuye	Proteína hipotética
Proteína asociada a axonema	116239	Disminuye	Proteína estructural de flagelos
Factor de elongación 2	91395	Aumenta	Síntesis de proteínas
SALP-1	29866	Aumenta	Proteína estructural asociada al cuerpo basal protozoarios flagelados

Con este resultado se sugiere que el compuesto CMC20 puede ejercer su acción al unirse a las proteínas que se reportan disminuidas, generando un cambio conformacional que las inactiva y por ende son eliminadas.

Adicional a este resultado, trabajos realizados por nuestro grupo de investigación reportan que la disminución de la expresión de ADI se lleva a cabo por efecto del compuesto sobre la enzima y no en el proceso de la síntesis de la misma, ya que mediante estudios de RT-PCR el compuesto no interfiere con la expresión de la enzima a nivel traduccional, por lo que la acción del compuesto es a nivel postraduccional y no a nivel de la expresión de la enzima.

2.8. Modelado por homología

El modelado por homología es una herramienta computacional usada para predecir modelos de estructuras tridimensionales de proteínas para proporcionar información sobre la estructura y función de éstas. Dentro de las estrategias para la predicción de estructuras se encuentran: el modelado *de novo* el cual consiste en simular el plegamiento de una secuencia de aminoácidos a partir de implementar métodos estadísticos que predicen las conformaciones que adoptan los aminoácidos en la secuencia; y el modelado comparativo el cual genera modelos a partir de estructuras resueltas experimentalmente las cuales se utilizan como *plantilla (template)* para predecir el plegamiento de la secuencia en cuestión, con base en el principio de que secuencias similares tienen estructuras similares.^{61,62} El procedimiento del modelado por homología se ilustra en la **Figura 8**, el cual consiste en los siguientes pasos: (1) la identificación de una estructura(s) tridimensional conocida relacionada a la secuencia para que sirva de *plantilla*, (2) alineamiento de secuencias entre la secuencia problema y la secuencia(s) *plantilla*, (3) construcción del modelo con base en el alineamiento y estructura de la estructura *plantilla*, (4) refinación/validación/evaluación del modelo generado.

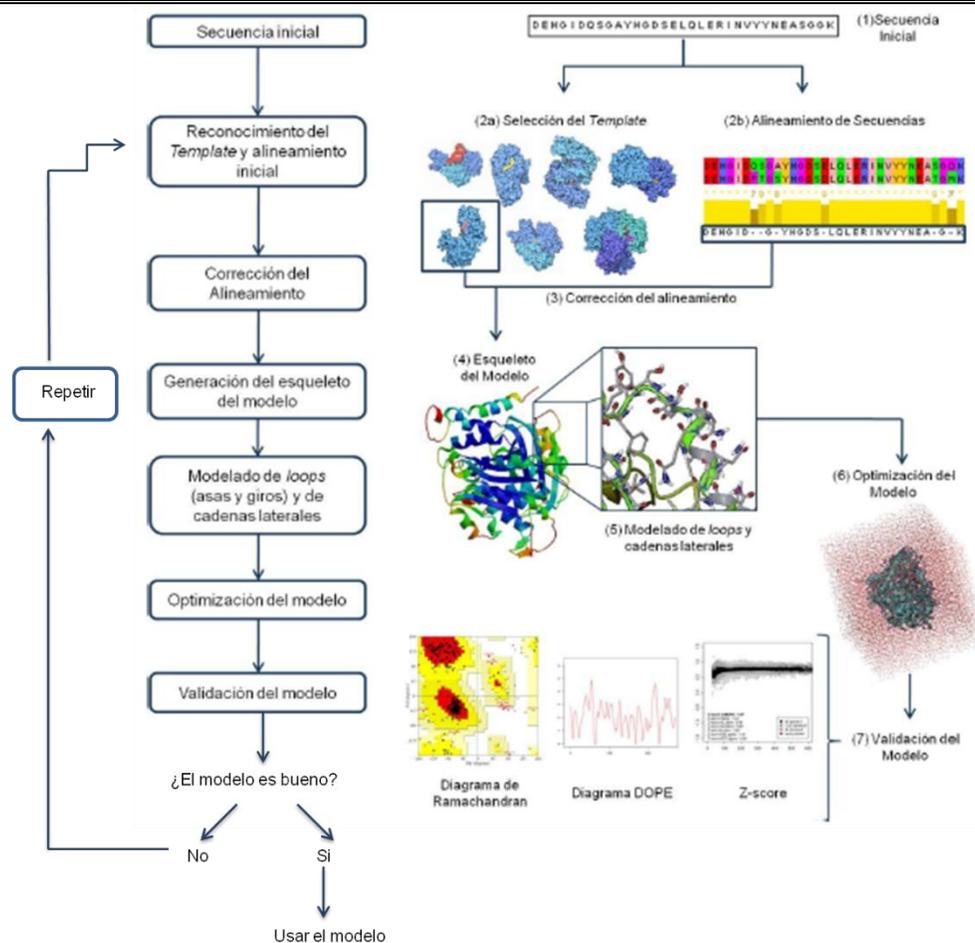


Figura 8. Metodología empleada para el modelado por homología.^{63,64}

La construcción de modelos tiene aplicaciones en el desarrollo de fármacos, ya que se pueden emplear para estudiar la función y el mecanismo en una proteína, valorar el concepto *druggability*, diseño de experimentos de mutagénesis, estudios de *high-throughput docking* e identificación y optimización de compuestos líder (*lead*).⁶²

2.9. Acoplamiento molecular (*docking*)

El acoplamiento molecular es un método computacional empleado para simular la unión de un ligando o ligandos en una macromolécula-diana determinando la conformación preferencial que adopta el ligando en la zona de evaluación del receptor. Esta metodología se emplea cuando se tiene conocimiento de la estructura de la macromolécula-diana, usualmente obtenida por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o bien al predecir su estructura mediante modelado por homología.^{65,66} Una vez que se conoce la orientación que adopta el ligando en el sitio de unión, se puede estimar la energía de unión del complejo formado. 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 desolvatación y factores entrópicos y traslacionales.

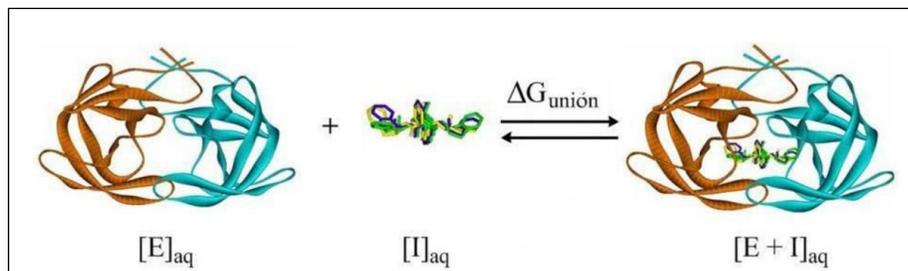


Figura 9. Representación del fundamento de *docking*, en el que un inhibidor (I) se une a una enzima (E), formando el complejo enzima-inhibidor (E+I).⁶⁵

Esta técnica ha adquirido relevancia en la búsqueda de nuevas moléculas para el desarrollo de fármacos, ya que se pueden evaluar miles o millones de compuesto *in silico* obteniendo *hits* computacionales, a este tipo de evaluaciones se le conoce como *virtual screening*.⁶⁷⁻⁶⁹ La aplicación de “filtros”, como criterios estándar o de importancia biológica atribuidos a los fármacos, permiten mejorar la búsqueda para la selección de los *hits* los cuales pueden ser candidatos para pruebas subsecuentes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima arginina deiminasa (ADI) muestra ser un blanco potencial para el diseño de moléculas que impidan el desarrollo del protozooario *Giardia intestinales*, ya que participa en procesos fundamentales tales como la obtención de energía, evasión del sistema inmune y de enquistamiento. Resultados de estudios de proteómica en Giardias tratadas con algunos derivados de bencimidazol, que resultaron ser muy activos contra el parásito *in vitro*, en especial con el compuesto CMC20, muestran disminución en la expresión de la enzima ADI. Por otro lado, estudios de RT-PCR indican que el efecto de CMC20 sobre la expresión de la enzima no es a nivel de ARNm, sino sobre la enzima ya sintetizada, lo que sugiere que dichos compuestos se unen a la enzima y por consiguiente afectarían la función de la misma. Cabe mencionar que la estructura tridimensional de la enzima ADI no se ha conseguido por ningún método experimental o teórico, lo que impide identificar el sitio de unión de estos compuestos a la enzima y por ende dificulta el diseño de nuevos compuestos.

El modelado por homología es una alternativa computacional que se puede utilizar para determinar una estructura tridimensional de la enzima ADI, lo que a su vez permitirá conocer el sitio de unión de derivados del bencimidazol y establecer las interacciones a nivel molecular para proponer nuevos compuestos inhibidores de la enzima.

4. HIPÓTESIS

La enzima arginina deiminasa de *Giardia intestinalis* se podrá modelar a partir de estructuras cristalográficas ya reportadas de otras especies, mediante técnicas computacionales como el modelado por homología y por dinámica molecular para evaluar la estabilidad del modelo.

Si los compuestos bencimidazólicos se unen a la enzima en el sitio activo o catalítico, se espera que los estudios de acoplamiento molecular con el modelo de la enzima generada por homología muestren la naturaleza de las interacciones. La información generada, aunada a la metodología de *virtual screening*, llevará a moléculas, ya reportadas en bases de datos, que presenten buena afinidad por el sitio activo y que puedan inhibir la función enzimática.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Generar un modelo teórico de la estructura tridimensional del monómero y dímero de la enzima arginina deiminasa (ADI) de *Giardia intestinalis* que permita identificar el posible sitio de unión de compuestos bencimidazólicos a la enzima, que brinde información y pueda ser usado para el diseño de nuevos compuestos que inhiban la función enzimática.

5.2. Objetivos particulares

- Aplicar técnicas bioinformáticas para encontrar y comparar secuencias de aminoácidos de la enzima ADI con otras proteínas con función y/o estructura relacionada.
- Generar y validar modelos de la estructura tridimensional de la ADI mediante el uso de metodologías computacionales de predicción de estructuras de proteínas implementadas en distintos servidores.
- Determinar la capacidad de que la ADI pueda ser un blanco farmacológico a la cual se puedan unir moléculas que alteren su función con el fin de determinar si es un blanco para el diseño de fármacos (*druggable*).
- Con el modelo de ADI de mejor calidad, realizar estudios de acoplamiento molecular (*docking*) de derivados bencimidazólicos para identificar el sitio de unión de estos compuestos en la enzima.
- Predecir el comportamiento de los mejores compuestos en el sitio de unión mediante dinámica molecular.
- Proponer modificaciones estructurales a los derivados bencimidazólicos para generar nuevos compuestos que presenten una mejor afinidad por la ADI.
- Identificar mediante *virtual screening* de bibliotecas públicas disponibles otros compuestos que presenten afinidad por la ADI.

6. METODOLOGÍA

6.1. Identificación y alineamiento de secuencias

La secuencia de aminoácidos de ADI de *G. intestinalis* se obtuvo de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁷⁰ con clave de acceso AAC06116.⁴⁵ La secuencia se almacenó en formato FASTA para posteriormente realizar la búsqueda de secuencias homólogas.

La búsqueda de secuencias homólogas de la enzima con estructuras cristalográficas reportadas para otras especies se realizó usando los servidores Bioinformatics Toolkit (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/>),⁷¹ PDB/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)⁷² y EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>).⁷³ Posteriormente, se realizó un alineamiento de secuencias múltiple con el servidor Clustal-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).⁷⁴

6.2. Modelado por homología

En un primer estudio se utilizó la secuencia completa de 580 aminoácidos. La construcción de los modelos se realizó utilizando los servidores en línea SWISSMODEL,⁷⁵ Phyre2,^{76,77} I-TASSER,^{78,79} Robetta⁸⁰ y el programa *Modeller 9v10*.^{81,82}

Posteriormente, debido a que algunos servidores no generaron estructuras con la secuencia completa, para tener mayor certeza en los modelos generados se utilizó una secuencia hasta el aminoácido 435 de la enzima ADI. Además, la secuencia de la estructura *plantilla* sólo contiene 420 aminoácidos. Para la construcción de los modelos se utilizaron los servidores en línea SWISSMODEL, Phyre2, I-TASSER, 3D-JIGSAW⁸³ y el programa *Modeller 9v10* para la construcción de los modelos.

La estructura de todos los modelos generados se analizó y corrigió con las herramientas *Complete structure* y *Remove bumps from a structure* presentes en el servidor WHAT IF.⁸⁴

6.3. Validación de los modelos

Para cada uno de los modelos resultantes se optimizó su estructura por minimización de energía, utilizando el programa *GROMACS 4.5.3*^{85,86} empleando el campo de fuerza GROMOS96 43a1.^{87,88} Las estructuras se analizaron con el programa *PyMOL 0.99*.⁸⁹

Optimizada la geometría de los modelos, cada estructura se evaluó con las herramientas PROCHECK,⁹⁰ WHATCHECK y PROMOTIF⁹¹ presentes en el servidor SWISSMODEL, esto para determinar la calidad de los modelos generados.

6.4. Determinación de la estructura secundaria

Para determinar la estructura secundaria de la enzima ADI se utilizaron los servidores: PCI-SS,⁹² APSSP2,⁹³ BCL-Jufo y BCL-Jufo9D,⁹⁴ SCRATCH SSpro y SSpro8.0,⁹⁵ MINNOU,⁹⁶ SOMPA,⁹⁷ GOR V,⁹⁸ NetSurfP,⁹⁹ PROF,¹⁰⁰ HNN,¹⁰¹ MLRC,¹⁰² DPM,¹⁰³ DSC,¹⁰⁴ y PREDATOR.¹⁰⁵ La estructura secundaria se definió a partir de todos los resultados obtenidos de cada servidor mediante consenso.

6.5. Estructura del dímero de Arginina deiminasa de *G. intestinalis*

El modelo con la mejor calidad se seleccionó para generar la estructura del dímero de ADI. La estructura del dímero se generó utilizando en programa *PyMOL 0.99*, utilizándose como estructura *plantilla* el dímero de ADI de *Mycoplasma arginini* (PDB ID: 1S9R).¹⁰⁶ Luego se realizó la optimización de la estructura por minimización de energía con el programa *GROMACS 4.5.3* empleando el campo de fuerza GROMOS96 43a1 para eliminar los choques estéricos y conformaciones no favorables, especialmente de los aminoácidos presentes en la interfaz del dímero. La estructura optimizada se utilizó para los estudios de *docking*.

6.6. Estudio de acoplamiento molecular

6.6.1. Preparación de la proteína

El modelo del dímero de ADI generado por homología se seleccionó para realizar los cálculos en el estudio de acoplamiento molecular. La estructura de la proteína se preparó con la interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4*,¹⁰⁷ donde sólo se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno y se corrigieron las cargas de las histidinas presentes en la proteína a su estado neutro.

6.6.2. Preparación de los ligandos

Los compuestos que se evaluaron en los estudios de proteómica y los diseñados posteriormente se construyeron en el programa *Spartan 10*,¹⁰⁸ su geometría se optimizó empleando mecánica molecular usando el campo de fuerza MMFF94x. Posteriormente, mediante el programa *Autodock 4.2* y su interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4* (ADT) los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus correspondientes carbonos y automáticamente se detectaron los centros de torsión y los enlaces rotables, marcándose como excepción los enlaces carbono-nitrógeno (N-CO) de amida, que se consideraron rígidos.

6.6.3. Acoplamiento molecular

Con ADT, usando el programa auxiliar *Autogrid 4.0*, se generó la región de búsqueda (*grid*) la cual se posicionó en el centro de la interfaz del dímero abarcando la región de ambos sitios catalíticos de la enzima. La región de búsqueda tuvo las siguientes dimensiones: 60x40x40 Å.

La búsqueda de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó usando el programa *AutoDock 4.2*, empleando un algoritmo genético del tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150, 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables (menor $\Delta G_{\text{unión}}$) del conjunto de conformaciones más abundante (mayor clúster). Los resultados se visualizaron con *PyMOL 0.99*.

6.7. Dinámica molecular

Los estudios de dinámica molecular se efectuaron en la estructura del dímero para evaluar su estabilidad. Por otra parte se seleccionaron los mejores complejos enzima-ligando derivados del *docking* con el fin de determinar la estabilidad de ligando en el sitio de unión. Los estudios de dinámica molecular se efectuaron con el programa *GROMACS 4.5.3*.

Para efectuar la dinámica molecular con ligandos, los parámetros de geometría y tipo de átomos de éstos se calcularon con el servidor CCPN NMR ACPYPE.¹⁰⁹ El dímero y sus complejos enzima-ligando derivados del *docking* se solvataron 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 llevarlo a una concentración 0.15 M. Todas las simulaciones se realizaron 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 AMBER99SB-ILDN,¹¹⁰ 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, para el dímero de ADI sin ligandos se efectuó una simulación de dinámica molecular de 35 ns. Para los complejos enzima-ligando se determinó un tiempo de simulación de 5 ns para evaluar el comportamiento del ligando en el sitio y su

correlación con los resultados del acoplamiento molecular. El RMDS, formación de puentes de hidrógeno, y la energía libre de unión de los complejos se analizó durante el estudio de dinámica. El cálculo de la energía libre de unión se determinó con el método de Energía de Interacción Lineal (LIE) mediante la ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \alpha[(V_{\text{LJ}})_{\text{bound}} - (V_{\text{LJ}})_{\text{free}}] + \beta[(V_{\text{CL}})_{\text{bound}} - (V_{\text{CL}})_{\text{free}}] + \gamma$$

Donde $(V_{\text{LJ}})_{\text{bound}}$ es la energía promedio de Lennard-Jones para la interacción proteína-ligando; $(V_{\text{LJ}})_{\text{free}}$ es la energía promedio de Lennard-Jones para la interacción agua-ligando; $(V_{\text{CL}})_{\text{bound}}$ es la energía electrostática promedio para la interacción proteína-ligando; $(V_{\text{CL}})_{\text{free}}$ es la energía electrostática promedio para la interacción agua-ligando; α , β , γ son los coeficiente de LIE. Para moléculas pequeñas $\alpha=0.18$, $\beta=0.50$, $\gamma=0.00$.¹¹¹

6.8. Diseño de nuevos compuestos

Con base en los resultados obtenidos del acoplamiento molecular de los compuestos que presentaron efecto sobre la expresión de proteínas de *Giardia*, en los estudios de proteómica, se analizó el modo de unión que éstos presentaron con la enzima modelada y se determinaron las interacciones moleculares que favorecen la unión al sitio, lo cual llevó a la propuesta de nuevos inhibidores.

Primeramente, se predijo la factibilidad de que la enzima ADI pudiese ser una estructura blanco en la cual una molécula pueda presentar afinidad y alterar su función (*druggable*), esto se determinó utilizando el programa *VoISite*.¹¹²

Este programa predice si una proteína es *druggable* creando un mapa farmacofórico del sitio de unión de un ligando y la enzima, asignando propiedades farmacofóricas tales como: aceptor y donador de puente de hidrógeno, interacciones con sitios ionizados negativos o positivos, carácter hidrofóbico y aromático.

Posteriormente se aplicó la metodología de *virtual screening* para seleccionar aquellas moléculas, en bases de datos, como candidatos a ser afines con la enzima ADI. Para este estudio se evaluaron moléculas de la biblioteca de EDULISS^{113,114} con el servidor LIDAEUS¹¹⁵, estudiando más de 4 millones de compuestos provenientes de 27 bases de datos diferentes. El servidor determina la distribución superficial del potencial electrostático creando con ello un mapa farmacofórico representado por átomos de nitrógeno, oxígeno y carbono, denominados *puntos de sitio (site points)*. 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.

Simultáneamente, también se buscaron en la base de datos pública de ZINC¹¹⁶ moléculas con el núcleo de bencimidazol. Las estructuras encontradas se optimizaron usando el campo de fuerza MMFF94x. Después se realizó un estudio de acoplamiento molecular empleando el programa *AutoDock 4.2*, en el cual se empleó un algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 estructuras, 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Todas las estructuras se evaluaron en el modelo del dímero de ADI.

6.9. Estudios de acoplamiento molecular en las enzimas OTC y CK de *G. intestinalis*

6.9.1. Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización

Adicionalmente también se realizó un estudio de acoplamiento molecular con las otras dos enzimas de la vía arginina dehidrolasa (ADH). Las enzimas ornitina carbamoiltransferasa (OTC) y carbamato cinasa (CK) se localizaron en el Protein Data Bank con las claves PDB ID: 3GRF¹¹⁷ y PDB ID: 3KZF¹¹⁸ respectivamente.

Las enzimas se descargaron con el programa *PyMOL 0.99* y se removieron las moléculas de agua, iones y otros ligandos. Posteriormente se añadieron todos los átomos de hidrógeno (ya que la estructura cristalográfica carece de ellos) y se asignaron cargas de Gasteiger-Marsili a todos los átomos.

Finalmente se realizó una minimización de energía a las estructuras de las enzimas utilizando el programa *GROMACS 4.5.3* con el campo de fuerza GROMOS96 43a1, las estructuras optimizadas se guardaron en formato *pdb* para posteriormente emplearse en el estudio de acoplamiento molecular.

6.9.2. Estudios de acoplamiento molecular

Los ligandos evaluados en las enzimas OTC y CK fueron los compuestos encontrados en la base de datos de ZINC. Con ADT, usando el programa auxiliar *Autogrid 4.0*, se generó la región de búsqueda (*grid*) la cual se posicionó en el centro del sitio activo de cada enzima. La región de búsqueda tuvo las siguientes dimensiones: 60x70x40 Å para la enzima OTC y 50x60x40 Å para la enzima CK. Posteriormente para el estudio se siguieron los procedimientos de los puntos 6.6.2 y 6.6.3.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que la ADI es una de las enzimas afectadas por el tratamiento con compuestos bencimidazólicos, aunado a la importancia que tiene la enzima en los procesos energéticos y de evasión del sistema inmune, la convierten en un blanco importante para el diseño de inhibidores. Si bien la estructura cristalográfica de la enzima no se encuentra disponible, las herramientas computacionales actuales brindaron una alternativa para conocer su estructura tridimensional, y la información obtenida sobre el sitio de unión de los compuestos bencimidazólicos permitió el diseño de nuevos inhibidores.

En esta sección se presentan y analizan los resultados de la metodología seguida para generar una estructura tridimensional confiable de la enzima ADI, así como la selección de inhibidores.

7.1. Identificación y alineamiento de secuencias

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos en los servidores utilizados para la búsqueda de la *plantilla*, estos datos permitieron identificar estructuras cristalográficas reportadas con potencial de ser empleadas para la construcción de la estructura terciaria de la ADI de *G. intestinalis*.

Tabla 4. Resultados obtenidos de los servidores utilizados para determinar la estructura *plantilla*

Servidor	Función	Organismo	PDB	Identidad	No. de aa	Resolución (Å)
Bioinformatics Toolkit	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2A9G	22%	418	2.30
	Arginina deiminasa	<i>Mycoplasma arginini</i>	1S9R	21%	410	1.60
	Dimetilarginina dimetilhidrolasa	<i>Bos taurus</i>	2C11	10%	275	1.08
	Dimetilarginina dimetilhidrolasa	<i>Homo sapiens</i>	3I4A	11%	308	1.90
	Inosamina-fosfato amidinotransferasa	<i>Streptomyces griseus</i>	1BWD	11%	348	3.10
EMBL-EBI	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2A9G	22%	418	2.30
	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2ACI	22%	418	2.50

	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2ABR	22%	418	2.90
	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1RXX	23%	421	2.45
	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2AAF	22%	418	2.30
NCBI-BLAST	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2A9G	22%	418	2.30
	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1RXX	23%	421	2.45
	Arginina deiminasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2ACI	22%	418	2.50

Para la búsqueda de estructuras cristalográficas de proteínas útiles como *plantilla* para la generación de los modelos tridimensionales, se utilizaron tres servidores en línea distintos (Bioinformatics Toolkit, EMBL-EBI y NCBI-BLAST) con la finalidad de realizar una exploración más amplia y establecer una correlación entre los resultados obtenidos con los tres servidores; así como para tener mayor certeza en la selección de la mejor estructura. El servidor Bioinformatics Toolkit presentó la mayor variabilidad en los resultados, ya que encontró estructuras diferentes a la ADI en otros organismos, algunas de ellas como la enzima dimetilarginina dimetilhidrolasa de *Homo sapiens*, que cataliza la hidrólisis de *N,N*-dimetilarginina, por lo que su función es semejante a la ADI; sin embargo, presenta baja relación secuencial (10% de identidad con la ADI de *Giardia*). La búsqueda con los servidores EMBL-EBI y NCBI-BLAST proporcionó prácticamente los mismos resultados, que junto con los obtenidos con Bioinformatics Toolkit, coincidieron en dos estructuras que presentan la mayor homología: la ADI de *M. arginini* (PDB ID: 1S9R) y la ADI de *P. aeruginosa* (PDB ID: 2A9G) con identidades de 21% y 22% respectivamente. Adicional a la convergencia en las estructuras estas presentan buena resolución, por lo que se seleccionaron para continuar con los estudios de homología.

Las estructuras 2ACI, 2ABR y 2AAF son estructuras de ADI de *P. aeruginosa*, las cuales presentan mutaciones puntuales en las posiciones D166A, D280A y H278A respectivamente. Estas mutaciones han permitido establecer los aminoácidos que son importantes para el mecanismo de transformación de la arginina, ya que al no ser activas han podido ser co-

cristalizadas con el ligando natural y determinar la importancia de dichos aminoácidos; por lo que estas estructuras no se tomaron en cuenta para los estudios posteriores

Cabe mencionar que a la fecha solo se han determinado las estructuras cristalográficas de las ADI de *M. arginini* y de *P. aeruginosa* y recientemente la ADI de *Mycoplasma penetrans*,¹¹⁹ esta última estructura es de gran relevancia ya que ha sido determinada en su forma *apo* o de conformación “abierta” en su sitio activo; en contraste con las con las de *M. arginini* y de *P. aeruginosa* en las cuales la estructura se encuentra en una conformación “cerrada”. Futuros estudios con la ADI *Mycoplasma penetrans* pueden ayudar a la generación de modelos en el estado *apo* de la enzima.

El alineamiento múltiple de la secuencia de ADI de *G. intestinalis* junto con otras secuencias de ADI de organismos procariontes, ver **Figura 10**, permitió identificar los aminoácidos que integran la triada catalítica, la cual está conformada por Cys424, His280 y Glu226; mientras que otros aminoácidos se encontraron conservados como Asp282, Phe172, Arg245 y Asp175, éstos participan en la estabilización de la arginina en el sitio catalítico.

