

ÍNDICE

MARCO TEÓRICO.....	13
Aspectos generales:.....	14
Problemáticas ambientales producidas por ureasas:.....	15
Problemáticas clínicas producidas por ureasas:	16
Comparación de ureasas de diferentes organismos:	18
Inhibidores de ureasa reportados en la literatura:	20
Fundamentos teóricos:.....	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
Objetivo general:	24
Objetivos específicos:	24
METODOLOGÍA.....	25
1) Antecedentes preliminares.	25
a) Revisión bibliográfica:.....	25
b) Preparación de inhibidores ya reportados en la literatura:.....	25
c) Preparación de la proteína:.....	26
d) Acoplamiento molecular:	27
2) Metodología del Trabajo de tesis de grado.....	29
1) Preparación de la base de datos de compuestos para ser utilizada como biblioteca virtual:	30
2) Filtrado a la base de datos a través de diferentes reglas que incluyen términos farmacocinéticos y fisicoquímicos:	30
3) Creación de hipótesis de farmacóforos para el conjunto de compuestos con núcleos de cumarinas.	32
4) Realización de estudios de acoplamiento molecular a los compuestos candidatos, mediante diferentes algoritmos, para reducir el número de candidatos a inhibidores de ureasa:	33
5) Realización de cálculos de energía libre de unión mediante el método MM-GBSA:.....	35
RESULTADOS	39

1) Preparación de la base de datos de compuestos para ser utilizada como biblioteca virtual:	39
2) Filtrado a la base de datos a través de diferentes reglas que incluyen términos farmacocinéticos y fisicoquímicos:	40
3) Hipótesis de farmacóforos para el conjunto de compuestos con núcleos de cumarinas y Cribado Virtual basado en farmacóforos.....	43
4) Estudios de acoplamiento molecular a los compuestos candidatos, mediante diferentes algoritmos para reducir el número de candidatos a inhibidores de ureasa:	47
a) Docking molecular para la variante LYN	48
b) Docking molecular para la variante KCX.....	52
5) Cálculos de energía libre de unión mediante el método MM-GBSA:.....	58
CONCLUSIÓN	73
REFERENCIAS.....	74
ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de la hidrólisis de urea por ureasas. Figura adaptada de [28].	17
Figura 2: Ensamblaje de la estructuras cuaternarias en ureasas de diferentes organismos. Una unidad funcional puede estar formada por a) una sola unidad (como en <i>Canavalia ensiformis</i> , PDB ID: 3LA4), b) un heterodímero (como <i>H. pylori</i> , PDB ID: 1E9Z) o c) un heterotrímero (como <i>Sporosarcina pasteurii</i> , PDB ID: 2UBP). Estas unidades funcionales (o monómeros) forman complejos como d) hexámeros, e) dodecámeros o f) trímeros. Figura adaptada [4].	19
Figura 3: Comparación de JbU y otras ureasas bacterianas. Comparación esquemática de una sola subunidad estructural de JbU con dos (<i>H. pylori</i> , HpU) y tres (<i>K. aerogenes</i> (KAU), <i>B. pasteurii</i> (BPU)) subunidades en ureasas bacterianas. Con referencia a JbU, el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones correspondientes en ureasas bacterianas se indica encima del recuadro. Figura adaptada de [35].	20
Figura 4: Compuestos con actividad anti-ureasa.	21
Figura 5: Enfoque de Cribado Virtual empleado en la investigación de candidatos a fármacos. Adaptado de [69].	23
Figura 6: Estructuras tridimensional de HpU. (a) dodecámero, (b) unidad funcionalmente activa comprendiendo la subunidad β o accesoria, subunidad α o catalítica, dos iones de níquel y el inhibidor co-cristalizado DJM (2- $\{1-(3,5\text{-dimethylphenyl})\text{-}1\text{H-imidazol-}2\text{-yl}\}\text{sulfanyl}\}\text{-N-hydroxyacetamide}$).	27
Figura 7: Núcleo de estructuras 2D	28
Figura 8: Flujo de trabajo. Protocolo de Virtual Screening para la búsqueda de nuevos y potentes inhibidores de ureasa.	29
Figura 9: Grilla utilizada en el método de acoplamiento molecular. Grilla cúbica externa de 36 Å x 36 Å x 36 Å, cubriendo la subunidad catalítica (en color morado). El flap-loop que actúa como una compuerta al sitio catalítico se encuentra representada en color verde, en color naranja se muestran los dos iones de níquel. La superficie de color gris muestra los residuos del sitio catalítico.	34
Figura 10: Reglas de los 5 de Lipinski. Se observa la distribución de moléculas por cada característica asociada a la regla, en línea punteada se encuentra ubicado el cutoff que se aplicó para el número de moléculas seleccionadas.	40
Figura 11: Reglas de los 3 de Jorgensen Se observa la distribución de moléculas por cada característica asociada a la regla, en línea punteada se encuentra ubicado el cutoff que se aplicó para el número de moléculas seleccionadas.	41
Figura 12: Regla de Veber. Se observa la distribución de moléculas por cada	