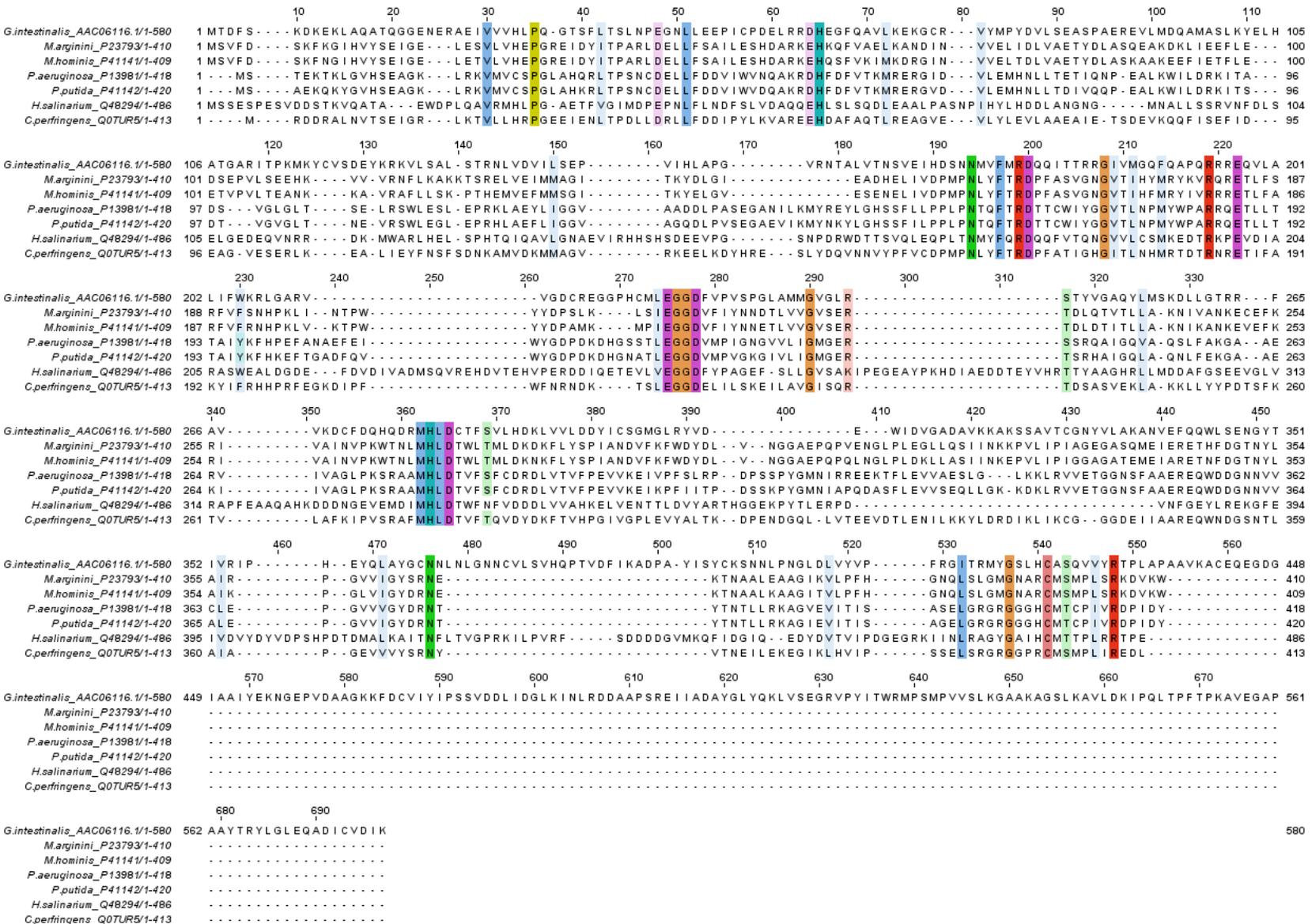


Figura 10. Alineamiento de la secuencia de ADI de *G. intestinalis* con las secuencias de *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hominis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Halobacterium salinarum* y *Clostridium perfringens*. Los aminoácidos marcados en color indican homología entre las secuencias.

El árbol filogenético representado en la **Figura 11** permitió analizar y establecer una relación evolutiva entre la secuencias de ADI de *G. intestinalis* y la secuencia de los demás organismos. La relación más cercana se establece con *H. salinarium*, mientras que los demás organismos presentan mayor alejamiento debido al aumento en la diferenciación de las secuencias de aminoácidos. De interés para nosotros son dos casos particulares; el primero relacionado con la ADI de *P. aeruginosa*, ésta tiene una relación secuencial más cercana con *G. intestinalis*; y el segundo, la ADI de *M. arginini* la cual presenta mayor divergencia, haciendo que su secuencia presente menor porcentaje de identidad que la proteína de *Giardia*. Esto permitió establecer que la estructura de la ADI de *P. aeruginosa* como aquella que brinda modelos más confiables.

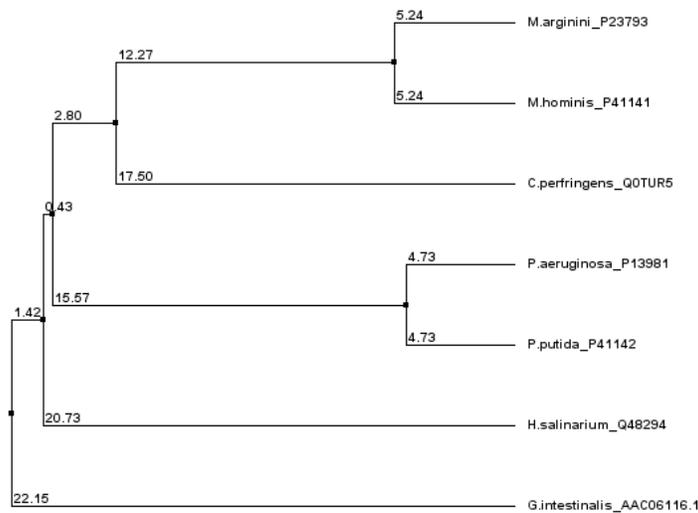


Figura 11. Árbol filogenético basado en la similitud secuencial de la ADI.

7.2. Modelado por homología y validación de los modelos

Se construyeron múltiples modelos utilizando distintos servidores en línea y programas de modelado, los cuales se compararon basándose en su calidad con el fin de seleccionar el mejor modelo.

De acuerdo con los resultados de alineamiento de secuencias, las estructuras seleccionadas para la construcción de los modelos presentaron identidades de 21% para 1S9R y 22% para 2A9G, ambos por debajo del 40%, por lo que se utilizaron diversas técnicas de modelado por homología implementadas en los distintos servidores. Se utilizaron: el modelado *de novo*, método implementado en el servidor de Robetta; el modelado por enhebrado de proteínas, implementado en I-TASSER, y el modelado comparativo implementado en SwissModel, 3D-JIGSAW y Modeller.

Para la construcción de los modelos se inició utilizando la secuencia completa de 580 aa de la ADI de *G. intestinalis*. En la **Tabla 5** se muestran los resultados de validación de las estructuras generadas en los servidores empleados, y en algunos casos con diferentes estructuras *plantilla*.

Tabla 5. Resultados de los modelos generados con los distintos servidores y programas utilizando la secuencia con extensión de 580 aa

Programa	Plantilla	QMEANscore	Z-score	Ramachandran plot (%)			
				F	P	G	NP
Robetta	--	0.471	-3.305	84.2	14.2	0.8	0.8
I-TASSER	2A9G	0.374	-4.408	80.8	11.9	4.2	3.2
	1S9R	0.439	-3.673	78.7	14.0	4.2	3.2
SwissModel	1S9R	0.473	-3.450	81.8	13.0	3.0	2.2
3D-JIGSAW	1S9R	0.494	-2.440	62.3	27.1	8.6	2.0

Regiones del gráfico de Ramachandran: (F) Favorecida, (P) Permitida, (G) Generosamente permitida, (NP) No Permitida

Para obtener un modelo confiable se generaron varios modelos, los cuales se analizaron con el servidor PROCHECK para evaluar su calidad. El modelo generado por el servidor Robetta mostró los mejores resultados, el análisis del gráfico de Ramachandran indicó una fiabilidad (F + P) de 98.4% de residuos en zonas permitidas, mientras que los aminoácidos que corresponden al sitio catalítico se encuentran también en zonas permitidas del gráfico, lo que indica que presentan conformaciones semejantes a las de las estructuras cristalizadas utilizadas como *plantilla* (ver Anexo). En cambio, los demás servidores mostraron un porcentaje mayor de aminoácidos en regiones no permitidas del gráfico, en especial el modelo generado por el servidor 3D-JIGSAW que sólo generó modelos hasta el aminoácido 400, incluyendo en algunos casos a los aminoácidos presentes en el sitio catalítico (ver Anexo), por lo que el porcentaje de fiabilidad de estos modelos fue entre 95.6-89.4%.

Por otra parte, los modelos generados con los servidores I-TASSER, SwissModel y 3D-JIGSAW fueron trancos o no modelados en la región del C-terminal de la secuencia de la ADI. Este hecho se debe a que las metodologías empleadas por estos servidores, enhebrado de proteínas y modelado comparativo, requieren de una estructura *plantilla* para construir los modelos, por lo que al no encontrar una *plantilla* con la extensión adecuada en su estructura, el programa elimina automáticamente esta región; o bien, el plegamiento no es modelado. La **Figura 12** muestra un plegamiento erróneo o la falta de plegamiento del extremo C-terminal

En cambio, el servidor Robetta genera estructuras mediante un diseño *de novo*, donde el plegamiento se determina mediante métodos estadísticos prediciendo la conformación que adoptan los aminoácidos en una secuencia; sin embargo, el uso de esta metodología se sugiere para generar estructuras proteicas pequeñas hasta de 200 aa.¹²⁰

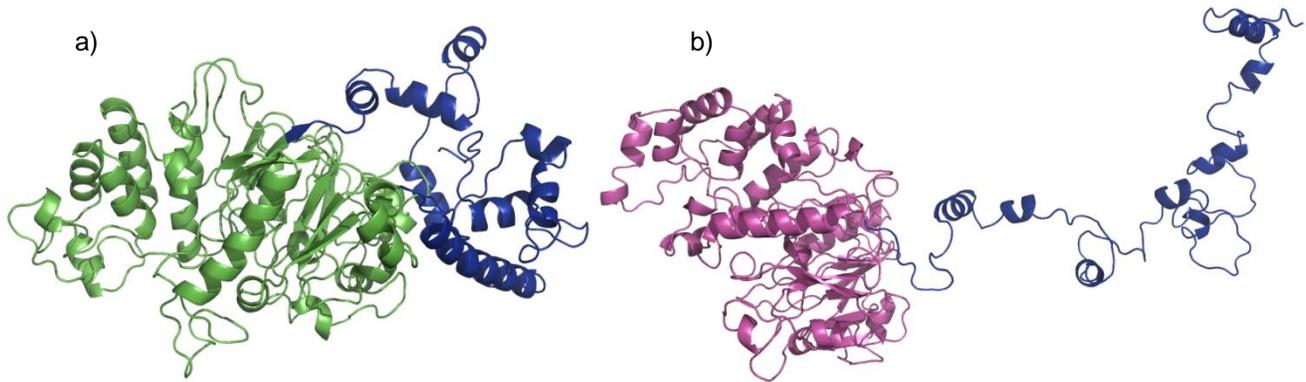


Figura 12. Modelos generados con el servidor Robetta (a) y I-TASSER (b) utilizando la secuencia con extensión de 580 aa. La zona en color azul indica la porción C-terminal de la ADI.

Los resultados obtenidos en el modelado utilizando la secuencia completa de la proteína no fueron convincentes; o bien, incompletos ya que no pudo ser modelada la región C-terminal; por lo que se decidió realizar un segundo estudio de modelado por homología retirando la extensión C-terminal y generar los modelos con la secuencia 1-435 aa de la ADI.

Se ha determinado que la región C-terminal en la ADI de *Giardia*, con una extensión de 145 aa más que las ADI reportadas, no participa en el ciclo catalítico por lo que su estructura no se encuentra presente en la región catalítica. Además, tampoco participa en la estabilidad del dímero, como se ha reportado,⁴⁷ ya que pequeñas deleciones en esta región no muestran una disociación del mismo. Sin embargo se sabe que mutaciones en los aminoácidos de esta región o bien acortando su extensión traen como resultado una disminución de su actividad.¹²¹ Las observaciones anteriores indican que la región C-terminal tiene relevancia a nivel de estructura cuaternaria. Futuros estudios deben realizarse enfocados a determinar el plegamiento y función que tiene esta región en la enzima.

En la **Tabla 6** se muestran los resultados de validación de las estructuras generadas con la secuencia hasta 435 aa, de igual manera se emplearon las herramientas de los diversos servidores antes mencionados para comparar y seleccionar el mejor modelo.

Tabla 6. Resultados de los modelos generados con los distintos servidores y programas utilizando la secuencia con extensión de 580 aa

Programa	Plantilla	QMEANscore	Z-score	Ramachandran plot (%)			
				F	P	G	NP
Phyre2	1RXX	0.512	-3.205	70.2	24.8	3.1	1.8
Modeller	2A9G	0.476	-3.465	78.1	19.1	1.6	1.3
	1S9R	0.446	-3.821	72.8	24.0	1.8	1.3
	1RXX	0.414	-4.205	77.8	18.0	2.6	1.6
I-TASSER	2A9G	0.461	-3.644	72.8	21.4	3.1	2.6
	1RXX	0.450	-3.780	75.5	18.3	3.4	2.9
SwissModel	1S9R	0.483	-3.353	82.3	15.2	1.6	0.8
3D-JIGSAW	1S9R	0.343	-5.049	67.7	28.0	2.9	1.3

Regiones del gráfico de Ramachandran: (F) Favorecida, (P) Permitida, (G) Generosamente permitida, (NP) No Permitida

El modelo que se obtuvo con SwissModel presentó los mejores resultados en lo que respecta al gráfico de Ramachandran con 97.5% de aminoácidos presentes en regiones permitidas del gráfico; sin embargo, no se tomó en cuenta para continuar con el estudio ya que la estructura generada cubrió hasta el aminoácido 420 por lo que el parte de la estructura del sitio catalítico no se obtuvo en este modelo.

De los resultados obtenidos, con el programa *Modeller* se obtuvieron los mejores modelos. Cuando se utilizó la estructura 2A9G como *plantilla*, de las opciones posibles, se obtuvieron los modelos más aceptables (ver Anexo, A7). Esto se debe a que dicha plantilla muestra un porcentaje de identidad mayor que otras estructuras y filogenéticamente se encuentra más cercana con la secuencia de *G. intestinalis*. La calidad de este modelo es aceptable ya que presenta un 97.2% de los aminoácidos en zonas permitidas y 1.3% en zonas no permitidas. Adicionalmente, los valores de confiabilidad del modelo son moderados ya que los valores QMEANscore y Z-score son de 0.476 y -3.465 cuando deberían, en las mejores condiciones, ser tendientes a 1 y 0 respectivamente. Esta mediana confiabilidad es consecuencia de la baja identidad entre la secuencia problema y la estructura *plantilla*; esto no se pudo mejorar dado que no hay más estructuras de ADI reportadas.

Al sobreponer las estructuras del modelo generado y la estructura *plantilla*, como se muestra en la **Figura 13**, se observó buena similitud estructural entre ambas enzimas. Esto permite considerar que el diseño de compuestos que inhiban a la enzima estará determinado

principalmente por las modificaciones en los residuos de los aminoácidos y no a causa de la estructura terciaria e inclusive cuaternaria de la enzima.

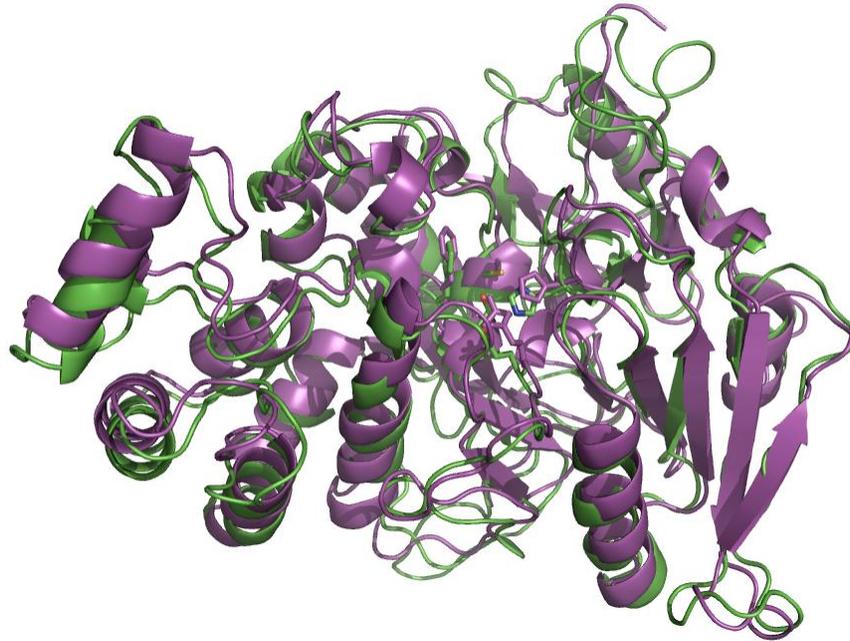


Figura 13. Sobreposición de la estructura de la ADI. de *P. aeruginosa* (morado) y la del modelo de ADI de *G. intestinalis* generado con el programa Modeller (verde).

Una vez seleccionado el modelo, con ayuda del análisis secuencial se identificó el sitio catalítico en la estructura generada. En la **Figura 14** se observa la zona del sitio catalítico en la enzima y los residuos que participan en la catálisis y estabilidad de la arginina. El residuo Cys424 se encuentra orientado y cercano al carbono del grupo guanidino en la arginina, esto de manera semejante a las estructuras cristalográficas reportadas. Por otra parte, también se puede ver que el residuo Asp282 participa en la estabilización de la arginina por la formación de puentes de hidrógeno con el grupo guanidino, al igual que el grupo de residuos Arg194 y Arg245 que interaccionan con el grupo carboxilato.

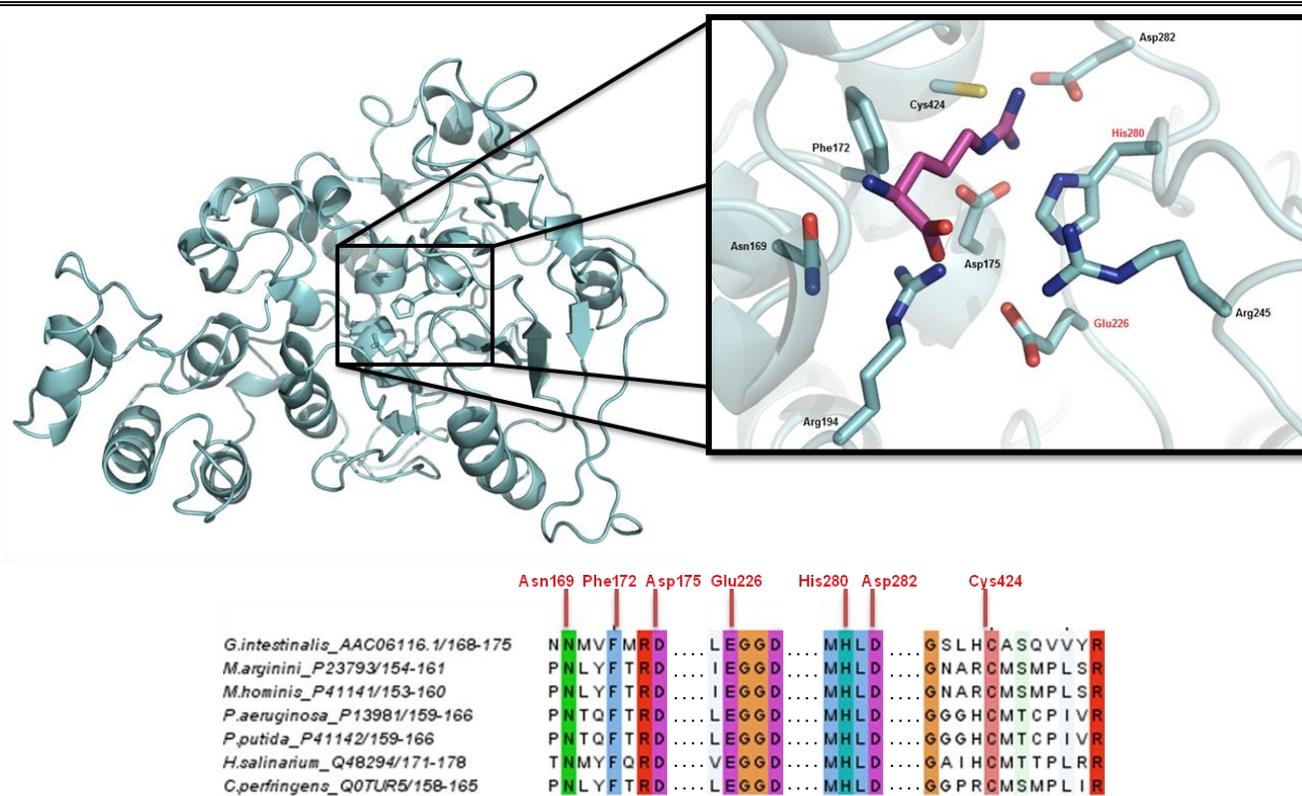


Figura 14. (a) Aminoácidos de sitio activo de la ADI de *G. intestinalis*. (b) Identificación de los residuos del sitio activo en las diferentes secuencias de ADI de otros organismos.

7.3. Determinación de la estructura secundaria

Para confirmar de mejor manera la estructura del monómero de *G. intestinalis* se determinó la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos, se utilizó una amplia variedad de servidores de predicción con la finalidad de tener mayor certeza en el resultado.

Se analizaron los dos modelos seleccionados anteriormente: el de estructura completa con 580 aa y el modelo de 435 aa. El resultado consensuado de los 18 servidores utilizados se comparó con la estructura secundaria de los modelos seleccionados, indicando una identidad del 70% entre la estructura secundaria predicha y los modelos; además, como puede observarse en la **Figura 15**, prácticamente todos los aminoácidos del sitio catalítico correlacionan en su estructura secundaria

Este resultado hace ver que las estructuras generadas del modelado presentan una arquitectura aceptable ya que existe una buena correlación entre la predicción de la estructura secundaria y la que se obtiene del modelo. Esto ratifica la validez de la metodología seguida para la generación de los modelos; y el análisis comparativo de las

estructuras secundarias se convierte en una alternativa más de validación de modelos generados por modelado por homología.



Figura 15. Comparación del modelo a partir de la predicción de la estructura secundaria (morado) y el modelo obtenido con el programa *Modeller* (cian).

7.4. Estructura del dímero de Arginina deiminasa de *G. intestinalis*

Se sabe que la enzima ADI de *G. intestinales* es activa en forma de dímero, por lo que si una molécula está dirigida a interactuar con el sitio catalítico existen otras regiones de unión tales como la interfaz, o bien zonas alostéricas en las cuales una molécula puede unirse y generar cambios conformacionales que alteren su función biológica. Por lo que determinar la estructura del monómero de la ADI de *G. intestinalis* e identificar la región del sitio catalítico, así como los aminoácidos que participan en la interacción con el ligando natural no es suficiente para el diseño de moléculas que se unan al sitio catalítico de la enzima y bloqueen su función.

Con base en los fundamentos anteriores se generó, por modelado, el dímero de ADI de *G. intestinalis* el cual brindó mayor certeza sobre las características del sitio de unión de moléculas tales como los bencimidazoles a la enzima y que se discute en la sección 7.6.

Para la construcción del dímero de ADI de *G. intestinalis* se utilizó el modelo de secuencia acortada obtenido a partir de la estructura *plantilla* 2A9G, dado que la porción C-terminal no está presente en el sitio catalítico o en la interfaz. Para la obtención del dímero se utilizó como estructura *platilla* la ADI de *M. arginini*, ya que junto con la de *G. intestinalis* son las únicas en forma de dímero.

En la **Figura 17** se muestra la estructura del dímero de ADI de *G. intestinalis*, que comparada con sus homólogos tiene una estructura semejante. Ambos sitios catalíticos se encuentran en la misma zona y de manera opuesta, mientras que la interfaz es muy semejante a otras ADI reportadas.

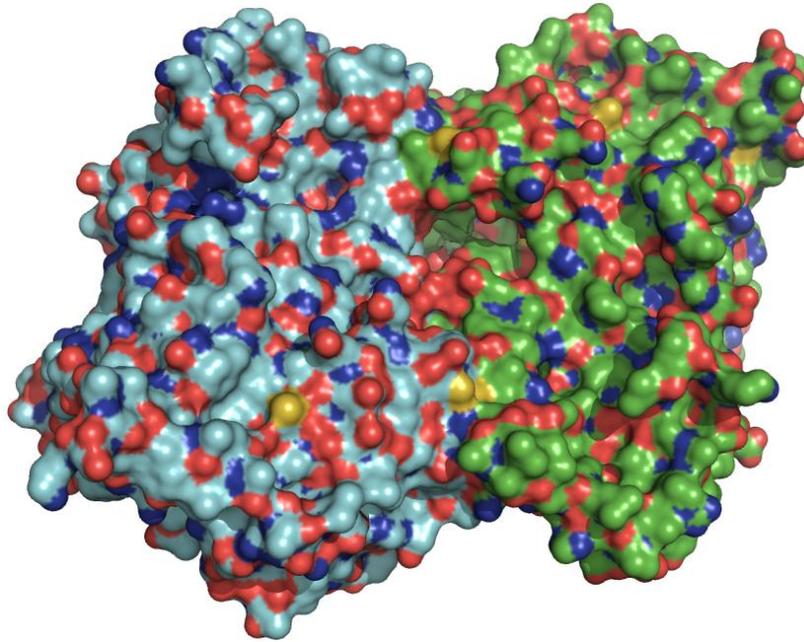


Figura 17. Estructura de homodímero de la ADI de *G. intestinalis*.

Al igual que a los modelos generados para el monómero de ADI; al dímero también se le evaluó la calidad bajo los mismos criterios de confiabilidad. Para el gráfico de Ramachandran el dímero presentó 96.1% de los aminoácidos en zonas permitidas; mientras que sólo el 1.2% (9 aminoácidos) se encuentran en regiones no permitidas. Los resultados de QMEAN y Z-score, 0.48 y -3.11 respectivamente, se consideran aceptables (ver Anexo, A12). Con estos resultados de validación, la estructura del dímero se consideró como de buena calidad, tomando en cuenta el tamaño de la estructura obtenida con un total de 870 aa.

El estudio de dinámica molecular, realizado al modelo dimérico, estableció que a 35 ns de simulación el dímero se mantenía estable y sin disociación. Como se observa en el **Gráfico 1** el dímero presentó pocas modificaciones estructurales a lo largo de la dinámica, puesto que posee un RMSD menor a 0.45 nm. Los cambios conformacionales importantes que tiene el dímero en los primeros 5 ns de tiempos de simulación están relacionados con la interacción entre los monómeros, aminoácidos superficiales, loops y regiones terminales, para finalmente estabilizarse a partir de los 20 ns de simulación.

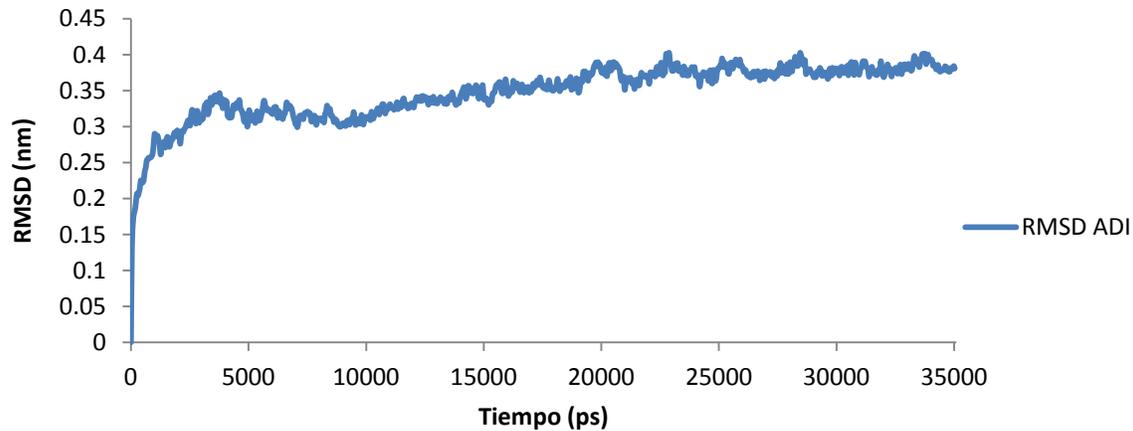


Gráfico 1. RMSD del esqueleto (*backbond*) de la ADI de *G. intestinalis* durante la simulación de 35 ns.

Al confirmar la estabilidad del dímero, los estudios de acoplamiento molecular se efectuaron utilizando la estructura dimérica.

7.5. Predicción de la *Druggability* en ADI

A pesar de los avances en el desarrollo de fármacos se estima que el 60% de los proyectos para el desarrollo de fármacos fracasa, debido a que los blancos macromoleculares estudiados no son "*druggable*".¹²²⁻¹²⁴ El genoma *druggable* es una estimación de la cantidad de proteínas terapéuticamente útiles en el genoma humano para el diseño de fármacos,^{125,126} por lo que el concepto *drugability* se ha convertido en parte fundamental del proceso de validación de un blanco terapéutico.^{127,128} El concepto *druggability* evalúa la probabilidad de que moléculas pueden unirse a una diana terapéutica dada con la potencia suficiente para alterar su actividad. En el caso del humano se estima que el 10% de sus genes (aprox. 3000 genes) en el genoma es *druggable* y solo el 5% es *druggable* y relevante en una enfermedad.¹²⁵ Si este dato se extrapola a *G. intestinalis*, la cual tiene 6470 genes en su genoma,^{129,130} aproximadamente 600 macromoléculas pueden ser consideradas dianas para el desarrollo de fármacos. La ADI es una enzima fundamental para el desarrollo de *G. intestinalis*, por lo que se ha postulado como blanco para el desarrollo de fármacos giardicidas. En este trabajo se determinó su factibilidad de ser una estructura *druggable*. Para ello se utilizó el programa *VoISite*, el cual evalúa mediante similitud el sitio de unión de una diana en estudio con el de blancos ya validados como *druggable*. En la **Figura 18** se observa la cavidad del sitio activo de la ADI de *G. intestinalis*, así como las propiedades que presenta la cavidad que permiten la unión de moléculas.

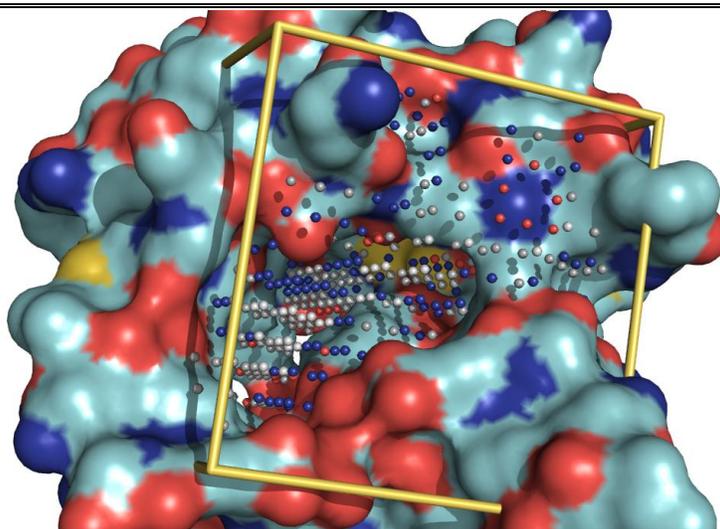


Figura 18. Propiedades que presenta la cavidad del sitio activo en la ADI para la unión de ligandos, representados en esferas de color: azul (donador de puente de hidrógeno), rojo (aceptor de puente de hidrógeno), gris (hidrofóbico).

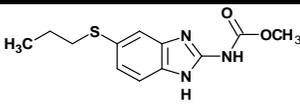
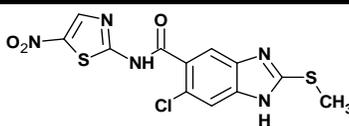
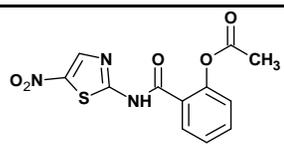
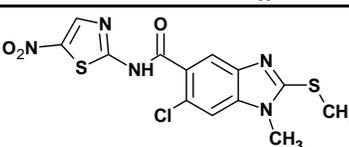
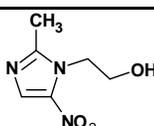
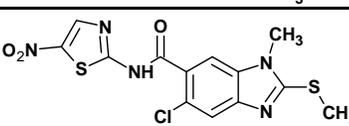
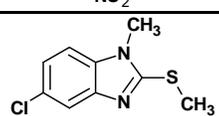
El resultando indicó que la ADI es un blanco *druggable*. El programa asigna un valor numérico entre -1.93 a 2.09, por lo que si el valor obtenido es >0 la proteína es *druggable*.¹¹² En el caso de la ADI el valor obtenido fue 1.03 siendo un valor alto, por lo que la ADI puede ser considerada con certeza como un blanco para el diseño de fármacos.

7.6. Estudios de acoplamiento molecular

Para determinar el modo de unión de compuestos activos contra *G. intestinalis*, ya sea en ensayos in vitro y sobre la expresión de la ADI en los estudios de proteómica con la enzima; se realizó un primer estudio de acoplamiento conocido como *docking* ciego (*blind docking*) en donde la región de búsqueda cubrió todo el dímero con la finalidad de establecer una selectividad por algún sitio. El resultado de esta primera búsqueda indicó que todas las moléculas mostraron selectividad por el sitio activo y por la interfaz del dímero, por lo que posteriormente se delimitó la zona de búsqueda a la interfaz y a ambos sitios catalíticos de la enzima donde posteriormente se efectuaron todas las evaluaciones de las moléculas.

En la **Tabla 7** se muestra el resultado de energía derivado del acoplamiento de los compuestos que se utilizaron en los estudios de proteómica en *G. intestinalis*.

Tabla 7. Resultados de *docking* en la ADI de los fármacos de referencia y de otros derivados bencimidazólicos estudiados en los ensayos de proteómica

Clave	Molécula	Energía de unión (Kcal/mol)	Clave	Molécula	Energía de unión (Kcal/mol)
ABZ		-7.77	CMC12		-6.69
NTZ		-6.65	CMC19		-6.5
MTZ		-5.2	CMC20		-7.09
RSD8		-5.18			

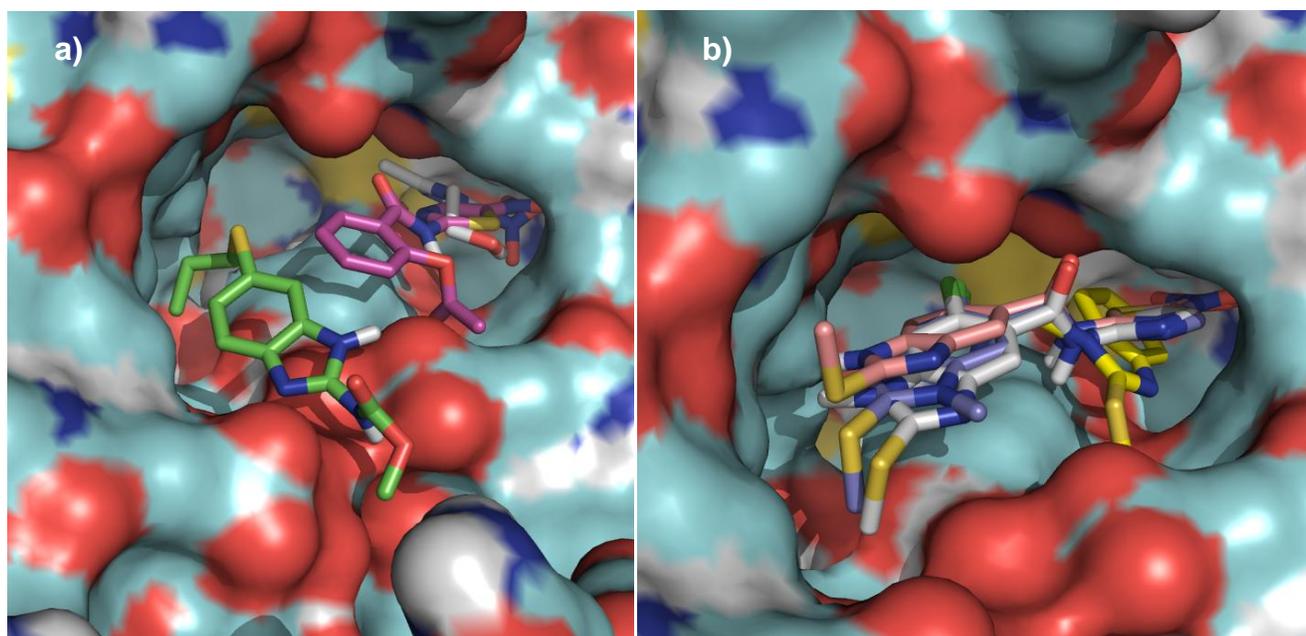


Figura 19. (a) Acoplamiento del ABZ (verde) en la zona de la interfaz y NTZ (morado) y MTZ (gris) en el sitio activo de la ADI; (b) Acoplamiento de los compuestos bencimidazólicos RSD8 (amarillo), CMC12 (gris), CMC19 (violeta) y CMC20 (rosa) en la cavidad del sitio, donde el sustituyente nitrotiazol interactúa con los residuos Arg194, Arg245 y Arg278 de sitio activo.

El ABZ fue el compuesto que presentó la mayor afinidad por la enzima, esto se debe a que presenta mayor cantidad de donadores de puente de hidrógeno, como los son los NH del grupo carbamato y del anillo de bencimidazol, que interactúan con los residuos Glu43 y Glu48 presentes en la interfaz; sin embargo, su unión se da preferencialmente en la región de la interfaz dimérica bloqueando una parte de la cavidad del sitio catalítico con el

sustituyente propiltio de su estructura. Los fármacos NTZ y MTZ presentaron conformaciones de unión semejantes (**Figura 19a**), ambos compuestos se introducen al sitio activo interactuando por el grupo nitro presente en su estructura con los residuos Arg194, Arg245 y Arg278. En lo que respecta al compuesto CMC20 y sus análogos CMC12 y CMC19, éstos presentaron modos de unión muy semejantes; el grupo nitrotiazol de sus estructuras se introdujo al sitio activo e interactúa con un grupo de residuos de arginina; mientras que el núcleo de bencimidazol participa en la estabilización por interacción con la Tyr419, bloqueando la cavidad del sitio prácticamente en su totalidad, como se puede observar en la **Figura 19b**. De los tres compuestos híbridos, el compuesto CMC20 fue el compuesto con mejor afinidad por la enzima superando a sus análogos, ya que adicional al modo de interacción con el grupo de residuos de arginina presentes en el sitio, presenta una interacción de tipo π - π más efectiva con Tyr419, lo que favorece su afinidad por el sitio. El compuesto RSD8 fue el compuesto de menor afinidad por la enzima, ya que al carecer de sustituyentes que sean aceptores o donadores de puente de hidrógeno su estabilización en el sitio se da por interacciones hidrofóbicas; a pesar de ello, la molécula se introduce al sitio debido principalmente a su tamaño.

Con este resultado se puede sugerir que los compuestos, incluido el CMC20, bloquean el sitio activo causando una inactivación en la enzima, la cual al no ser funcional es degradada en el interior del protozario observándose este posible efecto en el estudio de proteómica.

7.7. Diseño de inhibidores

Debido a la potencia que tuvieron los compuestos híbridos en los ensayos in vitro, su efecto en la reducción de la enzima ADI en los ensayos de proteómica y la unión preferencial en el sitio activo; el diseño de nuevos compuestos se postuló con base en la modificación de la estructura del compuesto CMC20, debido a que éste fue muy activo contra *G. intestinalis* y en el estudio de acoplamiento molecular se observó que se une al sitio activo de la ADI con buena afinidad.

7.7.1. Diseño por modificación isostérica (serie A)

Los resultados de *docking* mostraron que el anillo de nitrotiazol interactúa con algunos aminoácidos que participan en la transformación de la arginina, por lo que, como se ilustra en la **Figura 20**, se reemplazó al tiazol por otro tipo de heterociclos; además, también se introdujeron sustituyentes distintos al nitro como los grupos carboxilato o amida. Así mismo,

se evaluó la presencia de hidrógeno o metilo en la posición 1 del bencimidazol, y su disposición con relación al grupo amida en posición 5 ó 6 para determinar su relevancia. Los resultados de acoplamiento con estas modificaciones se muestran en la **Tabla 8**.

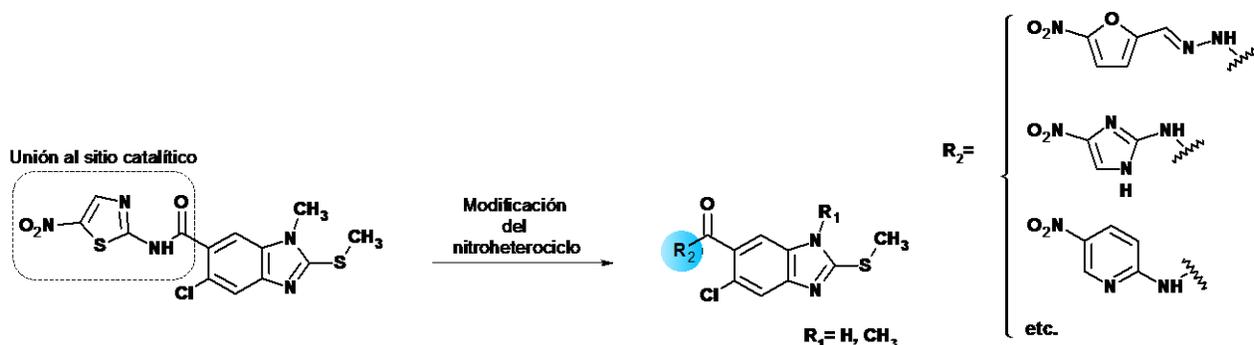
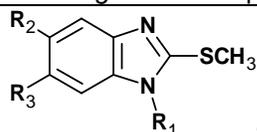


Figura 20. Modificación estructural del compuesto CMC20 para el diseño de los compuestos de la serie A.

Tabla 8. Energías de unión derivados del *docking* de los compuestos diseñados para la serie A



serie A

Clave	R ₁	R ₂	R ₃	Energía de unión (Kcal/mol)	Clave	R ₁	R ₂	R ₃	Energía de unión (Kcal/mol)
A17	H	Cl	NIA	-9.17	A21	H	Cl	4NIH	-8.87
A2	CH ₃	Cl	NIA	-8.81	A31	CH ₃	NIA	Cl	-8.77
A32	CH ₃	NTH	Cl	-8.67	A22	H	Cl	NFH	-8.61
A25	H	Cl	NPA	-8.52	A28	H	Cl	ACPA	-8.40
A14	CH ₃	Cl	ACPA	-8.32	A13	CH ₃	Cl	MCPA	-8.30
A1	CH ₃	Cl	CFA	-8.26	A18	H	Cl	NTH	-8.25
A3	CH ₃	Cl	NTH	-8.18	A27	H	Cl	MCPA	-8.13
A24	H	Cl	5CPA	-8.12	A12	CH ₃	Cl	6CPA	-8.09
A20	H	Cl	2NIH	-8.04	A16	H	Cl	CFA	-8.03
A10	CH ₃	Cl	NPA	-8.00	A39	CH ₃	NPA	Cl	-7.96
A9	CH ₃	Cl	5CPA	-7.72	A23	H	Cl	6CPA	-7.71
A40	CH ₃	MPA	Cl	-7.69	A35	CH ₃	4NIH	Cl	-7.69
A11	CH ₃	Cl	MPA	-7.59	A38	CH ₃	5CPA	Cl	-7.56
A15	CH ₃	Cl	CLPA	-7.55	A30	CH ₃	CFA	Cl	-7.53
A29	H	Cl	CLPA	-7.49	A36	CH ₃	NFH	Cl	-7.39
A26	H	Cl	MPA	-7.39	A34	CH ₃	2NIH	Cl	-6.95
A19	H	Cl	CFH	-6.92	A33	CH ₃	CFH	Cl	-6.91

CFA: *N*-(2-carboxifuran-5-il)aminocarbonilo

NIA: *N*-(4-nitro-1*H*-imidazol-2-il)aminocarbonilo

NTH: *N'*-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)hidrazinocarbonilo

CFH: *N'*-[(2-carboxifuran-5-il)metiliden]hidrazinocarbonilo

2NIH: *N'*-[(2-nitro-1*H*-imidazol-4-il)metiliden]hidrazinocarbonilo

4NIH: *N'*-[(4-nitro-1*H*-imidazol-2-il)metiliden]hidrazinocarbonilo

NFH: [(5-nitrofurano-2-il)metiliden]hidrazinocarbonilo

6CPA: (6-carboxipiridin-2-il)aminocarbonilo

5CPA: (5-carboxipiridin-2-il)aminocarbonilo

NPA: (5-nitropiridin-2-il)aminocarbonilo

MPA: (6-metilpiridin-2-il)aminocarbonilo

CLPA: (6-cloropiridin-2-il)aminocarbonilo

MCPA: [6-(metoxicarbonil)piridin-2-il]aminocarbonilo

ACPA: (6-carbamoilpiridin-2-il)aminocarbonilo

Los resultados mostraron que prácticamente todos los compuestos presentan mejores energías de unión que el compuesto que les dio origen, $\Delta G_{unión} \text{CMC20} = -7.09$ Kcal/mol. El

modo de unión de los compuestos a la enzima es muy similar entre todos, mostrando que el heterociclo se introduce al sitio de activo, mientras que el anillo de bencimidazol bloquea la cavidad. En general, los compuestos con hidrógeno en posición 1 del bencimidazol presentaron mejor energía de unión que sus análogos metilados, permitiendo establecer una tendencia en afinidad por H>CH₃ 1,6>CH₃ 1,5. Sin embargo, la diferencia de afinidad entre los derivados con hidrógeno en 1 y CH₃ 1,6 no es muy significativa como se puede ver en la terna de compuestos A17, A2 y A31, por lo que esta modificación no es esencial. En lo que respecta al heterociclo, el nitroimidazol presentó la mayor afinidad por la enzima ya que permite una mayor interacción por la formación de puentes de hidrógeno entre el nitroimidazol y los residuos Arg194, Arg245 y el residuo catalítico His280, mientras que el bencimidazol interactúa con el residuo Tyr419 lo que mejora la afinidad de manera importante, esto se puede con ver en la **Figura 21** con el compuesto A17, el más activo de la serie. En lo que respecta a los demás heterociclos no hay una tendencia clara, aún así el cambio mejoró de manera significativa la afinidad.

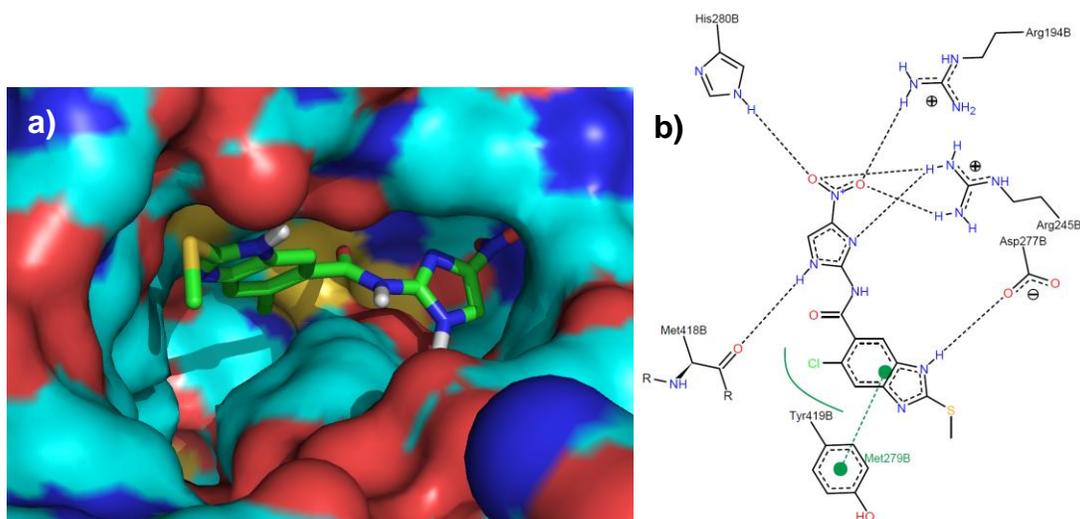


Figura 21. (a) Acoplamiento del compuesto A17 en la cavidad del sitio catalítico y (b) principales residuos que participan en la interacción.

7.7.2. Diseño por hibridación y posterior modificación isostérica (serie B)

El grupo guanidino de la arginina cuando interactúa con la ADI, lo hace de manera directa con los aminoácidos del sitio activo ya que la enzima lo transforma en el grupo urea presente en la citrulina. Con esto en mente y como se ejemplifica en la **Figura 22**, para el diseño de otro tipo de inhibidores se decidió tomar el grupo guanidino del sustrato natural, el cual es reconocido por la enzima, y unirlo a un núcleo de bencimidazol, el cual *per se* se ha

demostrado que tiene actividad antiprotozoaria⁵⁵ y además participa en la estabilización con la ADI; esta estrategia dio como resultado el diseño de un híbrido afín por la ADI. Posteriormente, se diseñó una serie de moléculas análogas al híbrido antes mencionado, para evaluar su afinidad con base en la modificación del grupo guanidino por isómeros de este grupo. Así mismo, debido a que hay una ligera preferencia por el hidrógeno en posición 1 del bencimidazol las moléculas se evaluaron con esta característica. Los resultados de acoplamiento de los híbridos diseñados se presentan en la **Tabla 9**.

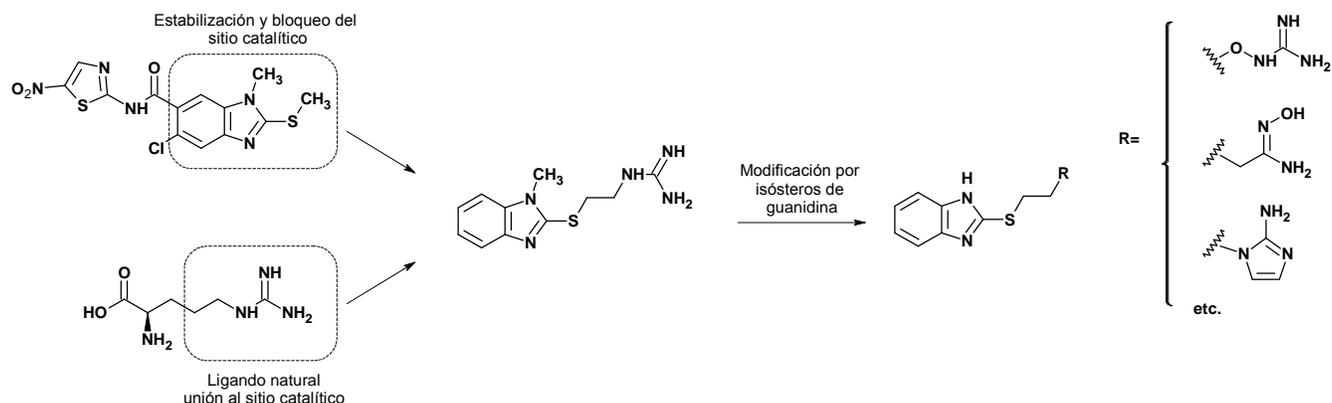
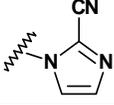
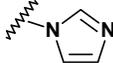
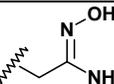
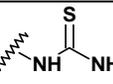


Figura 22. Diseño de los compuestos de la serie B, tomando la cadena lateral de la arginina y el anillo de bencimidazol del compuesto CMC20.

Tabla 9. Energías de unión derivadas del *docking* de los compuestos diseñados para la serie B

Clave	R	Energía de unión (Kcal/mol)	Clave	R	Energía de unión (Kcal/mol)
B1		-7.81	B6		-6.52
B8		-7.79	B15		-6.44
B9		-7.60	B2		-6.39
B14		-7.46	B4		-6.23
B5		-7.41	B11		-6.14
BG10		-7.39	B7		-6.10

B13		-7.39	B16		-6.04
B12		-6.81	B3		-6.03

Esta serie de compuestos presentó una menor energía de unión que los diseñados para la serie A; a pesar de ello, algunos presentaron mayor afinidad que el compuesto CMC20. Esto se puede explicar por la carencia de sustituyente en las posiciones 5 y/o 6 del bencimidazol lo que disminuye las interacciones entre las moléculas y la enzima. En general, el modo de unión que presentaron las moléculas de esta serie fue similar. El compuesto B1 presentó la menor energía de unión, esto era de esperarse debido a su semejanza con el ligando natural arginina. Como se muestra en la **Figura 23**, este compuesto se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo guanidino y los residuos Glu43 y Glu48; mientras que el anillo de bencimidazol se introduce en la cavidad del sitio. Adicionalmente, los compuestos con imidazol, en especial con amino o nitro en posición 2 del imidazol, presentaron buena afinidad, esto se debe principalmente a que pueden formar mayor número de puentes de hidrógeno.

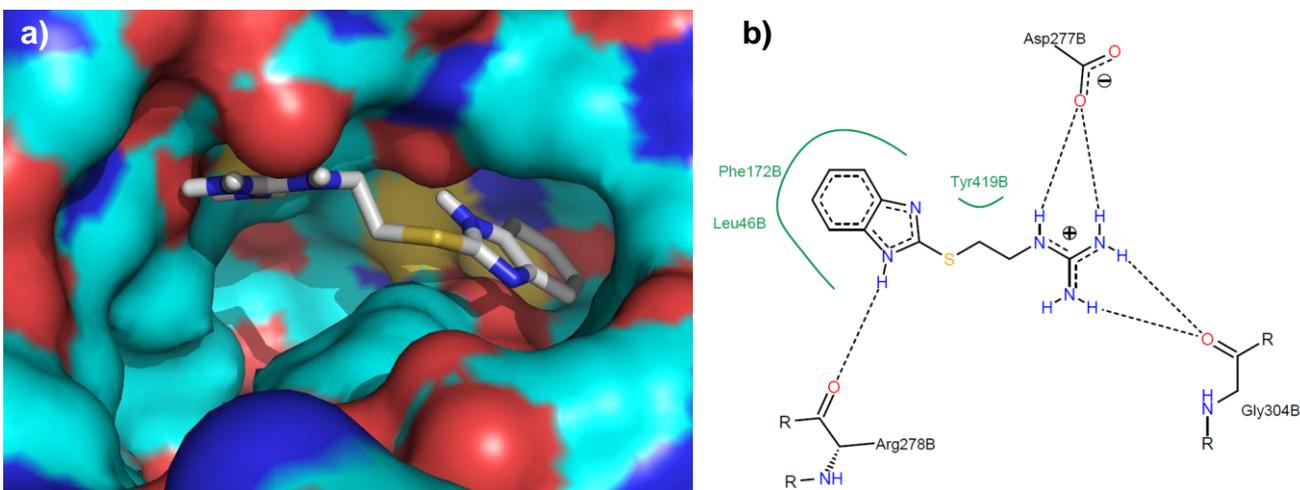


Figura 23. (a) Modo de unión del compuesto B1 en el sitio activo de la ADI y (b) residuos que participan en la interacción.

Por otra parte, los compuestos B5, B11, B12 y B13 mostraron energías de unión moderadas comparados con otros compuestos de la misma serie; sin embargo, son compuestos interesantes ya que podrían actuar como inhibidores suicidas, comparados con los otros miembros de la serie que actuarían como inhibidores competitivos, ya que tienen un

sustituyente con un centro electrofílico el cual puede ser atacado por el residuo Cys424, presente en sitio activo que participa en el mecanismo de transformación de la arginina, lo que inactivaría por completo a la enzima.

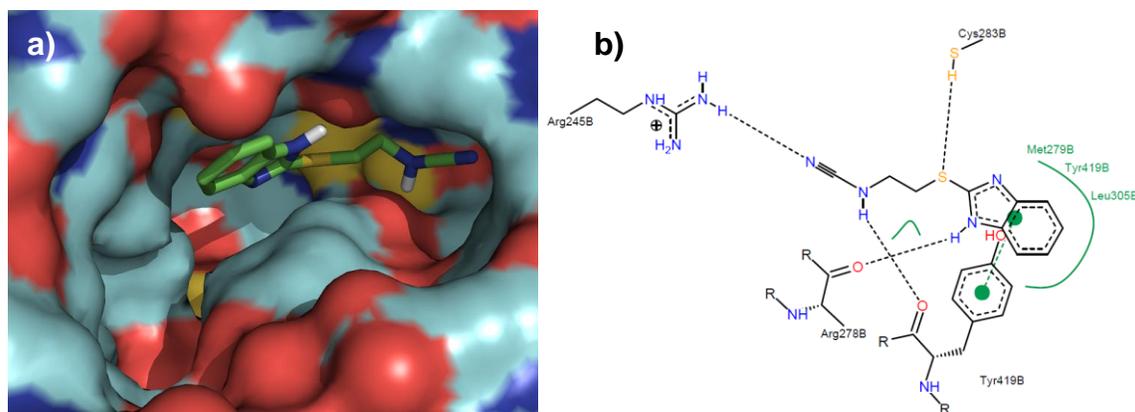
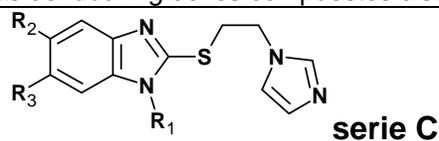


Figura 24. Modo de unión del compuesto B11, un posible inhibidor suicida, en la cavidad del sitio activo y residuos que participan en la interacción.

7.7.3. Otros compuestos evaluados (serie C)

Los compuestos que comprenden esta serie fueron sintetizados y evaluados *in vitro* como antiprotozoarios previamente por nuestro grupo de investigación.¹³¹ En particular, contra el protozoario *G. intestinalis* los compuestos presentaron actividades (CI₅₀) en el orden de 0.0083-0.1176 μ M lo cual en algunos casos superó a los fármacos de referencia. Esta serie se tomó en cuenta para su evaluación en el estudio teórico con la enzima debido a su semejanza estructural con algunos compuestos evaluados de la serie B, tales como B8, B15 o B16. Por otra parte, esta serie se caracteriza por tener sustituyentes como cloro, etoxilo o ésteres en las posiciones 5 ó 6 del anillo de bencimidazol, lo cual brindó información para determinar qué sustituyentes y en qué posición pueden ser utilizados para mejorar la afinidad para el diseño de futuros inhibidores de ADI.

Tabla 10. Energías de unión derivadas del *docking* de los compuestos diseñados para la serie C



Clave	R ₁	R ₂	R ₃	Energía de unión (Kcal/mol)	Clave	R ₁	R ₂	R ₃	Energía de unión (Kcal/mol)
C11	CH ₃	Cl	COOCH ₃	-8.01	C8	H	COOCH ₃	H	-7.37
C10	CH ₃	H	COOCH ₃	-7.92	C7	CH ₃	Cl	Cl	-7.26
C19	CH ₃	OCH ₂ CH ₃	Cl	-7.8	C14	H	OCH ₂ CH ₃	H	-7.22
C12	CH ₃	COOCH ₃	H	-7.7	C5	CH ₃	H	Cl	-7.02
C17	CH ₃	Cl	OCH ₂ CH ₃	-7.67	C6	CH ₃	Cl	H	-6.82
C16	CH ₃	H	OCH ₂ CH ₃	-7.67	C3	H	Cl	Cl	-6.82
C13	CH ₃	COOCH ₃	Cl	-7.65	C4	CH ₃	H	H	-6.52
C18	CH ₃	OCH ₂ CH ₃	H	-7.45	C2	H	Cl	H	-6.52
C9	H	COOCH ₃	Cl	-7.41	C1	H	H	H	-6.13
C15	H	OCH ₂ CH ₃	Cl	-7.4					

De igual manera todos los compuestos presentaron una conformación semejante en el sitio activo de la enzima introduciéndose por completo en la cavidad. En cuanto afinidad se refiere, los compuestos prácticamente superaron en afinidad al compuesto bencimidazólico CMC20. No hubo una tendencia clara entre los compuestos con hidrógeno o metilo en la posición 1, por lo que la presencia o ausencia de este sustituyente en esta posición no es relevante para la unión. En lo que respecta a los sustituyente en la posición 5 ó 6 muestran ser los responsables de la afinidad, en donde la tendencia en afinidad se establece por COOCH₃>OCH₂CH₃>Cl>H. Los compuestos con la presencia del grupo éster en su estructura presentaron la mayor afinidad, como lo fue la molécula C11, esto se debe a que el grupo éster se orienta de tal manera que interactúa con el grupo de residuos de Arg194, Arg245 y Arg278 mediante la formación de puentes de hidrógeno. Cuando el grupo éster es reemplazado por etoxilo la afinidad disminuye debido a que el oxígeno del grupo etoxilo no se orienta adecuadamente en la zona de los residuos de Arg194, Arg245 y Arg278. Finalmente, cuando el sustituyente se reemplaza por Cl o hidrógeno la afinidad disminuye significativamente, ya que estos sustituyentes solo presentan interacciones del tipo hidrofóbicas con los residuos del sitio.

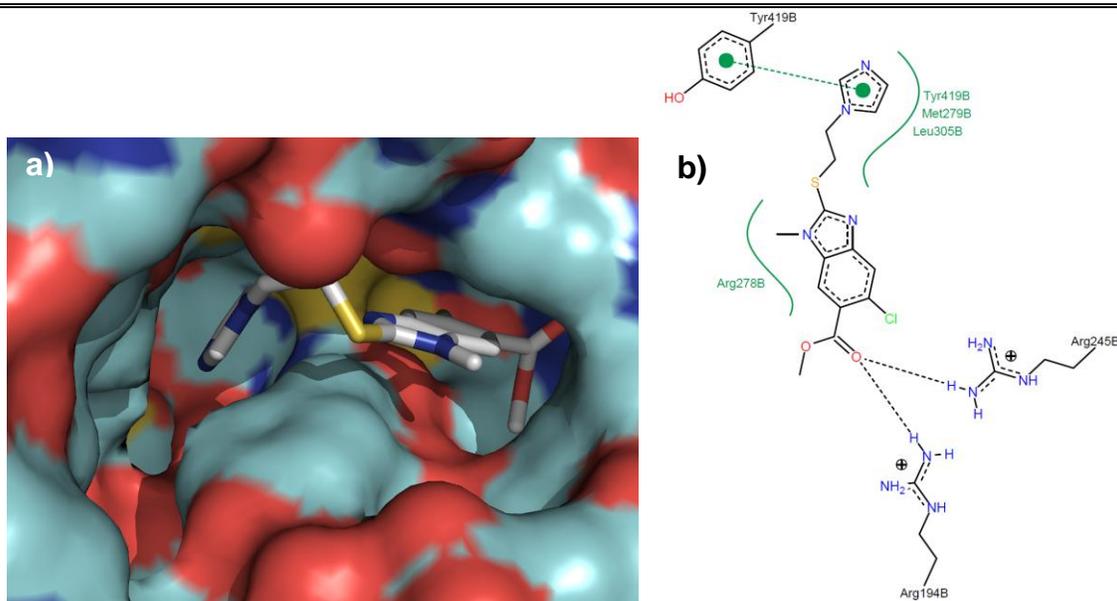


Figura 25. Modo de unión del compuesto C11 en la cavidad del sitio activo y residuos que participan en la estabilización.

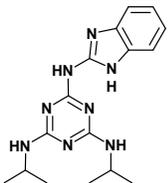
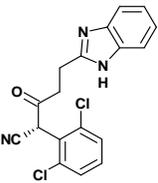
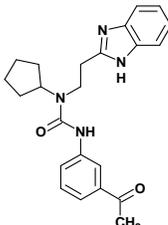
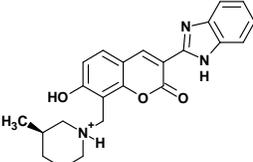
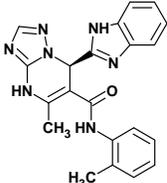
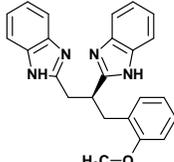
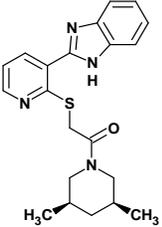
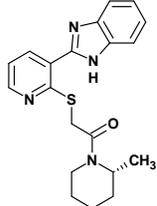
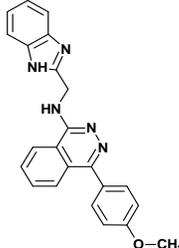
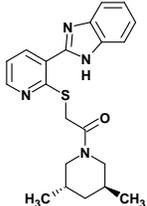
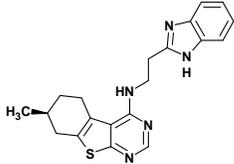
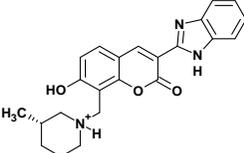
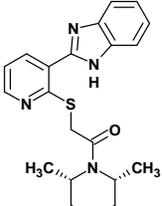
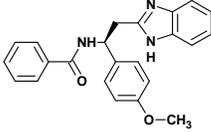
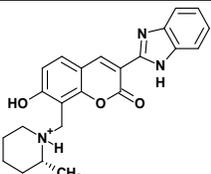
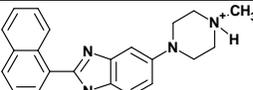
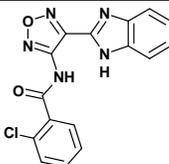
Este resultado indica que la presencia del carbonilo del grupo éster favorece de manera importante la afinidad por el sitio; por lo que en el caso de la serie sin sustituyentes en las posiciones 5 y/o 6 del núcleo de bencimidazol (serie B), la adición de una amida o un éster podría ayudar a mejorar de manera significativa su afinidad por el sitio activo.

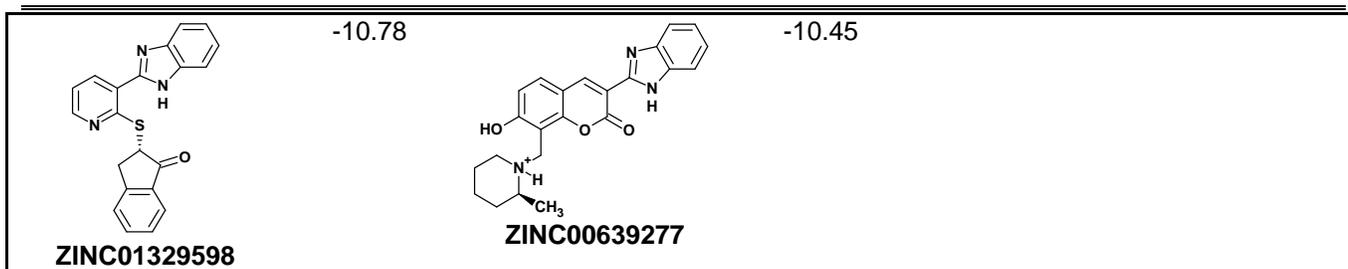
7.7.4. Virtual screening (serie D)

Adicional al diseño de compuestos inhibidores de la ADI, basados en compuestos híbridos del bencimidazol previamente sintetizados por nuestro grupo, también se evaluaron moléculas de bibliotecas públicas. Inicialmente se evaluó la biblioteca de EDULISS; sin embargo, los resultados obtenidos fueron en su mayoría moléculas del tipo azúcares, por lo que este resultado fue descartado y los resultados no se muestran.

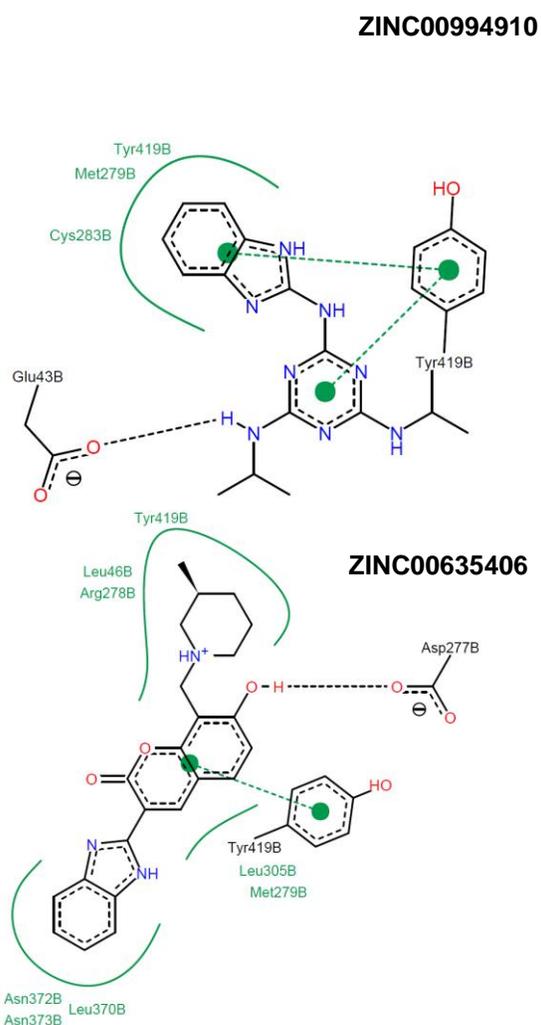
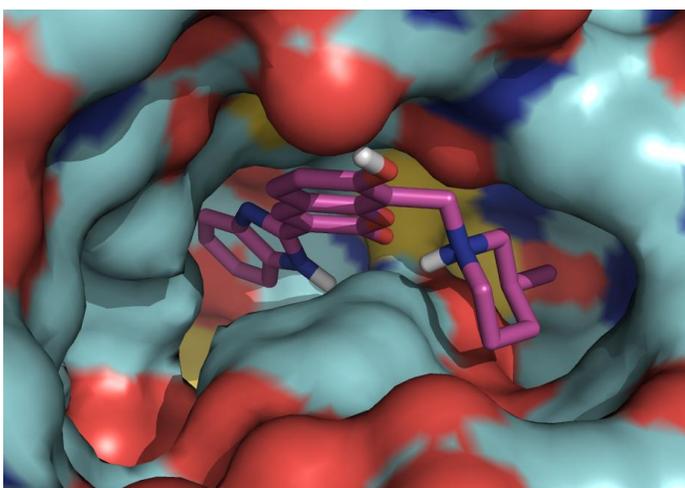
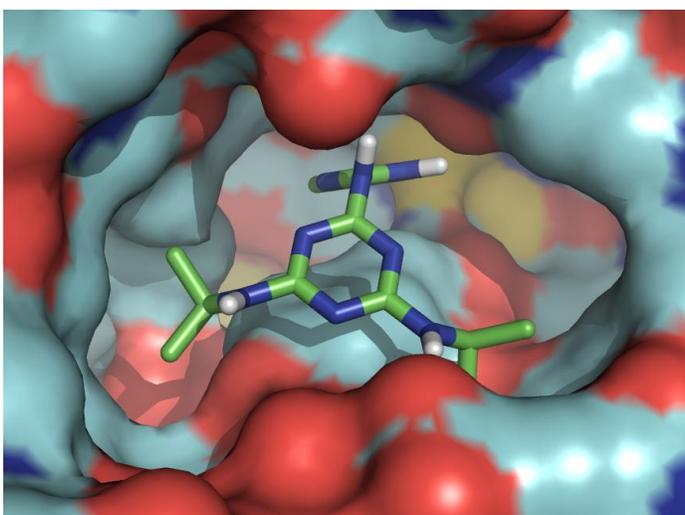
Por otra parte, se evaluó el modo de unión y la afinidad de una serie de compuestos, también bencimidazoles, de la biblioteca pública de ZINC con el fin de tener una amplia y variada cantidad de compuestos con potencial actividad inhibitoria sobre la ADI. Para ello se evaluaron 3196 moléculas utilizando el programa *AutoDock 4.2*, seleccionándose sólo las 20 estructuras con la menor energía de unión, la cuales se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Energías de unión de los 20 compuestos con mayor afinidad derivadas del *virtual screening* de la base de datos de ZINC

Molécula	Energía de unión (Kcal/mol)	Molécula	Energía de unión (Kcal/mol)	Molécula	Energía de unión (Kcal/mol)
 ZINC00994910	-11.36	 ZINC00644814	-10.71	 ZINC01360645	-10.43
 ZINC00635406	-11.11	 ZINC01426437	-10.62	 ZINC00824048	-10.41
 ZINC01329561	-11.07	 ZINC01329296	-10.61	 ZINC01097234	-10.41
 ZINC01425773	-10.96	 ZINC01329564	-10.56	 ZINC00957822	-10.41
 ZINC00635410	-10.96	 ZINC13086444	-10.50	 ZINC00636229	-10.4
 ZINC00639282	-10.91	 ZINC01390248	-10.50	 ZINC00211716	-10.35



Todas las moléculas presentaron energías de unión mucho menores (ligandos muy afines) por la ADI que las moléculas propuestas en lo puntos anteriores, mostrando un modo de unión muy semejante entre ellas en donde toda la estructura se introduce en la cavidad del sitio activo lo que permite una mayor interacción y por ende una mayor afinidad. Algunos ejemplos se muestran en la **Figura 26**.



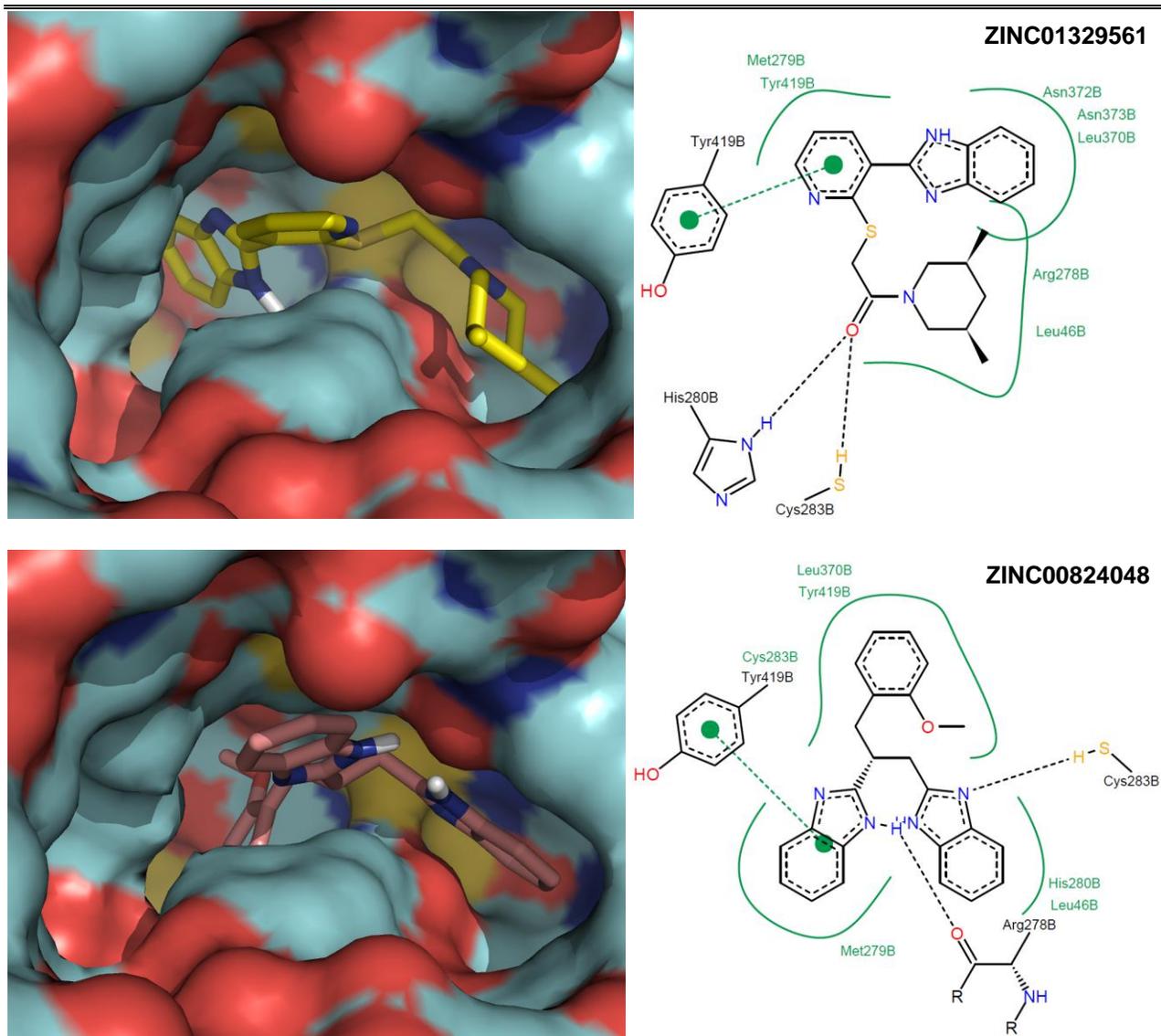


Figura 26. Representación de algunos acoplamientos de moléculas con mayor afinidad por la ADI de *G. intestinalis*.

De los 20 compuestos con mayor afinidad, resultantes del *virtual screening*, se puede observar que hay moléculas con el mismo núcleo base tales como: ZINC00635406, ZINC00635410, ZINC00639277 que tienen un núcleo de bencimidazol unido a una cumarina; o bien aquellos que tienen un bencimidazol unido a una piridina como en ZINC01329561 ó ZINC01329296. Esta característica es importante para la afinidad, ya que en general todas las moléculas se estabilizan, además de interacciones de puente de hidrógeno, por interacción de tipo π - π con el residuo Tyr419 que se encuentra en la zona de la cavidad de la interfaz, como se puede observar en las representaciones de la **Figura 26**.

Por otra parte, moléculas que presentan un centro quiral de configuración *S* en su estructura tiene mayor afinidad por la enzima. Así mismo, se puede observar que las 20 moléculas tienen hidrógeno en posición 1 del núcleo de bencimidazol, lo que sugiere que el hidrógeno en esta posición es importante ya que proporciona mayor oportunidad de generar puentes de hidrógeno con los residuos de la enzima, además de ser un átomo pequeño que no genera un impedimento estérico permitiendo la introducción del anillo de bencimidazol a la cavidad.

Este resultado nos permitió identificar otro tipo de sustituyentes complejos en el bencimidazol; así como la disposición de los mismos en la cavidad del sitio catalítico de ADI, lo dará a generar nuevas propuestas que permitan seguir con el diseño de inhibidores de la enzima.

7.8. Dinámica molecular de la ADI con ligandos

Esta técnica se empleó con el fin de confirmar la estabilidad de los complejos enzima-ligando de los compuestos con mayor afinidad de cada serie, a fin de validar los resultados del estudio de acoplamiento molecular.

En el **Gráfico 2** se muestra el resultado de la evaluación del comportamiento de los compuestos en la cavidad del sitio activo.

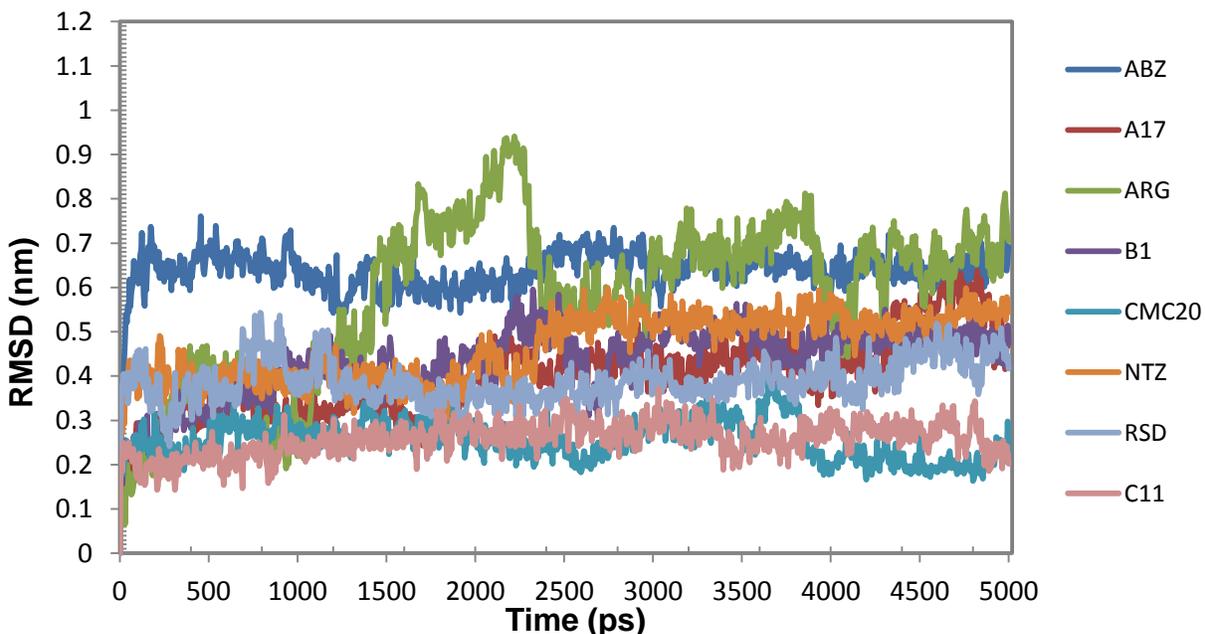


Gráfico 2. RMSD de los complejos enzima-ligando durante 5 ns de simulación.

El ligando natural arginina (ARG) presentó la mayor variación en el RMSD, esto se debe en primera instancia a que posee mayor número de enlaces rotables que le confiere más grados de libertad. Por otra parte, este incremento significativo también se debe a que en los primeros 500 ps de tiempo de la simulación la ARG reside en la cavidad del sitio activo y posteriormente es desplazada al exterior lo que se observa como un cambio significativo en el gráfico de RMSD. En cuanto a los fármacos de referencia considerados en este estudio, el albendazol (ABZ) presentó el mayor cambio en su posición y durante la simulación quedó en la interfaz del dímero; mientras que la nitazoxanida (NTZ) presentó un cambio ligeramente menor que el del ABZ, esto se debe a que la NTZ se introdujo más en la cavidad del sitio activo.

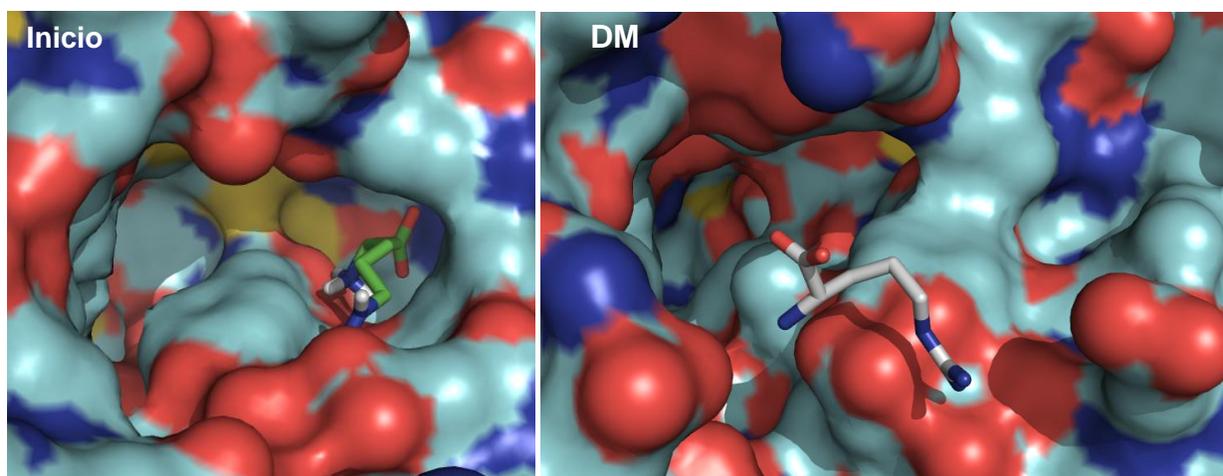


Figura 27. Acoplamiento de la arginina en diferentes tiempos de la dinámica molecular.

Los compuestos CMC20 y RSD8 no mostraron cambios importantes y se mantuvieron estables a lo largo de la simulación. En lo que respecta a los compuestos diseñados, A17 y B1 presentaron cambios significativos en su posición, este cambio correspondió a que ambos compuestos permanecieron en el sitio activo pero se introducen ligeramente más a la cavidad, lo que permite una mayor interacción con los residuos del sitio activo. Mientras que C11 permaneció estable durante el tiempo de la simulación, se estabilizó en la cavidad del sitio activo por la formación de puentes de hidrógeno del grupo éster de su estructura manteniendo estable al compuesto a lo largo de la simulación.

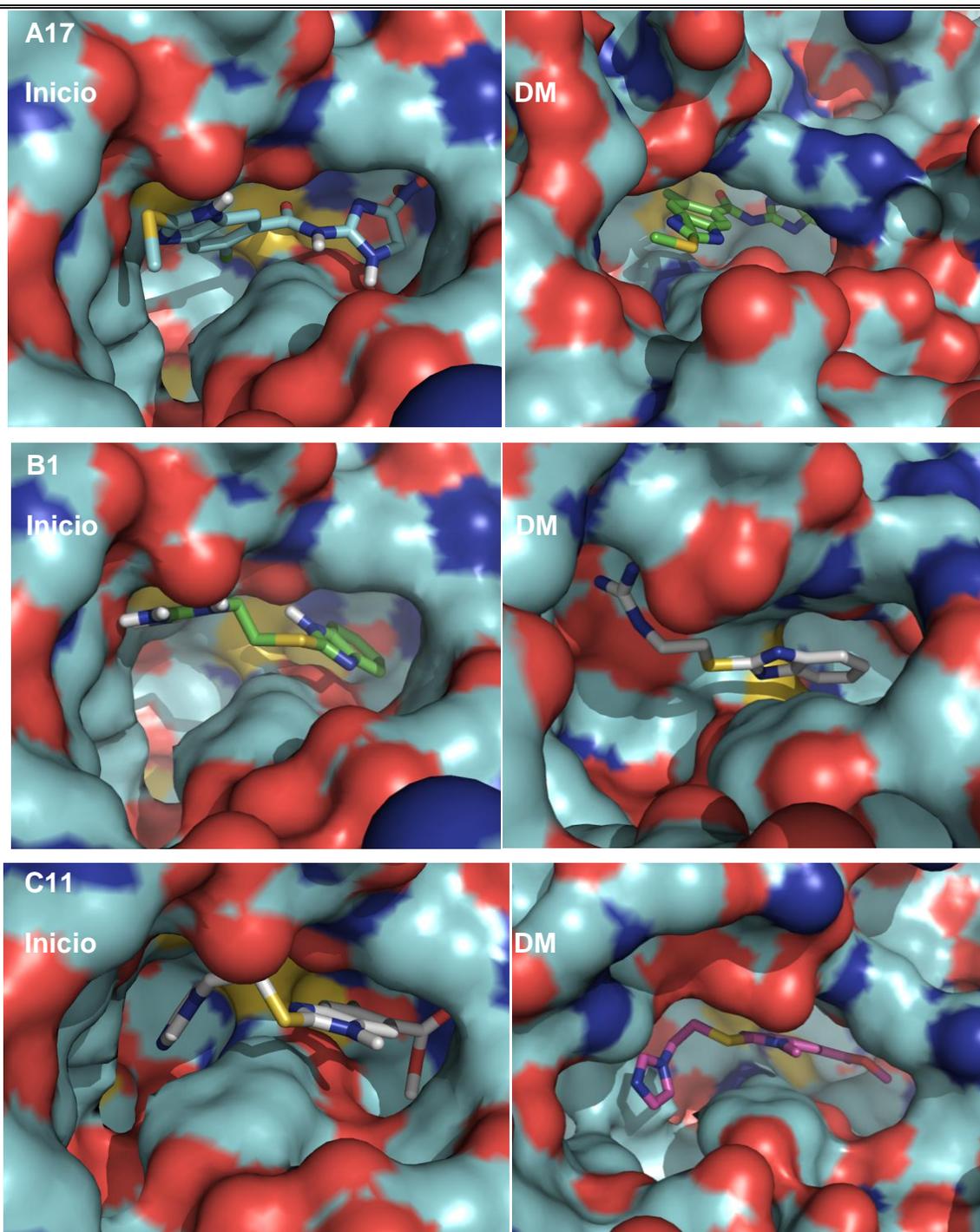


Figura 28. Acoplamiento de los compuestos que presentaron mayor afinidad de cada serie diseñada a diferentes tiempos de la simulación.

En la **Tabla 12** se muestra el resultado del análisis energético del estudio de *docking* y el de dinámica molecular con el fin de validar la similitud en el comportamiento de ambos métodos. Por otra parte, el **Gráfico 3** muestra el comportamiento energético de los ligandos en la enzima durante el tiempo de simulación.

Tabla 12. Análisis energético comparativo y de interacción obtenido del estudio de *docking* y de dinámica molecular para los complejos enzima-ligando

		Energía rescore GROMACS(kJ/mol)					Energía (kcal/mol)		
		$(V_L)_{bound}$	$(V_L)_{free}$	$(V_{CL})_{bound}$	$(V_{CL})_{free}$	ΔG_{bind}	ΔG_{bind}		
	ABZ	-84.3318	23.2353	0	0	-19.36	-4.63		
	A17	191.374	-6.20546	-71.3457	2.47833	-1.35	-0.32		
	ARG	29.7453	33.27528	-407.893	-12.1015	-198.53	-47.50		
	B1	87.8507	-19.0889	-101.056	-13.6886	-24.43	-5.85		
	CMC20	-38.9146	14.3673	-68.0548	-18.5349	-34.35	-8.22		
	NTZ	-153.822	-19.0762	-59.9591	5.40759	-56.94	-13.62		
	RSD	60.123474	56.021729	4.161104	-8.982773	7.31	1.75		
	C11	-116.611633	-17.728382	-72.67939	-8.13016	-50.07	-11.98		
	B1	-7.81							
	CMC20	-7.09							
	NTZ	-6.65							
	RSD	-5.18							
	C11	-8.01							
ADT4.2 (kcal/mol)		Energía promedio MD (kJ/mol)					Energía (kcal/mol)		
Compuesto	ΔG_{bind}	$(V_L)_{bound}$	$(V_L)_{free}$	$(V_{CL})_{bound}$	$(V_{CL})_{free}$	ΔG_{bind}	ΔG_{bind}	NPH	
ABZ	-7.77	-111.7871	-49.73	0	0	-11.17	-2.67	0	
A17	-9.17	-183.253	-20.9256	-51.4397	-93.1459	-8.37	-2.00	2	
ARG	-7.96	-36.3215	-11.1176	-94.3535	-280.052	88.31	21.13	1	
B1	-7.81	-124.165	-25.1421	-53.6849	-34.689	-27.32	-6.54	1	
CMC20	-7.09	-172.439	-36.4426	-18.5798	-80.2513	6.36	1.52	1	
NTZ	-6.65	-161.993	-22.4436	-29.6863	-43.3455	-18.29	-4.38	1	
RSD	-5.18	-105.197	-21.203	-8.8174	-25.6388	-6.71	-1.60	0	
C11	-8.01	-178.075	-23.342	-22.0213	-62.5805	-7.57	-1.81	1	

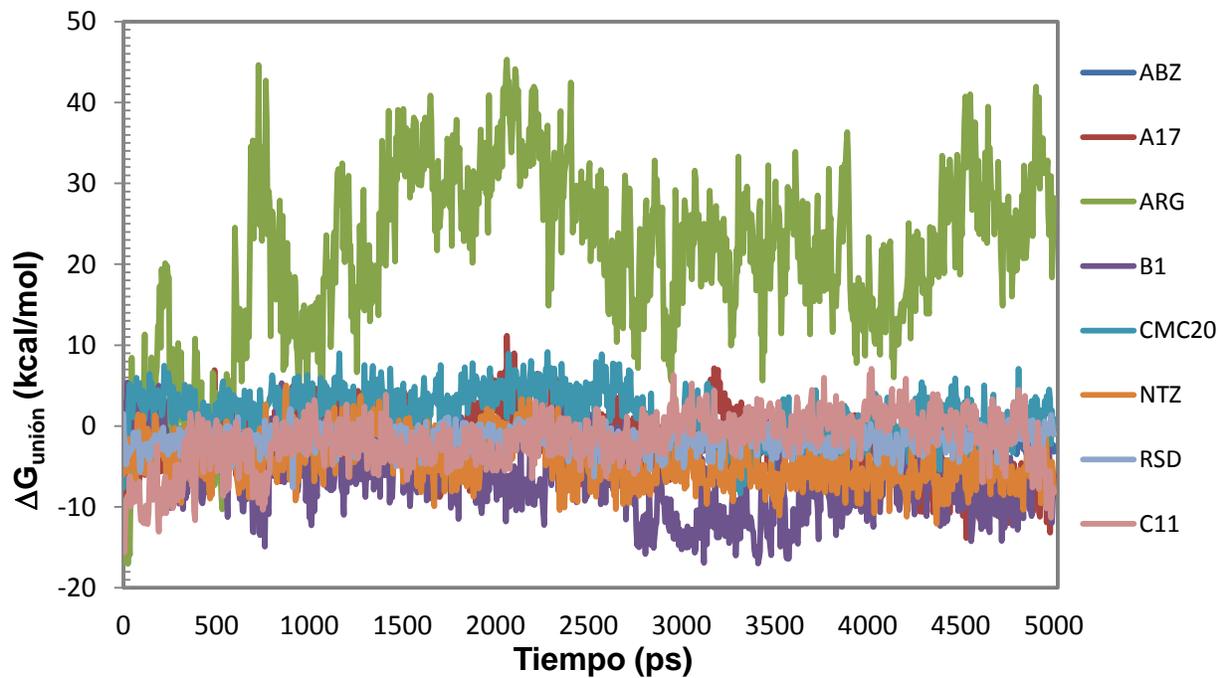


Gráfico 3. Comportamiento de la energía de unión de los ligando en la ADI durante el tiempo simulación.

El análisis comparativo de energía de unión del *docking* y el *rescore* obtenido de la dinámica molecular no mostró similitud, pero si una misma tendencia en afinidad para los ligandos estudiados. Esto se debe a que *AutoDock* utiliza valores parametrizados de solvatación, mientras que en GROMACS se utiliza solvente explícito permitiendo determinar la energía de solvatación por separado del ligando, la enzima y del complejo enzima-ligando.

Como se puede observar en el **Gráfico 3**, al inicio de la dinámica la ARG presentó valores de energía muy bajos (ligando muy afín por la ADI), lo cual era de esperarse ya que es el sustrato natural de la enzima. Posteriormente, a través del tiempo de simulación, hay un cambio importante en el perfil de energía pasando a valores positivos de energía de unión indicando la disminución en la afinidad. Este comportamiento es semejante al que presentó la ARG en su RMSD, **Gráfico 2**.

Una explicación a este comportamiento puede fundamentarse con ayuda de la bioquímica. Se sabe que los procesos biocatalíticos proceden en escala de tiempos de femtosegundos (10^{-15} s). Por otra parte, datos experimentales de cinética enzimática de la ADI muestran valores de $K_m = 0.16 \mu\text{M}$ y una $V_{max} = 550 \text{ nmol/min}$,^{45,47} indicando que la ADI tiene una alta afinidad por su sustrato arginina y una rápida velocidad de hidrólisis de la misma.

El programa GROMACS sólo simula movimientos de los átomos con base en la mecánica molecular; sin embargo, no es capaz de simular mecanismos de reacción, como el de la transformación de arginina a citrulina, los cuales requieren de cálculos de tipo *ab initio*. Esto puede explicar el comportamiento de la ARG en su perfil energético y de cambio en su posición. Inicialmente en la simulación la ADI reconoce a la ARG con una gran afinidad; sin embargo, al no poderse simular la transformación, la enzima presenta un cambio conformacional que hace que la ARG salga del sitio activo, lo cual se manifiesta como un gran cambio en su posición y a su vez en su energía de unión.

En lo que respecta a los ligandos estudiados, éstos no presentaron fluctuaciones importantes en su energía de unión. Los compuestos A17, B1 y C11 mostraron a lo largo de la simulación energías de unión negativas, indicando afinidad por la enzima. El compuesto B1 fue el que presentó la mejor afinidad seguido de A17, mientras que C11 presentó la menor variación en su energía durante la simulación.

7.9. Estudios de acoplamiento molecular en las enzimas OTC y CK de *G. intestinalis*

Para complementar este trabajo, se realizó un estudio para determinar si las enzimas OTC y CK de *G. intestinalis* también son blancos “*druggable*” y uno de acoplamiento molecular para encontrar moléculas con afinidad por estas enzimas.

7.9.1. Determinación de la *Druggability* en la OTC y CK

Con ayuda del programa *VolSite* se determinó la posibilidad de que estas enzimas, presentes en la vía de la arginina dehidrolasa, también pudieran ser blanco para el diseño de fármacos. En la **Figura 29** se muestra el resultado de la evaluación en cada enzima.

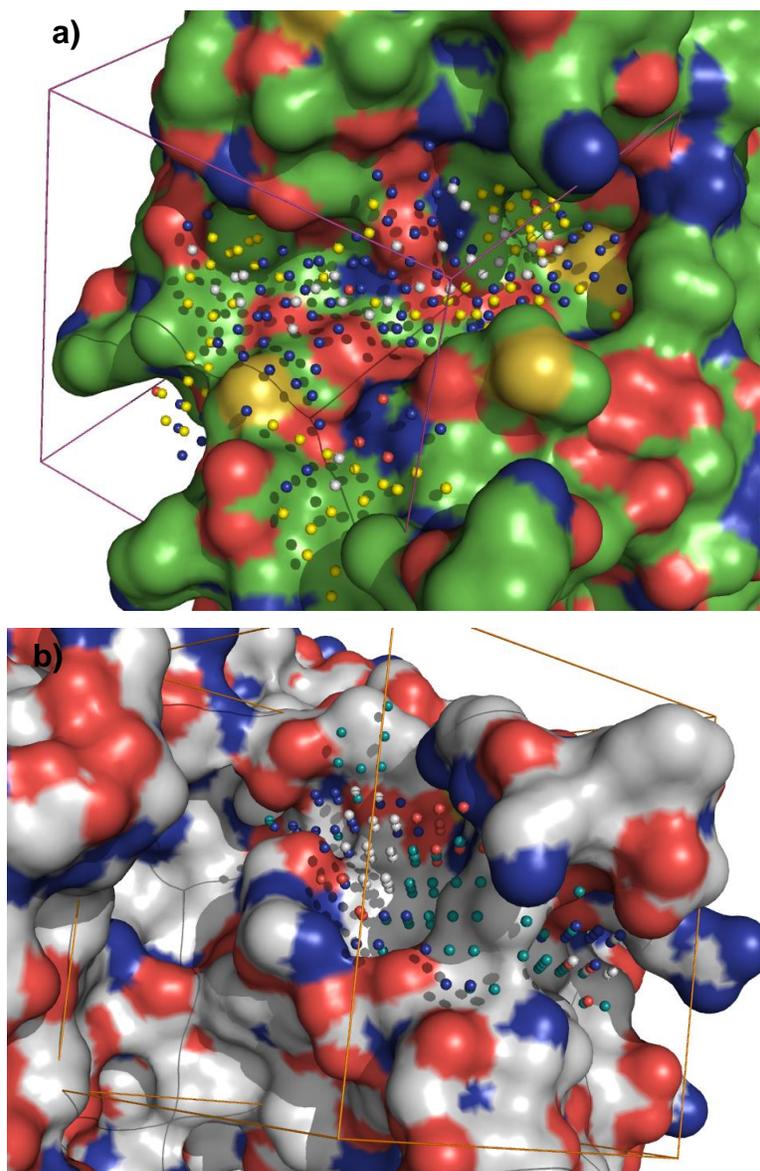


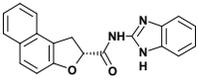
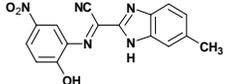
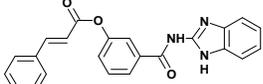
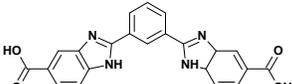
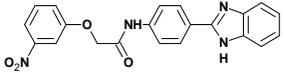
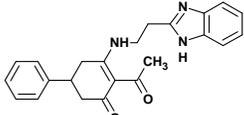
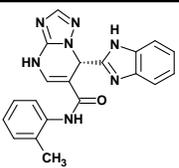
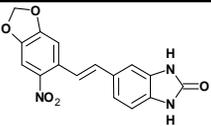
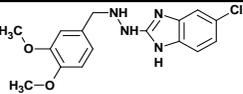
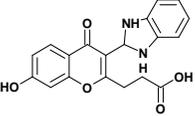
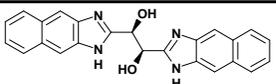
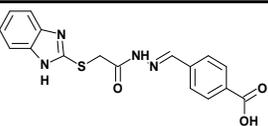
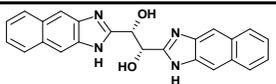
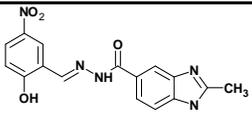
Figura 29. Propiedades que presenta la cavidad del sitio activo en la OTC (a) y CK (b) para la unión de ligandos, representados en esferas de color: azul (donador de puente de hidrógeno), rojo (aceptor de puente de hidrógeno), amarillo o verde (hidrofóbico), blanco (exposición al solvente).

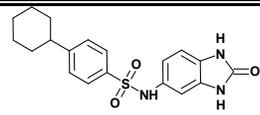
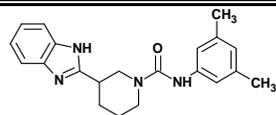
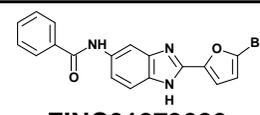
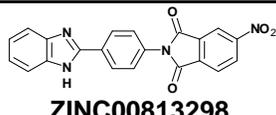
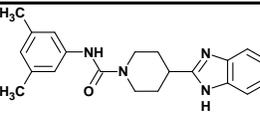
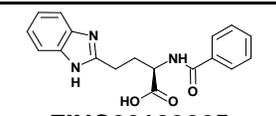
Se obtuvieron valores de 0.906 para la OTC y 1.35 para la CK, lo que indicó que ambas enzimas son *druggable*, por lo que la OTC y CK se pueden considerar blancos macromoleculares para el diseño de fármacos.

7.9.2. Estudios de acoplamiento molecular

Se evaluó la biblioteca de compuestos bencimidazólicos obtenidos de la base de datos pública de ZINC en cada enzima. Los resultados de los mejores 10 compuestos se muestran en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Energías de unión de los 10 compuestos con mayor afinidad derivadas del *virtual screening* de la base de datos de ZINC para cada enzima

Molécula	Energía de unión OTC (Kcal/mol)	Molécula	Energía de unión CK (Kcal/mol)
	-9.00	 ZINC00807078	-8.74
 ZINC33334296	-8.87	 ZINC00984684	-8.45
 ZINC01132669	-8.69	 ZINC01425773	-8.19
 ZINC01426437	-8.67	 ZINC01426437	-8.16
 ZINC00274340	-8.61	 ZINC00038207	-8.12
 ZINC01456628	-8.42	 ZINC00863778	-8.01
 ZINC01456629	-8.38	 ZINC00064008	-7.96

 ZINC01061379	-8.27	 ZINC01358412	-7.96
 ZINC01273026	-8.16	 ZINC00813298	-7.89
 ZINC01326451	-8.14	 ZINC00189065	-7.88

La evaluación de las moléculas se realizó en el sitio activo de cada una, con el fin de inhibir su función. Para la enzima OTC las moléculas se acoplaron a lo largo de la cavidad del sitio activo estabilizando principalmente por interacciones hidrofóbica y de Van der Waals.

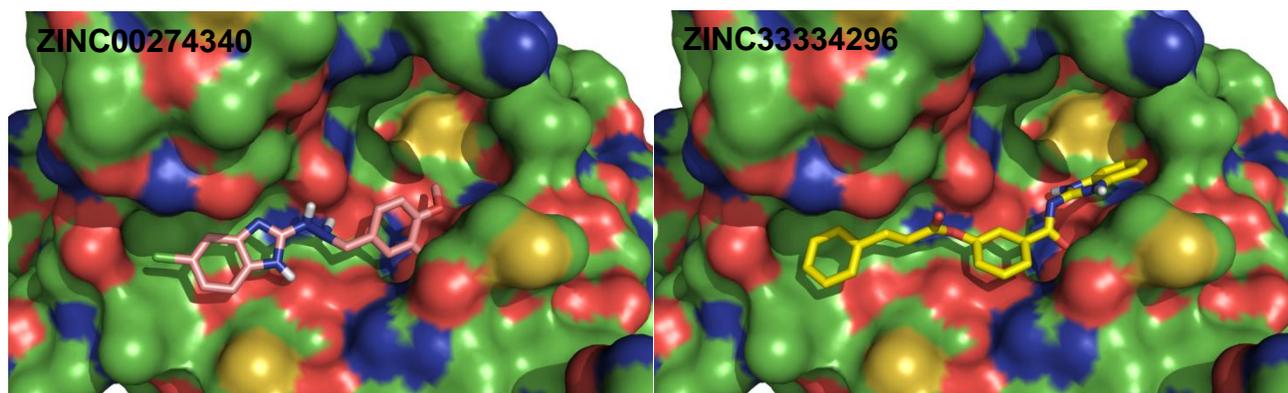


Figura 30. Acoplamiento de las moléculas en el sitio activo de la enzima OTC.

En el caso de la enzima CK los resultados de energía son buenos, sin embargo no todas las moléculas se unieron al sitio activo de la enzima. Las moléculas que se unieron al sitio activo de la enzima muestran como característica común la presencia de un grupo carboxilato en su estructura, este grupo es considerado un isómero del grupo fosfato, grupo presente en la estructura del carbamoilfosfato, sustrato de la CK, por lo que puede ser reconocido por los residuos Lys131, Lys216 y 278 presentes en el sitio activo. La modificación estructural por isómeros del grupo fosfato puede permitir el diseño de nuevos inhibidores con gran afinidad por la enzima CK.

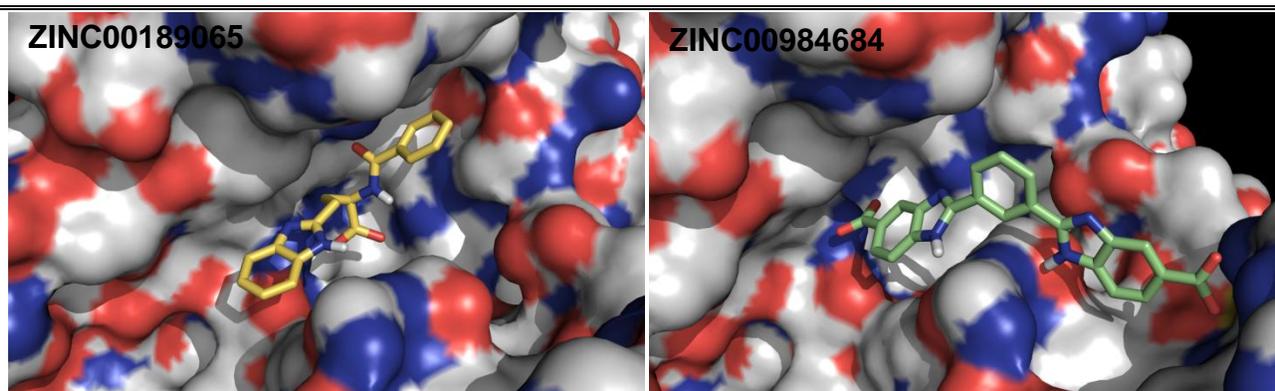


Figura 31. Modo de unión de los compuestos que mostraron acoplamiento en el sitio activo de la enzima CK.

Cabe resaltar que no se obtuvieron moléculas afines por ambas enzimas; y tampoco ninguna de las estructuras afines por OTC y CK mostró afinidad por la ADI.

A la fecha no hay reportes de evaluación de moléculas realizados por *virtual screening* para encontrar inhibidores de OTC y CK. Las estructuras cristalográficas de estas enzimas se reportaron recientemente^{117,118} esto brinda una gran oportunidad para el diseño y/o optimización de inhibidores.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió generar un modelo teórico de la estructura del monómero y dímero de la enzima arginina deiminasa de *G. intestinalis* mediante el uso de la técnica computacional de modelado por homología.

El uso de diversos servidores de búsqueda de secuencias de aminoácidos como Bioinformatics Toolkit, PDB/BLAST o EMBL-EBI permitió obtener mayor correlación con la secuencia usada como *plantilla* y a su vez identificar los aminoácidos que participan en el mecanismo catalítico de la enzima. Así mismo, el emplear servidores y programas de modelado por homología para la generación de múltiples modelos estructurales de la enzima dio como resultado la generación del mejor modelo estructural de ADI, con base en los parámetros de validación.

El acortamiento de la secuencia de la ADI de *G. intestinalis* hasta una secuencia de 435 aa permitió generar modelos más confiables; comprobando con ello desde el punto de vista teórico, que la porción C-terminal eliminada no es fundamental para la actividad de la enzima y a que esta región, como se demostró, no participa en el sitio activo ni en la formación del dímero. La secuencia 2A9G de la ADI de *P. aeruginosa* fue la que presentó la mayor identidad con la ADI de *G. intestinalis*, con una identidad del 22%; y a su vez esta estructura se repitió en los servidores empleados para la búsqueda de secuencia homólogas. El programa *Modeller*, utilizando la secuencia 2A9G, generó el mejor modelo estructural del monómero de ADI de *G. intestinalis*.

La calidad de los modelos se evaluó de manera estricta para cada uno, con la finalidad de tener un modelo confiable. Adicionalmente, la determinación de la estructura secundaria permitió establecer que la predicción de la estructura secundaria en una proteína es una opción más de validación en modelos estructurales.

Actualmente no se cuenta con más estructuras cristalográficas de ADI reportadas. A pesar de ello, el estudio realizado nos brinda una aproximación aceptable de la estructura de la enzima útil para estudios de acoplamiento molecular. Los aminoácidos presentes en el sitio activo de la ADI de *G. intestinalis* muestran una conformación similar a la de otras enzimas ADI reportadas cuando el ligando natural, arginina, se encuentra en el sitio activo. Así mismo, la estructura terciaria y cuaternaria también presenta una conformación similar a otras ADI reportadas.

Con ayuda del programa de *VolSite* se reafirmó la importancia que tiene la ADI para el diseño de fármacos, ya que la enzima resultó ser una blanco *druggable*.

El estudio de dinámica molecular determinó que el modelo estructural del dímero es estable durante 35 ns de tiempo de la simulación, corroborando la calidad y metodología empleada para su obtención.

El mejor modelo de la enzima explicó en un estudio de acoplamiento molecular que el compuesto CMC20 se une a la enzima ADI en el sitio activo con buena afinidad y mejor que CMC12 y CMC19, lo que comprueba la hipótesis de que este tipo de compuestos deben su actividad giardicida a la inhibición de la enzima. Esto deberá comprobarse por la evaluación de la inhibición enzimática experimentalmente.

Se propusieron tres series de compuestos, obtenidas a partir de modificaciones moleculares o por semejanza estructural con el CMC20 para ser evaluados por *docking* con la enzima modelada. En las tres series se encontraron compuestos con mejor afinidad por la ADI que el compuesto líder y en el que prácticamente todas las moléculas estudiadas se introducen al sitio activo. Adicionalmente, el estudio de *virtual screening* permitió encontrar otros derivados bencimidazólicos con alta afinidad por la enzima, superando a las diseñadas y estudiadas.

Los estudios de dinámica molecular permitieron validar los resultados del *docking* de compuestos bencimidazólicos activos contra *G. intestinalis* y de los compuestos diseñados. El compuesto CMC20 se mantiene sin mayores cambios en su posición en la cavidad del sitio activo; sin embargo, su energía de unión no correlacionó con la obtenida del *docking* y su afinidad por la enzima disminuyó a lo largo de la simulación. En cambio los compuestos diseñados A17, B1 y C11 mostraron buena afinidad por la enzima y permanecieron en el sitio activo. Este estudio permite suponer que los compuestos diseñados pueden ser mejores inhibidores que los compuestos que les dieron origen, tales como el CMC20.

Se determinó que las enzimas OTC y CK también son blancos para el diseño de fármacos, ya que además de ser esenciales para el metabolismo de la arginina, también presentan características adecuadas para la unión de moléculas que permitan su inactivación. Así mismo, en este trabajo se realizó el primer estudio de *virtual screening* para encontrar inhibidores en estas enzimas.

9. PERSPECTIVAS

Modelar mediante dinámica molecular el plegamiento de la porción C-terminal de la ADI de *G. intestinalis* para determinar la estructura que adopta y a su vez determinar la importancia que tiene esta estructura en la enzima.

Evaluar mediante *docking* la serie B con la presencia del grupo éster o amida en la posición 5(6) del anillo de bencimidazol ya que esto puede ayudar a la afinidad por la ADI.

Evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos diseñados mediante estudios de inhibición enzimática sobre la ADI para validar el modelo.

Evaluar mediante acoplamiento molecular las series diseñadas para ADI en las enzimas OTC y CK para encontrar un compuesto que pueda inhibir por lo menos a dos enzimas presentes en la vía de la arginina dehidrolasa. Así mismo, evaluar otras bibliotecas de compuestos que permita identificar o bien sirvan para el diseño de compuestos giardicidas.

10. BIBLIOGRAFÍA

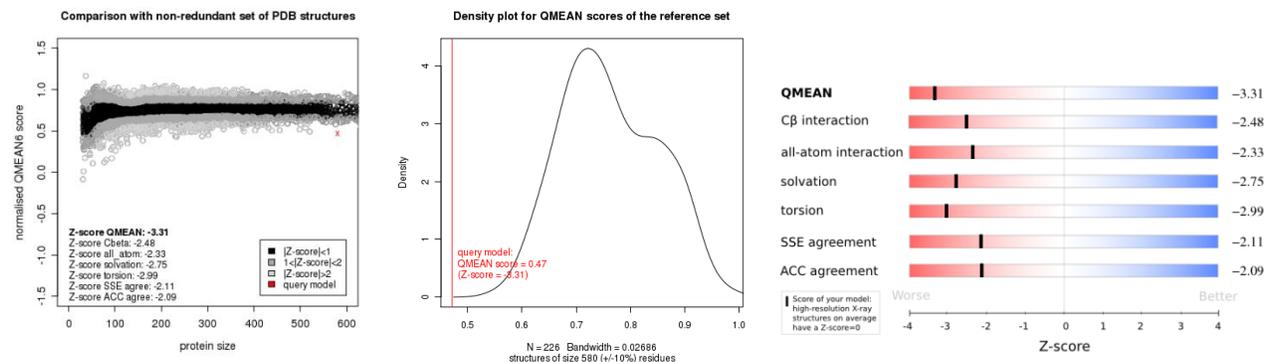
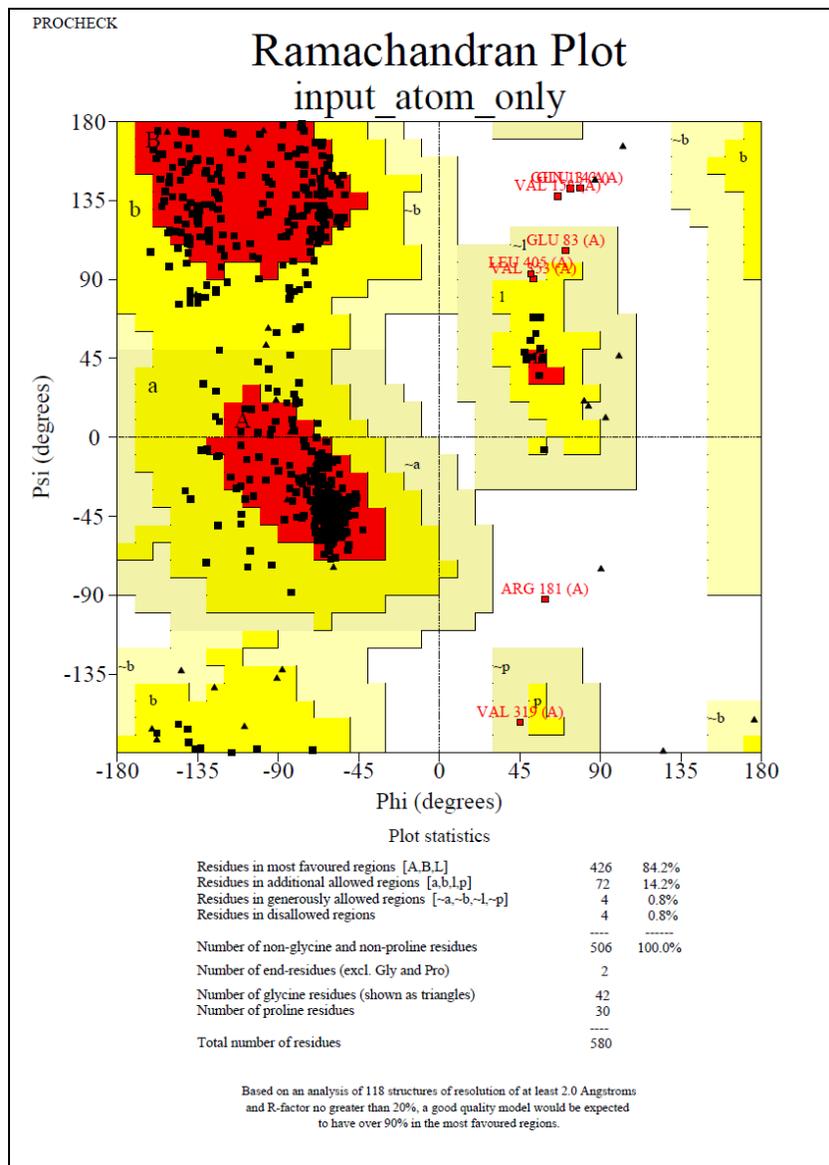
1. Ali, S.A; Hill, D.R. *Giardia intestinalis*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, 16, 453-460.
2. Ortega, Y.R; Adam, R.D. *Giardia*: overview and update. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, 25, 545-549.
3. Macpherson, C.N. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonosis. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 25, 1319-1331.
4. Flanagan, P.A. *Giardia*-diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol. Infect.* **1992**, 109, 1-22.
5. Reporte de vigilancia epidemiológica SSA. Enero **2012**.
6. Ximénez-García, C. Las parasitosis intestinales en México. cuadernos FUNSALUD. **2010**, 36, 24-27.
7. Rendtorff, R.C. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. *Giardia lamblia* cyst given in capsules. *Am. J. Hyg.* **1954**, 59, 209-220.
8. Vesny, C.J; Peterson, W.L. Review article: the management of Giardiasis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, 13, 843-850.
9. Adam, R.D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 447-475.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/> consultada abril 2013.
11. Lujan, H.D.; et al. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, 61, 294-304.
12. Gillin, F.D.; et al. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, 50, 679-705.
13. Upcroft, J.; Upcroft, P. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays*. **1998**, 20, 256-263.
14. Brown, D.M.; et al. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Giardia duodenalis*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 155-161.
15. Schofield, P.J.; et al. The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. *Int. J. Parasitol.* **1990**, 20: 697-699.
16. Paget, T.A.; et al. *Giardia lamblia* produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, 42: 63-67.
17. Paget, T.A.; et al. The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, 57: 65-71.
18. Edwards, M.R.; et al. Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, 37: 19-26.
19. Schofield, P.J.; et al. Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, 45: 39-47.
20. Jarroll, E.L.; et al. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, 2: 187-196.
21. Hernell, O.; et al. Killing of *Giardia lamblia* by human milk lipases: an effect mediated by lipolysis of milk lipids. *J. Infect. Dis.* **1986**, 153: 715-720.
22. Reiner, D.S.; et al. Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J. Infect. Dis.* **1986**, 154: 825-832.
23. Park, J.H.; et al. *Giardia intestinalis*: volume recovery in response to cell swelling. *Exp Parasitol.* **1997**, 86: 19-28.
24. Knodler, L.A.; et al. The intracellular amino acid pools of *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*, and *Crithidia luciliae*. *Exp. Parasitol.* **1994**, 79: 117-125.
25. Schofield P.J.; et al. The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, 51, 29-36. Farthing, M.J. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1997**, 24, 79-88.
26. Gardner, T.B.; Hill, D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 114-128.
27. Townson S., et al. Resistance to the nitroheterocyclic drugs. *Acta Tropica.* **1994**, 56, 173-194.
28. Darbon, A.; et al. Traitement de la giardiose (lambliose) par le metronidazole. *Presse Med.* **1962**, 70, 15-16.
29. Gardner, T.B.; Hill, D.R. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 114-128.
30. Boreham, P. F. L.; et al. The sensitivity of *Giardia intestinalis* to drugs in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **1984**, 14, 449-461.
31. Lerman, S. J.; Walker, R.A. Treatment of giardiasis. Literature review and recommendations. *Clin. Pediatr.* **1982**, 21, 409-414.
32. Rossignol, J.F.; Cavier, R. New derivative of 2-benzamido-5-nitrothiazoles. *Chem. Abstr.* **1975**; 83:28216n.
33. Boreham, P.F.; et al. A comparison of the in-vitro activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Giardia intestinalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1985**, 16, 589-595.
34. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* **1992**, 37, 221-224.

35. Chávez, B.; *et al.* Giardia lamblia: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J. Protozool.* **1992**, 39, 510-515.
36. Chávez, B.; *et al.* Effects of albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch. Med. Res.* **1992**, 23, 63-67.
37. Edlind, T. D., *et al.* Activity of the anthelmintic benzimidazoles against *Giardia intestinalis* in vitro. *J. Infect. Dis.* **1990**, 162, 1408–1411.
38. Edwards, M.R.; *et al.* Arginine metabolism during culture of *Giardia intestinalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, 53, 97-103.
39. Knodler, L. A.; *et al.* L-Arginine transport and metabolism in *Giardia intestinalis* support its position as a transition between the prokaryotic and eukaryotic kingdoms. *Microbiol.* **1995**, 141, 2063-2070.
40. Palm, J.E.; *et al.* Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J. Infect. Dis.* **2003**, 187(12), 1849-1859.
41. Ringqvist, E.; *et al.* Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, 159, 85-91.
42. Stadelmann, B.; *et al.* Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PLoS one.* **2012**, 7 (9), 1-11.
43. Linsky, T.; Fast, W. Mechanistic similarity and diversity among the guanidine-modifying members of the penten superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, 1804, 1943-1953.
44. Knodler, L. A.; *et al.* *Giardia intestinalis*: purification and partial amino acid sequence of arginine deiminase. *Exp. Parasitol.* **1997**, 85, 77-80.
45. Knodler, L.A. *et al.* Cloning and expression of a prokaryotic enzyme, arginine deiminase, from a primitive eukaryote *Giardia intestinalis*. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 4470-4477.
46. Li, Z.; *et al.* Mechanisms of catalysis and inhibition operative in the arginine deiminase from the human pathogen *Giardia lamblia*. *Bioorg. Chem.* **2009**, 37, 149-161.
47. Rópolo, A.S; Touz, M.C. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal.* **2010**, 10, 2019-2031.
48. Touz, M.C.; *et al.* Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* **2008**, 121, 2930–2938.
49. Prucca, C.G.; Lujan, H.D. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell. Microbiol.* **2009**, 11, 1706-1715.
50. Campbell, W. C. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol. Today.* **1990**, 6, 130-133
51. Cook G. C. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiasis: indications and efficacy. *Parasitol. Today*, **1990**, 6, 133-136.
52. Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today*, **1990**, 6, 112-115
53. Martin R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* **1997**, 154, 11-34.
54. Valdez J., *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2221–2224.
55. Navarrete-Vázquez, G.; *et al.* Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 4615-4622.
56. Valdez-Padilla, D.; *et al.* Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1724-1730.
57. Méndez-Cuesta, C. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-Cloro-2(metiltio)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Tesis Licenciatura, Facultad de Química UNAM, 2005.
58. Gres-Molina, J.E. Síntesis de nuevos derivados del 2-(triflurometil)-1H-bencimidazol con posible actividad antiparasitaria. Tesis Licenciatura, Facultad de Química UNAM, 2007.
59. Sánchez-Díaz, M.R. Síntesis de derivados del 1-metilbencimidazol con actividad antihelmíntica. Tesis Maestría (Ciencias Químicas), Facultad de Química UNAM, 1999.
60. Zhang, Y. Progress and challenges in protein structure prediction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, 18(3), 409-427.
61. Cavassotto, C.N.; Phatak, S.S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today.* **2009**, 14, 676-683.
62. Krieger, E.; *et al.* Homology Modeling. *Structural Bioinformatics*, Chapter 25. **2003**.
63. Wallner, B. & Elofsson, A. All are not equal: A benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci.* **2005**, 14, 1315-1327.
64. Kichen, D.B.; *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 935-949.
65. Halperin I., *et al.* Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins.* **2002**, 47, 409–443

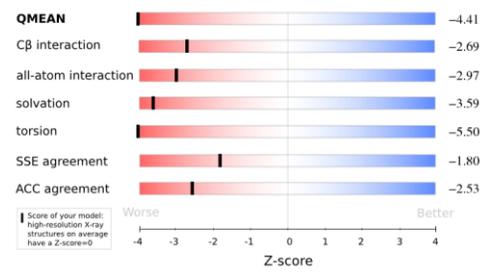
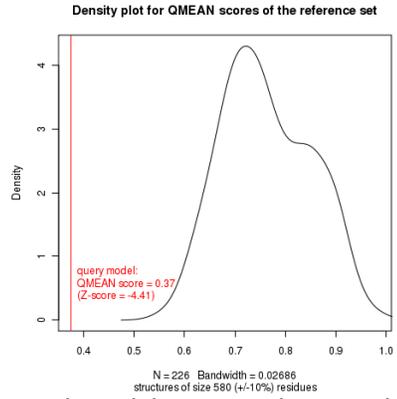
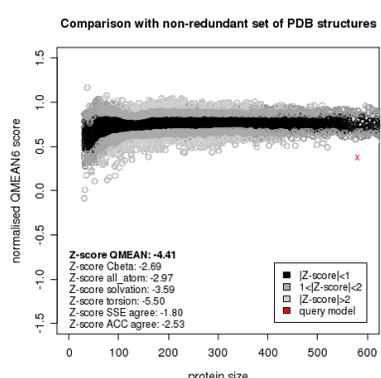
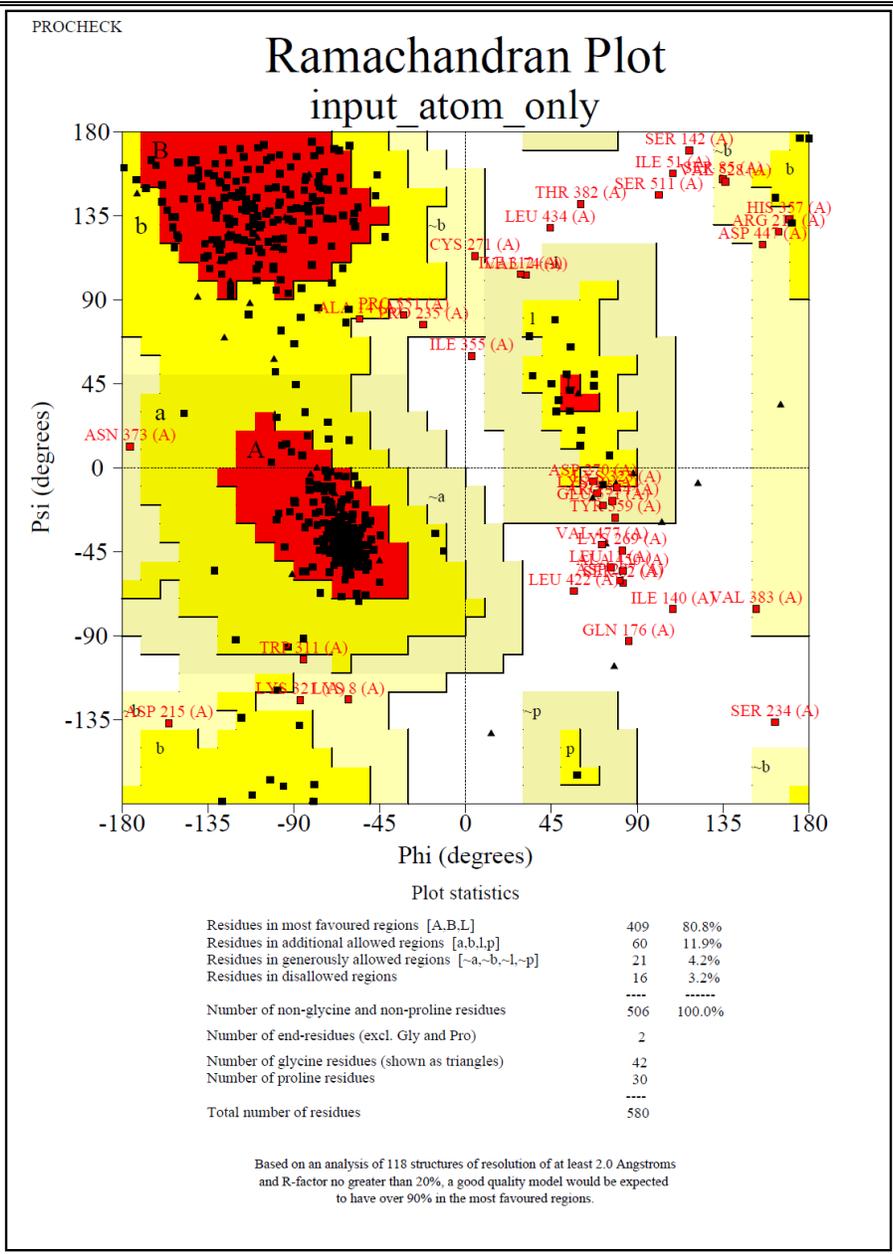
66. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today*. **2006**, 11, 580-594.
67. Shoichet B. K. Virtual screening of chemical libraries. *Nature*. **2004**, 432, 862-865.
68. Lengauer T., *et al.* Novel technologies for virtual screening. *Drug Discov. Today*. **2004**, 9, 27-34.
69. Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/glance/ourmission.html> [Consulta: agosto de 2012]
70. Biegert, A.; *et al.* The MPI Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 335-339.
71. Altschul, S.F.; *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3389-3402.
72. Stoesser, G.; *et al.* The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25(1): 7-14.
73. Chenna, R.; *et al.* Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31 (13), 3497-3500.
74. Arnold, K.; *et al.* The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*. **2006**, 22, 195-201.
75. Kelley, L.A.; Sternberg, M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protoc.* **2009**, 4 (3), 363-371.
76. Bennett-Lovsey, R.M.; *et al.* Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins*. **2008**, 70 (3), 611-25.
77. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. **2008**, 9:40, 1-8.
78. Roy, A.; *et al.* I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (4), 725-738.
79. Kim, D.E.; *et al.* Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 526-531.
80. *Modeller 9v10*, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA.
81. Fiser, A.; *et al.* Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci.* **2000**; 9, 1753-1773.
82. Bates, P.A.; *et al.* Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins*. **2001**, suppl. 5, 39-46.
83. Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **1990**, 8 (1), 29.
84. Van der Spoel D.; *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1701, 1718.
85. *GROMACS v4.5.3*, University of Groningen, Groningen, Netherlands.
86. Van Gunsteren, W.F.; *et al.* Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zurich, Zurich, Switzerland. **1996**, 1-1042.
87. Scott, W.R.P.; *et al.* The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem.* **1999**, 103 (19), 3596-3607.
88. *PyMOL v0.99*, DeLano Scientific LLC, South San Francisco, California, USA.
89. Laskowski, R.A.; *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures *J. App. Cryst.* **1993**, 26, 283-291.
90. Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. PROMOTIF - A program to identify structural motifs in proteins. *Protein Science* 1996, 5, 212-220.
91. Green, J.R.; *et al.* PCI-SS: MISO dynamic non linear protein secondary structure prediction. *BMC Bioinformatics*. **2009**, 10:222.
92. Raghava, G. P. S. APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5*. **2002**, A-132.
93. Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, 292 (2), 195-202.
94. Cheng, J. *et al.* SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 72-76.
95. Cao, B.; *et al.* Enhanced Recognition of Protein Transmembrane Domains with Prediction-based Structural Profiles. *Bioinformatics*. **2006**, 22, 303-309.
96. Geourjon, C.; Deleage, G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.* **1995**, 11(6), 681-684.
97. Sen, T.Z.; *et al.* GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*. **2005**, 21(11), 2787-2788.
98. Petersen, B.; *et al.* A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct. Biol.* **2009**, 9:51.
99. Quali, M.; King R.D. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Prot. Sci.* **2000**, 9, 1162-1176.
100. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html [consultada agosto 2012].

101. Guerneur, Y.; *et al.* Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination. *Bioinformatics*. **1999**, 15 (5), 413-421.
102. Deléage, G.; Roux, B. An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* **1987**, 1 (4), 289-294.
103. King, R.D.; Sternberg, M.J. Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.* **1996**, 5 (11), 2298-2310.
104. Frishman, D.; Argos, P. Incorporation of long-distance interactions into a secondary structure prediction algorithm. *Protein Eng.* **1996**, 9, 133-142.
105. Das, K.; *et al.* Crystal structures of arginine deiminase with covalent reaction intermediates; implications for catalytic mechanism. *Structure*. **2004**, 12, 657-667.
106. *AutoDock Tools v1.5.4*, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA.
107. *Spartan10*, Wavefunction, Inc., Von Karman Avenue, CA, USA.
108. Sousa da Silva, A.W.; Vranken, W.F. ACPYPE – AnteChamber Python Parser interface. *BMC Res. Notes*. **2012**, 5:367, doi: 10.1186/1756-0500-5-367.
109. Lindorff-Larsen, K; *et al.* Systematic Validation of Protein Force Fields against Experimental Data. *PLoS ONE*. **2012**, 7(2), doi:10.1371/journal.pone.0032131.
110. Aqvist, J.; *et al.* A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* **1994**, 7(3), 385-391.
111. Desaphy, J.; *et al.* Comparison and druggability prediction of protein-ligand binding sites from pharmacophore-annotated cavity shapes. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52 (8), 2287-2299.
112. EDULISS, Edinburgh University Ligand Selection. *System*<http://eduliss.bch.ed.ac.uk/test/> [Consulta: enero de 2013].
113. Hsin, K.Y.; *et al.* EDULISS: a small-molecule database with data-mining and pharmacophore searching capabilities. *Nucleic Acids Res.* 2010, doi: 10.1093/nar/gkq878
114. LIDAEUS, Ligand Discovery At Edinburgh University. <http://opus.bch.ed.ac.uk/lidaeus/> [Consulta: enero de 2013].
115. Irwin, J.J.; *et al.* ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52 (7), 1757-1768.
116. Galkin, A.; *et al.* X-ray structure and kinetic properties of ornithine transcarbamoylase from the human parasite *Giardia lamblia*. *Proteins*. **2009**, 76, 1049-1053.
117. Galkin, A.; *et al.* X-ray structure and characterization of carbamate kinase from the human parasite *Giardia lamblia*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, 66, 386-390.
118. Gallego, P.; *et al.* Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in *Mycoplasma penetrans*. *PLoS ONE*. **2012**, 7 (10), doi: 10.1371/journal.pone.0047886
119. Kim, D.E.; *et al.* Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 526-531.
120. Rinaldi-Suharto, A. Structural studies of Giardial arginine deiminase. Tesis Mestría en Ciencias (investigación). School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, Australia, **2006**.
121. Brown, D.; Superti-Furga, G. Rediscovering the sweet spot in drug discovery. *Drug Discov. Today*. **2003**, 8, 1067–1077.
122. Schmidtke, P.; Barril, X. Understanding and Predicting Druggability. A High-Throughput Method for Detection of Drug Binding Sites. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5858-5867.
123. Hajduk, P.J. *et al.* Predicting protein druggability. *Drug Discov. Today Targets*. **2005**, 10 (23724), 1675-1682.
124. Hopkins, A.L.; Groom, C.R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (9), 727-730.
125. Russ, A.P.; Lampel, S. The druggable genome: an update. *Drug Discov. Today*. **2005**, 10 (23/24), 1607-1610.
126. Schneider, M. A rational approach to maximize success rate in target discovery. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **2004**, 337, 625–633.
127. Betz, U.A. How many genomics targets can a portfolio afford? *Drug Discov. Today*. **2005**, 10, 1057–1063.
128. Adam, R.D. The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* **2000**, 30 (4), 475-484.
129. Morrison, H.G.; *et al.* Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. *Science*. **2007**, 317 (5846), 1921-1926.
130. Pérez-Villanueva, J.; *et al.* Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.012.

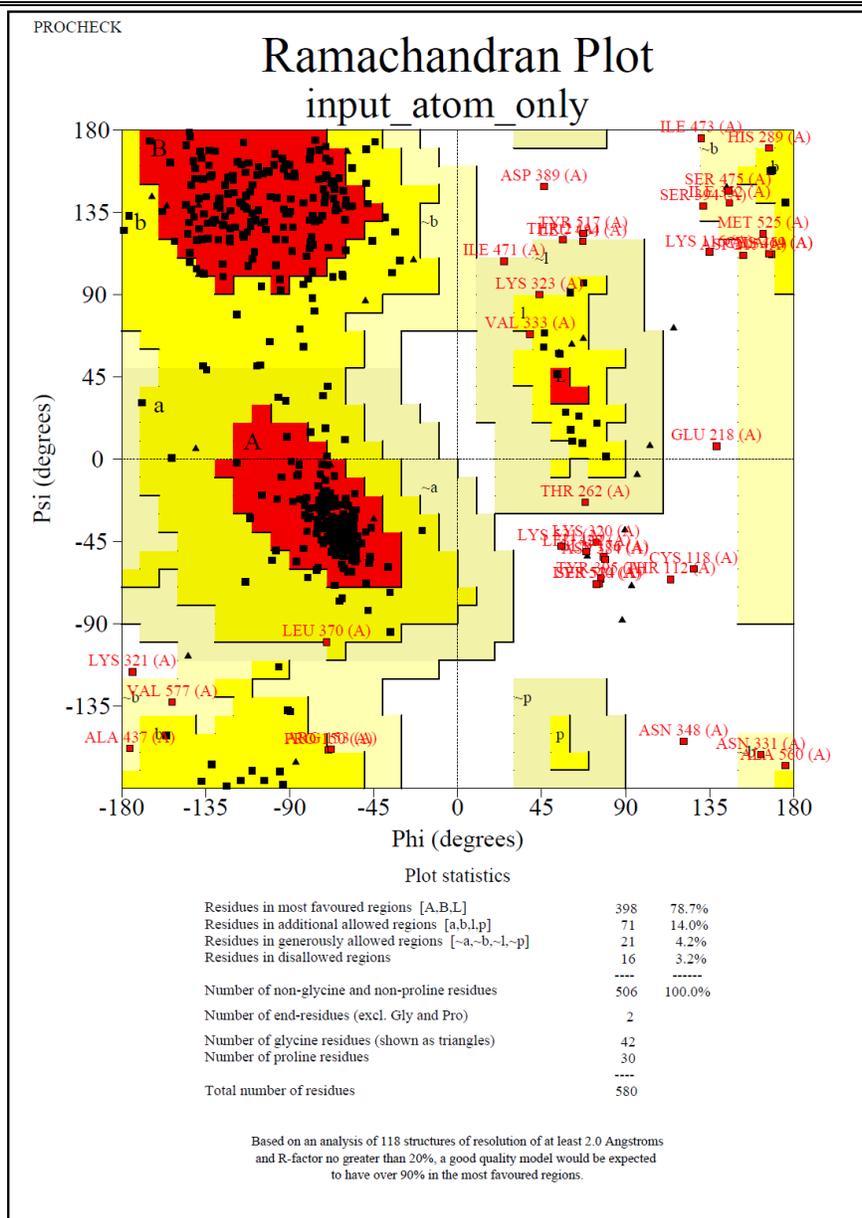
11. ANEXOS



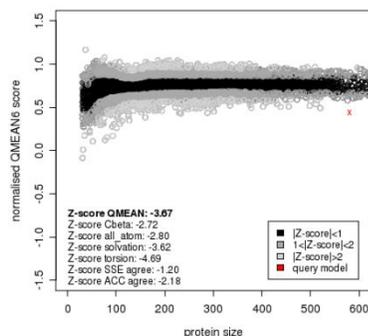
A1. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor Robetta.



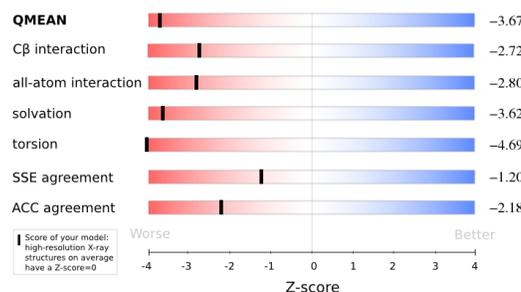
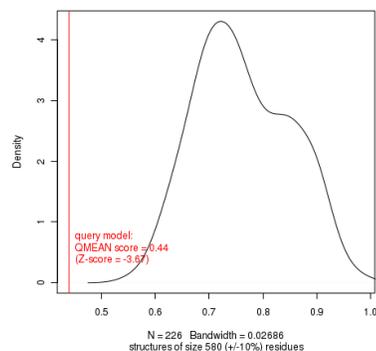
A2. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor I-TASSER utilizando la estructura plantilla 2A9G.



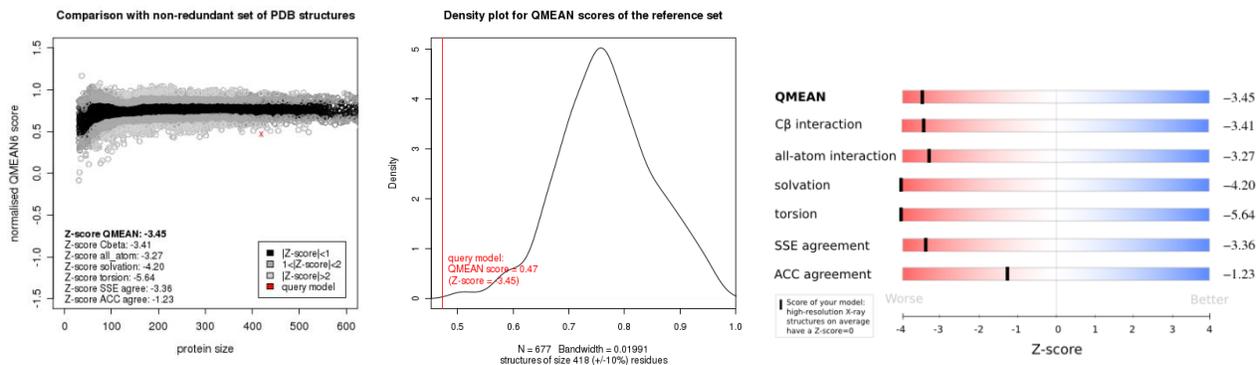
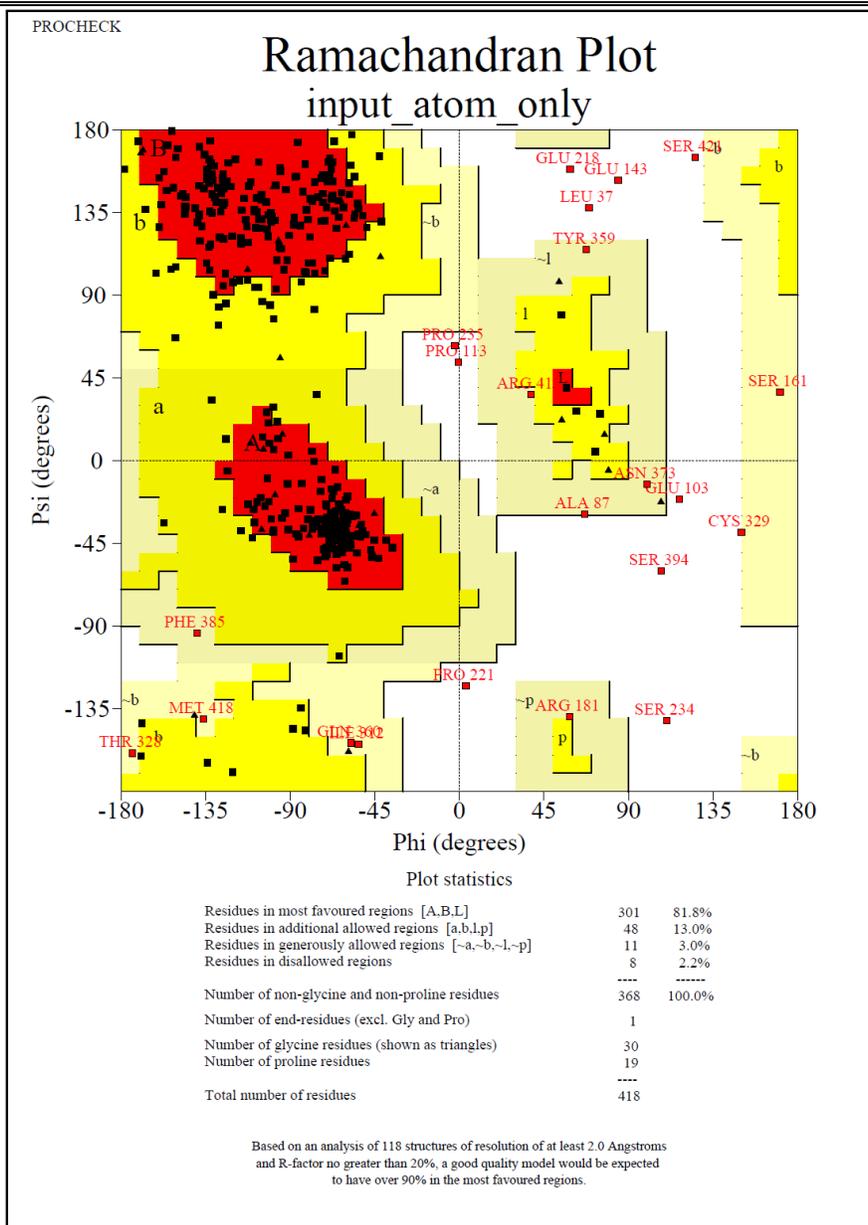
Comparison with non-redundant set of PDB structures



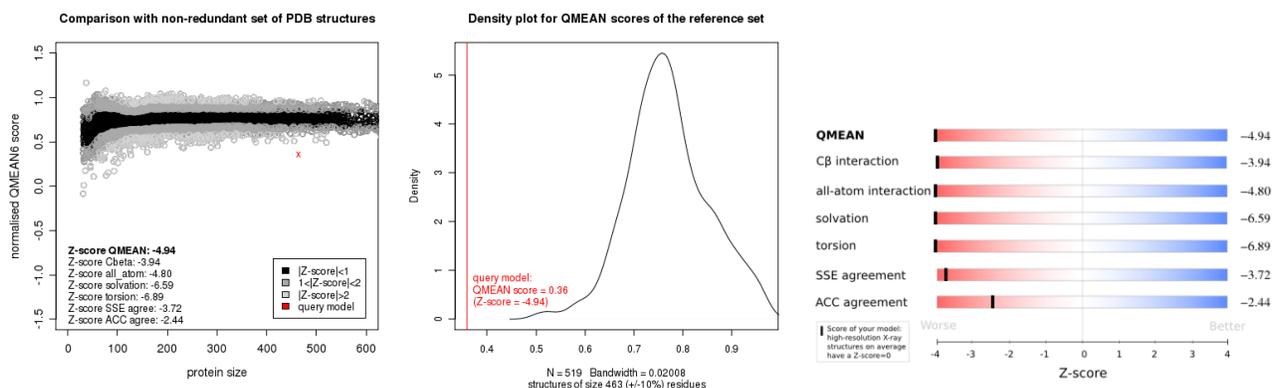
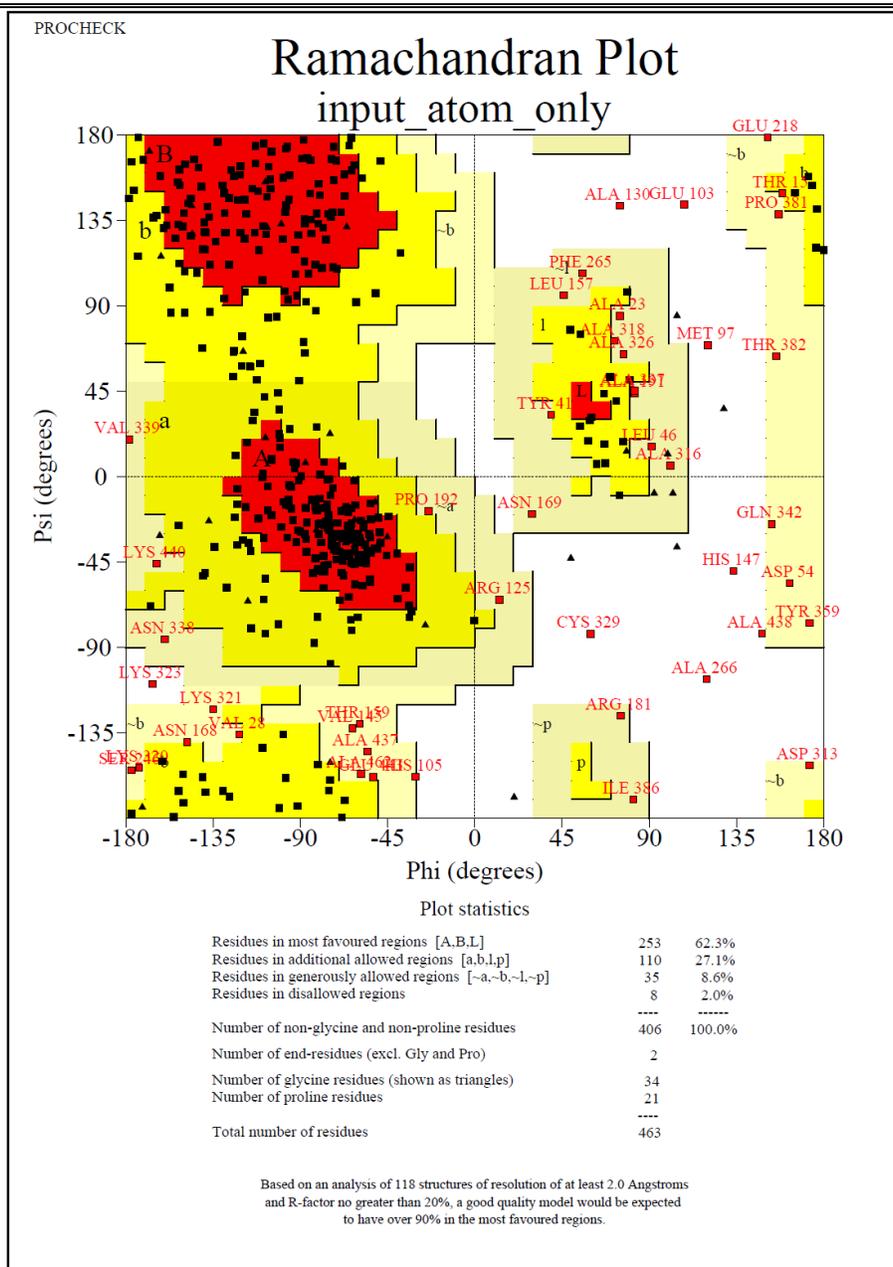
Density plot for QMEAN scores of the reference set



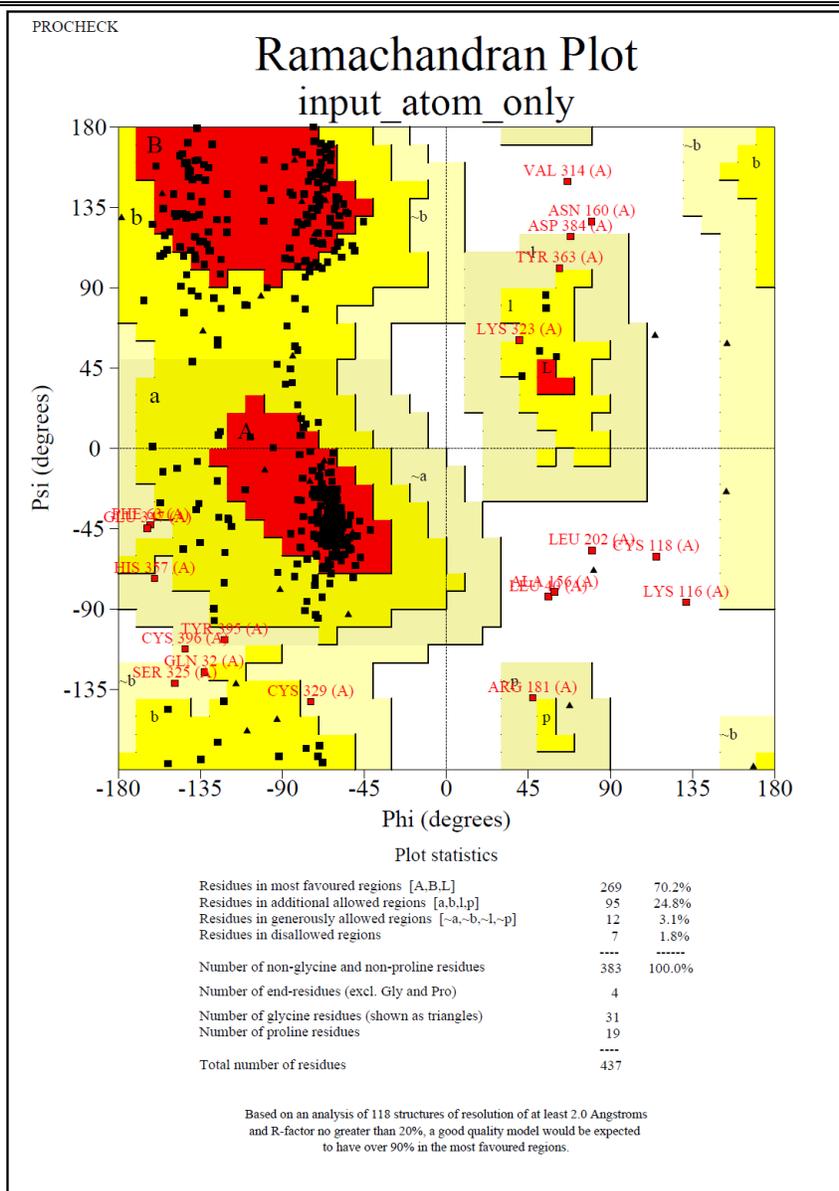
A3. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor I-TASSER utilizando la estructura plantilla 1S9R.



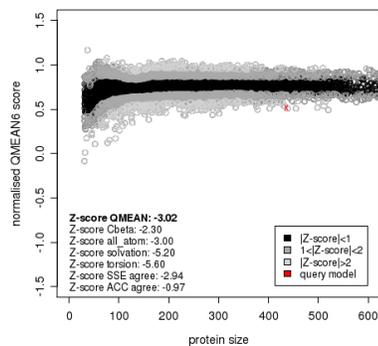
A4. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor SwissModel utilizando la estructura plantilla 1S9R.



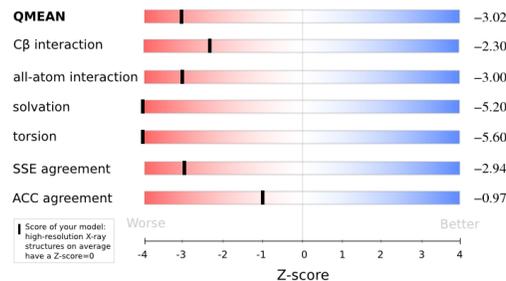
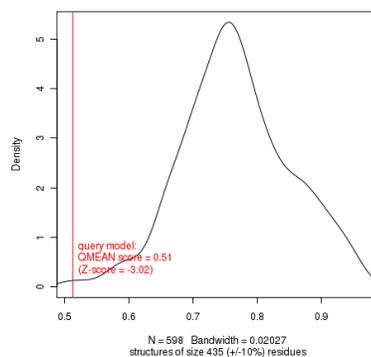
A5. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor 3D-JIWSAW utilizando la estructura plantilla 1S9R.



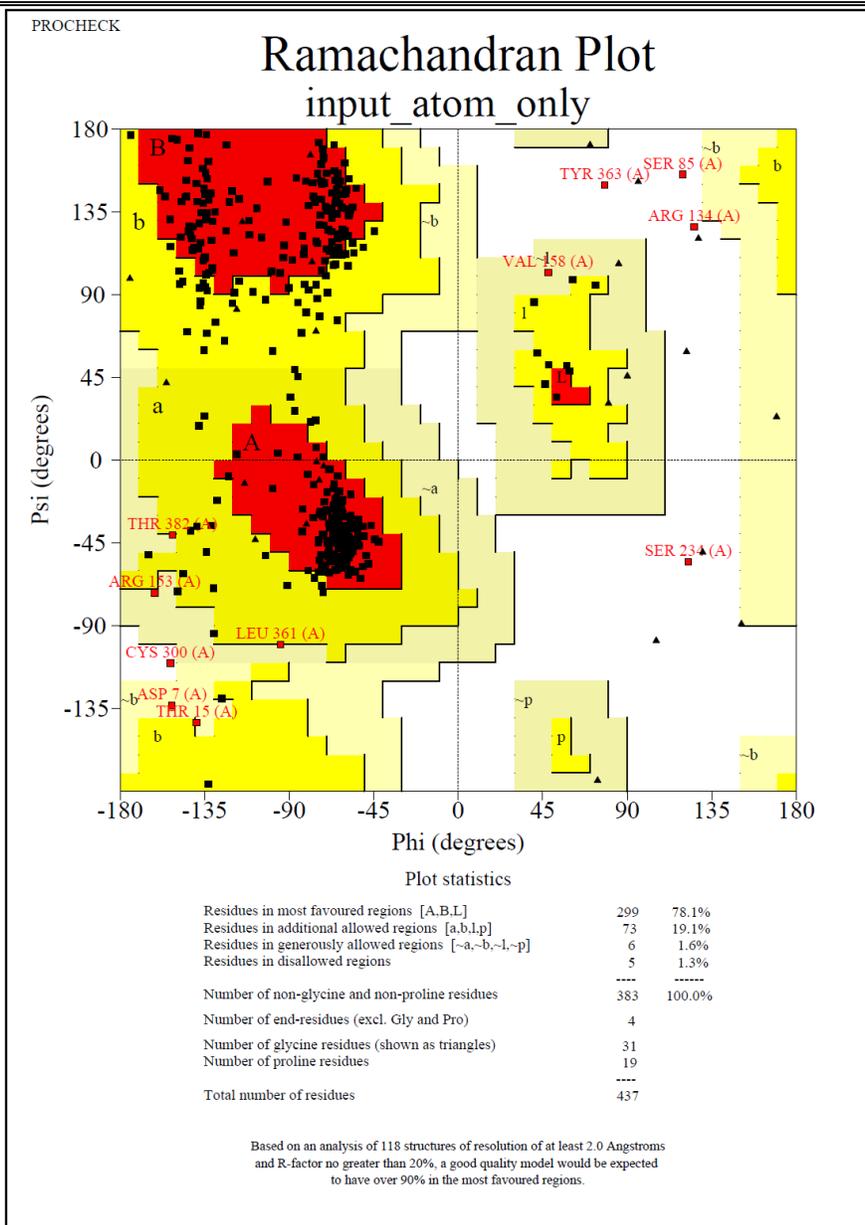
Comparison with non-redundant set of PDB structures



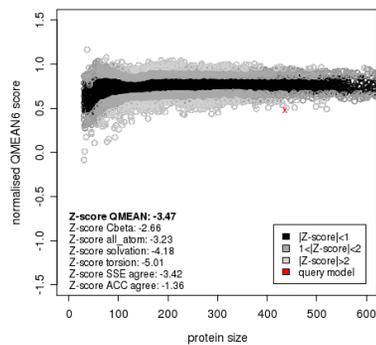
Density plot for QMEAN scores of the reference set



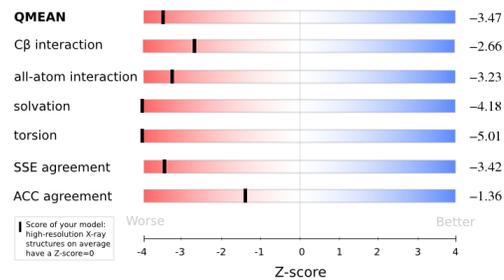
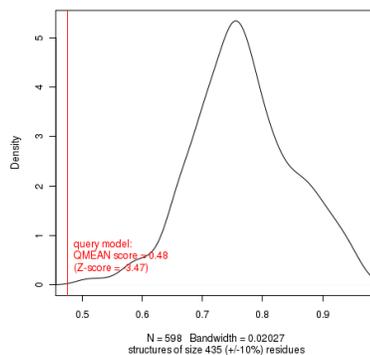
A6. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor Phyre2 utilizando la estructura plantilla 1RXX.



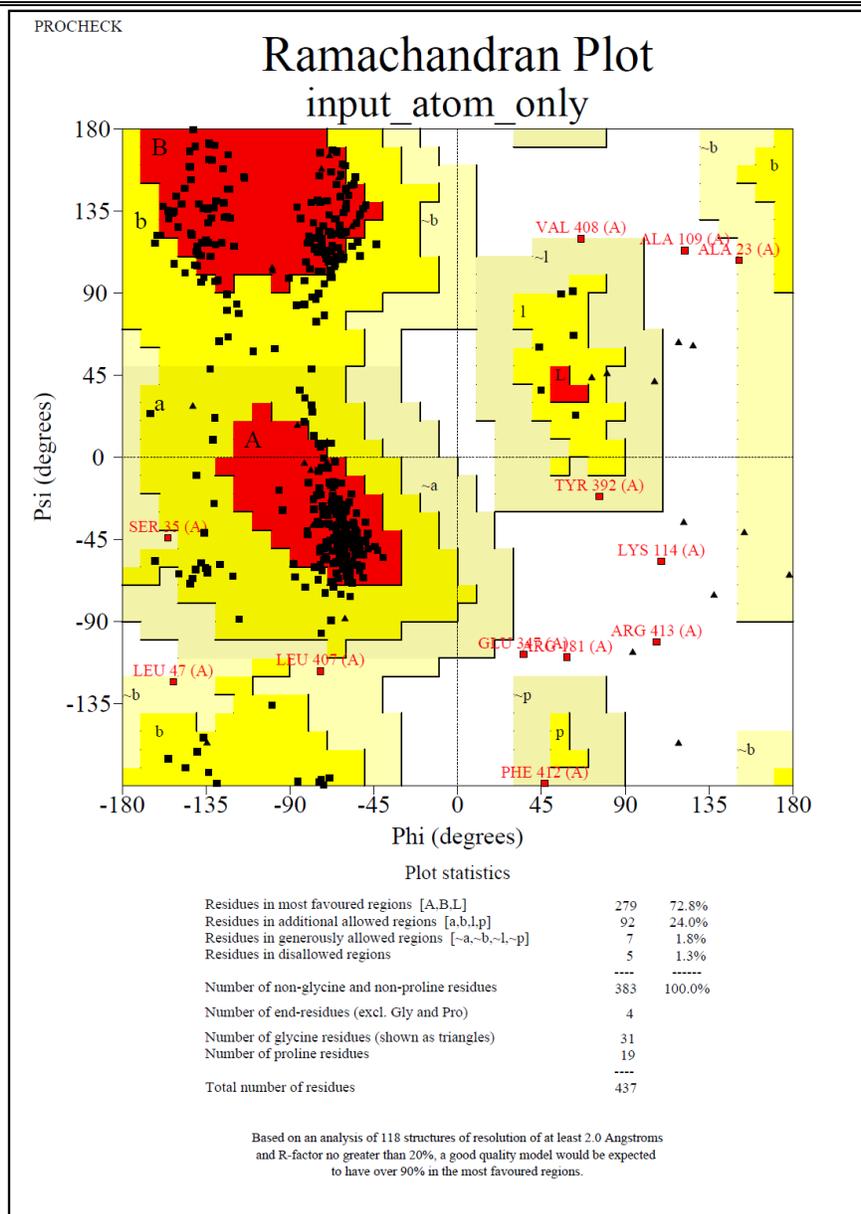
Comparison with non-redundant set of PDB structures



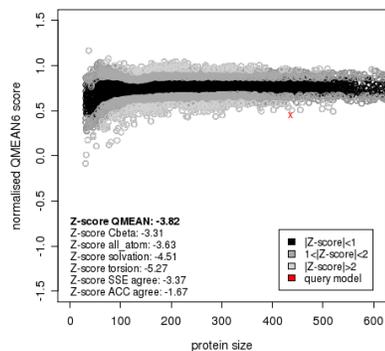
Density plot for QMEAN scores of the reference set



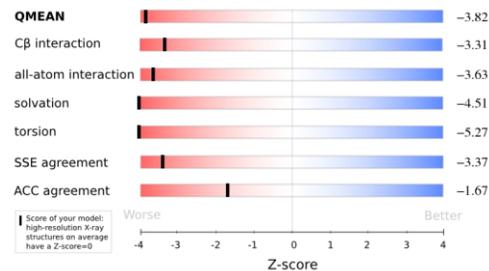
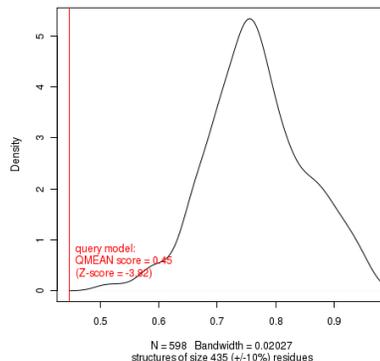
A7. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor *Modeller* utilizando la estructura plantilla 2A9G.



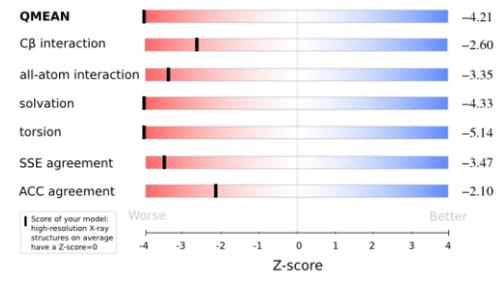
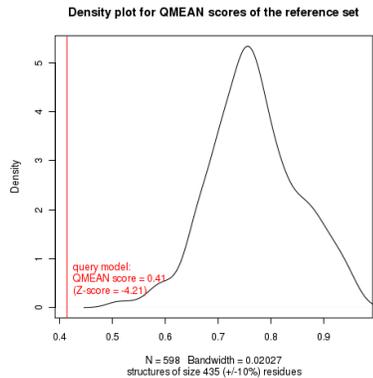
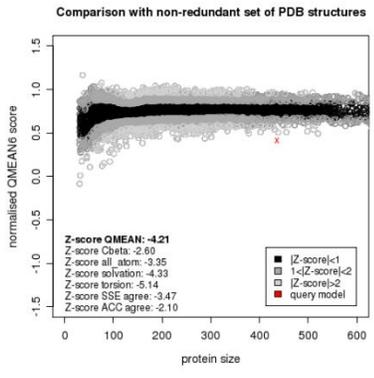
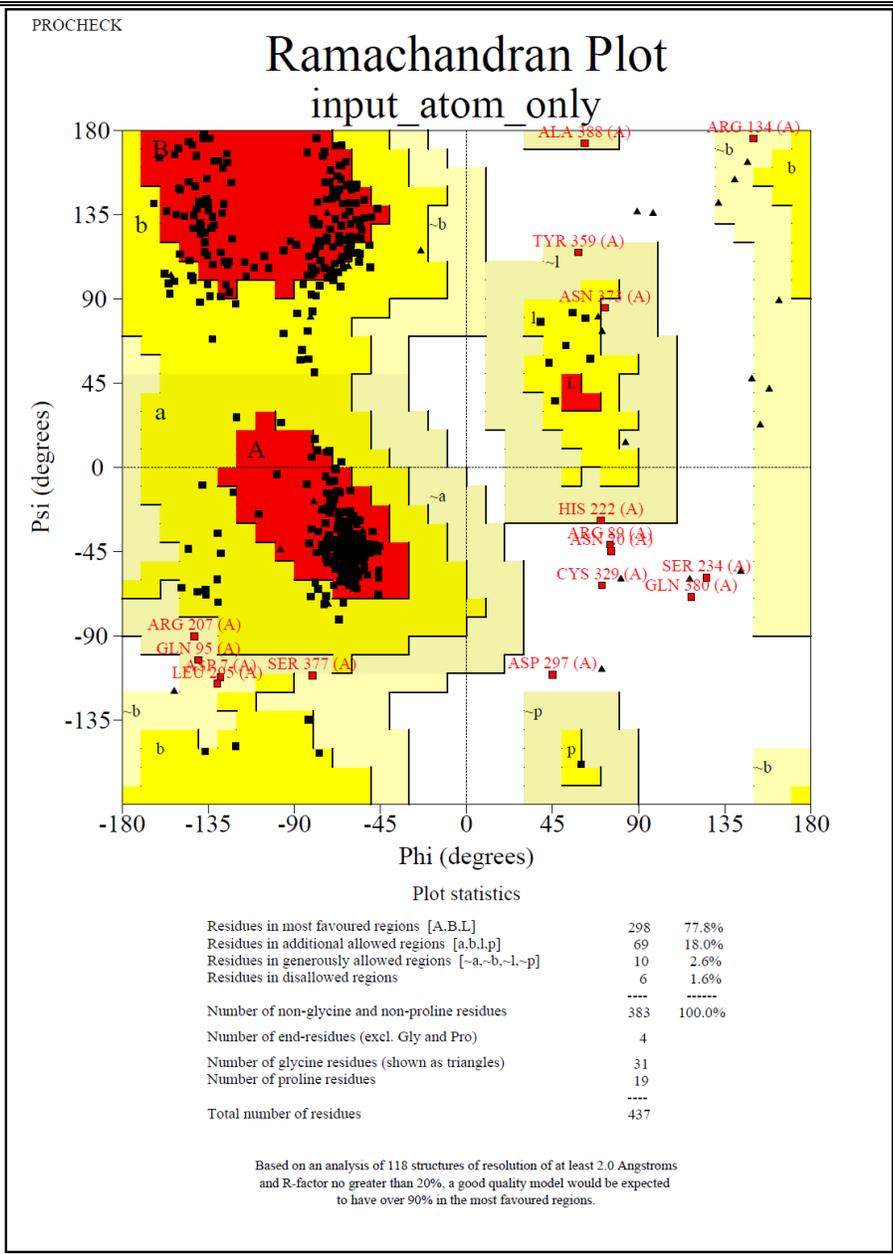
Comparison with non-redundant set of PDB structures



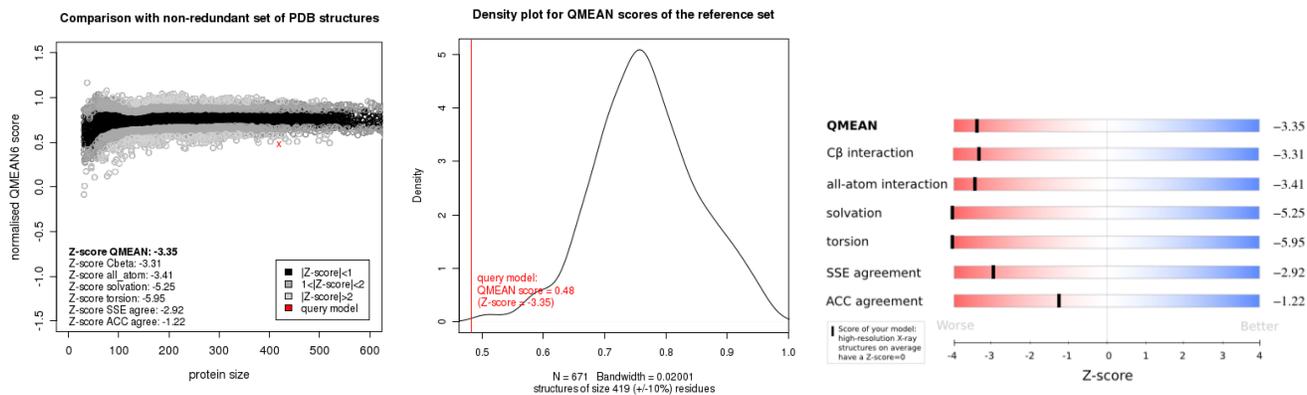
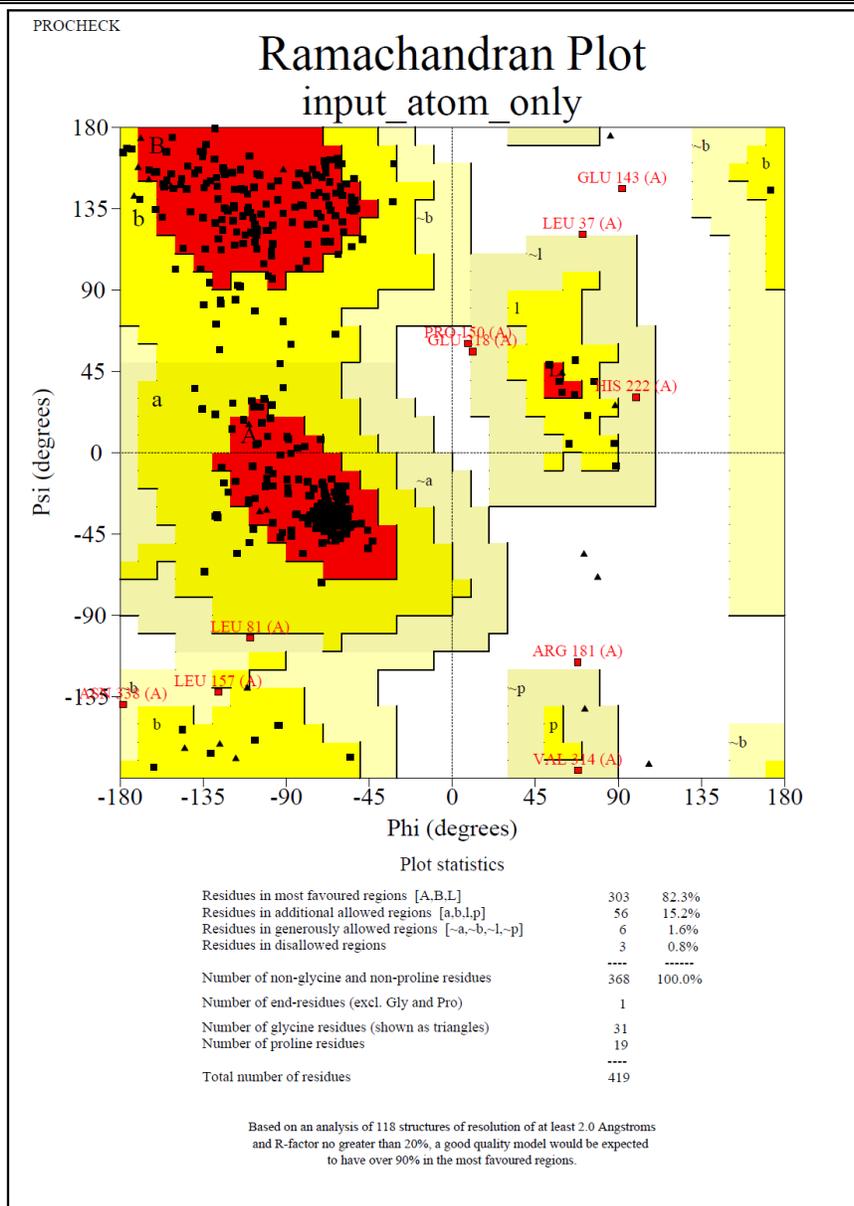
Density plot for QMEAN scores of the reference set



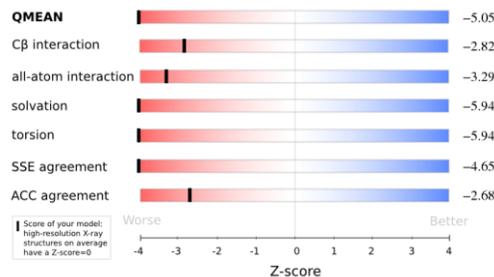
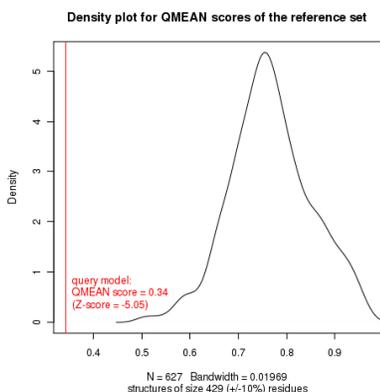
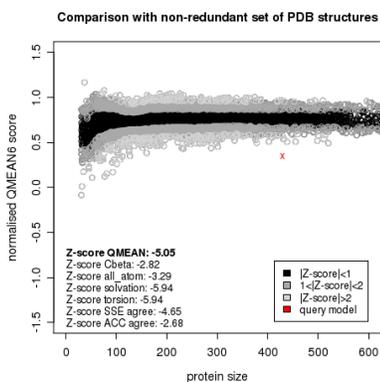
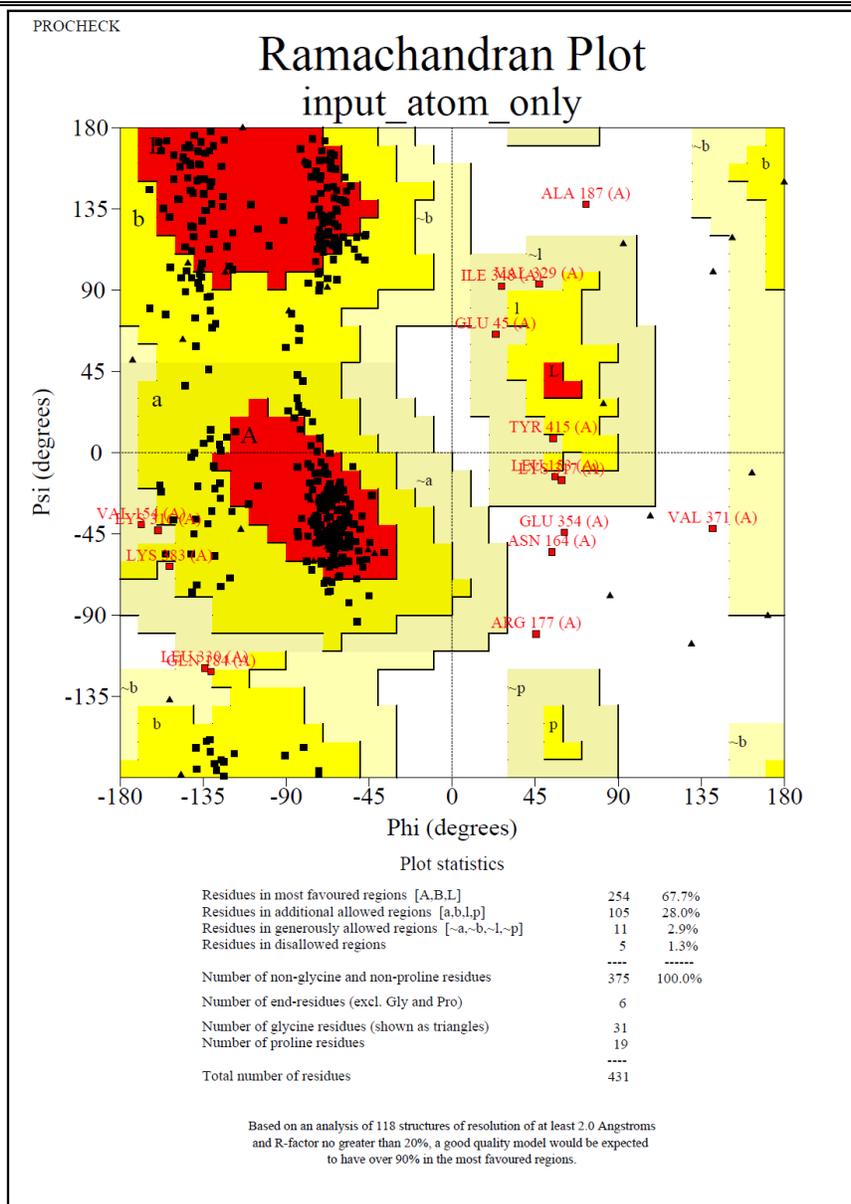
A8. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor *Modeller* utilizando la estructura plantilla 1S9R.



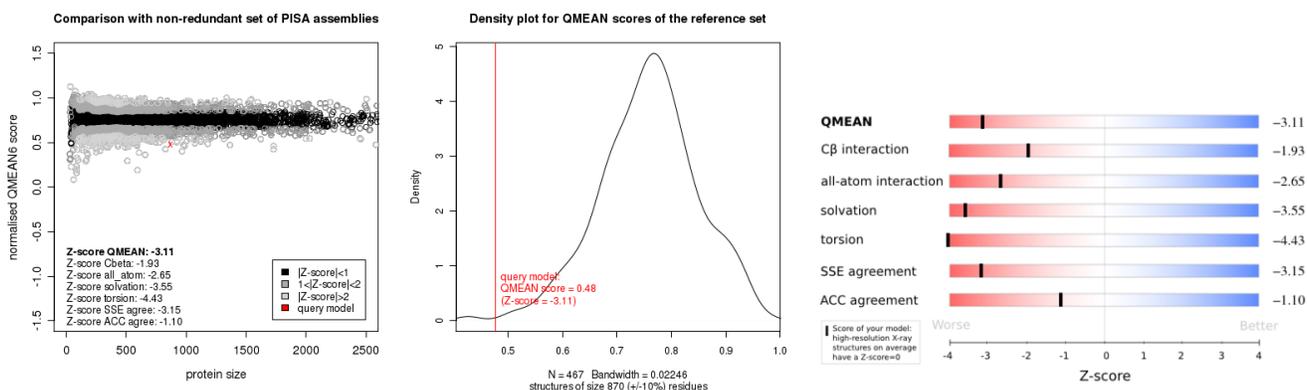
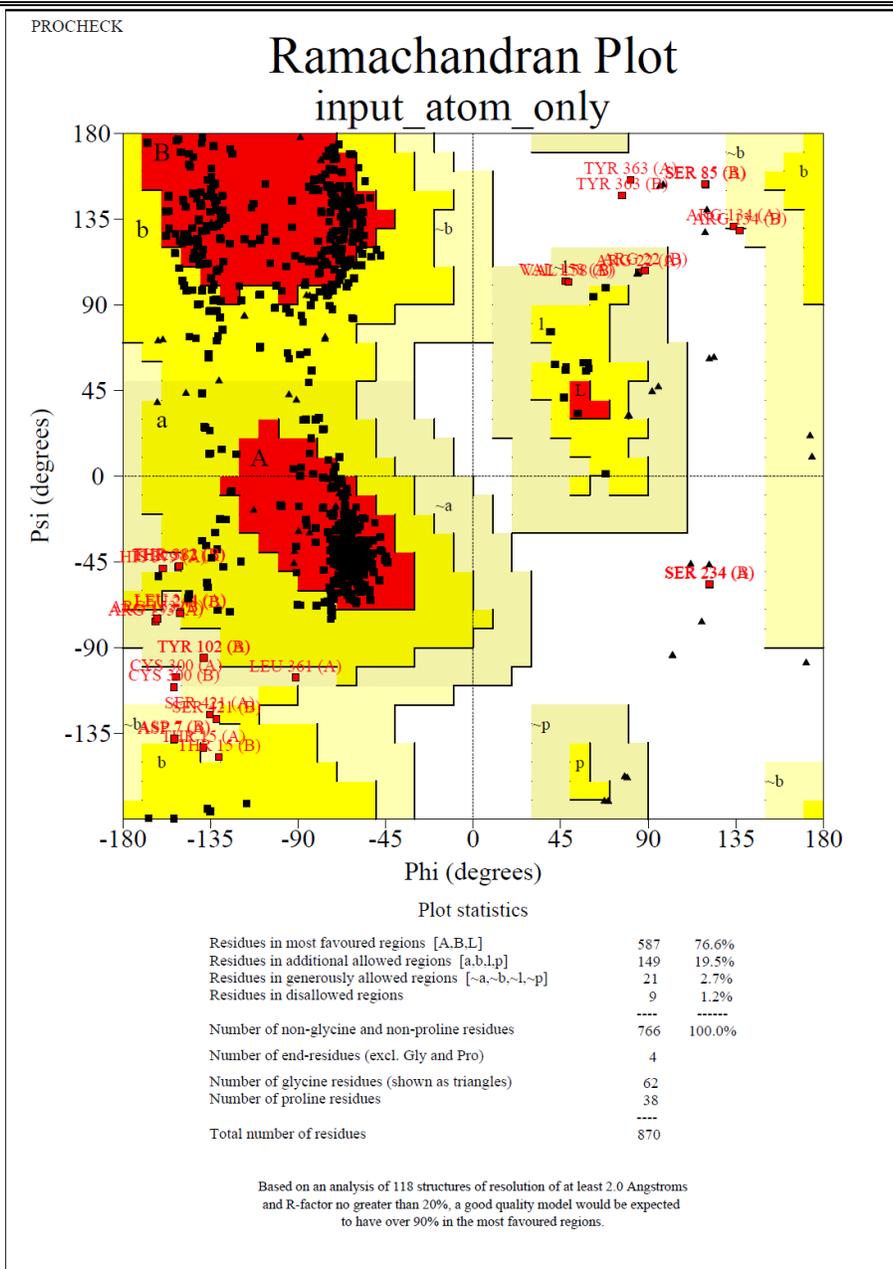
A9. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor *Modeller* utilizando la estructura plantilla 1RXX.



A10. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor SwissModel utilizando la estructura plantilla 1S9R.



A11. Resultados de validación para el modelo generado con el servidor 3D-JIGSAW utilizando la estructura plantilla 1S9R.



A12. Resultados de validación para el modelo de la estructura del dímero de ADI de *G. intestinalis* generado con el programa *Modeller*.