característica asociada a la regla, en línea punteada se encuentra ubicada el cutoff que se aplicó para el número de moléculas seleccionadas.	42
Figura 13: Flujo de trabajo. Número de moléculas reportadas hasta la segunda capa metodológica.	43
Figura 14: Hipótesis de farmacóforos seleccionados basados en cumarinas. a) AANRR y b) AAANR.	45
Figura 15: Resultado de LBVS basada en las hipótesis de cumarinas. Distribución de moléculas con respecto al Phase Screen Score y en línea punteada se observa el cutoff seleccionado (0,65).	46
Figura 16: Flujo de trabajo. Número de moléculas reportadas en el filtro metodológico de “Hipótesis de farmacóforo” con LBVS basado en cumarinas.	47
Figura 17: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking para HTVS en LYN.	48
Figura 18: Conjunto de moléculas fuera del sitio de unión que fueron descartadas en el algoritmo de HTVS en LYN.	49
Figura 19: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking para SP en LYN.	50
Figura 20: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking para XP en LYN.	51
Figura 21: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking para HTVS en KCX.	53
Figura 22: Conjunto de moléculas fuera del sitio de unión que fueron descartadas en el algoritmo de HTVS en la variante KCX.	53
Figura 23: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking para SP en KCX.	54
Figura 24: Distribución de moléculas con respecto a la energía de docking molecular para XP en KCX.	55
Figura 25: Número de moléculas reportadas en el filtro metodológico de “Acoplamiento molecular”	56
Figura 26: Flujo de trabajo. Número de moléculas reportadas post filtro metodológico de “Acoplamiento molecular”	58
Figura 27: Energía de MM-GBSA para cada conjunto de moléculas y compuestos correspondientes al control de calidad interno.	60
Figura 28: Moléculas seleccionadas como candidatas.	66
Figura 29: Interacción de 13 moléculas candidatas con respecto a la hipótesis de farmacóforo AANRR3. Moléculas candidatas: ZINC000003316814 (magenta), ZINC000005810608 (verde claro), ZINC000006751398 (rosa claro), ZINC000008731861 (verde), ZINC000015106043 (morado), ZINC000072427629 (amarillo), ZINC001560403828 (cian), ZINC000002120368 (gris), ZINC00002584177 (azul), ZINC000007994969 (azulino), ZINC000008627328 (naranja claro), ZINC000008731862 (naranja) y ZINC000005810608 (verde limón),	

iones de níquel (naranja) y residuos claves (gris). 67

Figura 30: Interacción de 7 moléculas candidatas con respecto a la hipótesis de farmacóforo AAANR2. Moléculas candidatas: ZINC000008700584 (Verde limón), ZINC000072412074 (amarillo), ZINC000215300901 (magenta), ZINC000002522532 (rosa claro), ZINC000071769481 (naranja claro), ZINC000031169481 (naranja) y ZINC000091624618 (verde), iones de níquel (naranja) y residuos claves (gris). 68

Figura 31: Complejo proteína-ligando, correspondiente a molécula ZINC000008627328 (coloreada en cian) escogida como la mejor candidata de aquellas moléculas que interactúan con ambas variantes, en verde molécula KCX219. 69

Figura 32: Complejo proteína-ligando, correspondiente a molécula ZINC000072412074 (coloreada en cian) escogida como la mejor candidata que solo interactúa con KCX, en verde molécula KCX219. 70

Figura 33: Flujo de trabajo. Número de moléculas reportadas de la metodología completa. 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de moléculas obtenidas en la descarga y preparación de la base de datos ZINC15.	39
Tabla 2: Número de moléculas obtenidas por cada regla aplicada.	43
Tabla 3: Resultados obtenidos del protocolo LBVS con hipótesis de farmacóforos basado en cumarinas.	44
Tabla 4: Número de moléculas obtenidas por cada set de farmacóforos: AAANR y AANRR.	46
Tabla 5: Número de moléculas obtenidas en el protocolo de docking molecular para LYN.	52
Tabla 6: Número de moléculas obtenidas en el protocolo de docking molecular para KCX.	55
Tabla 7: Número de moléculas post filtrado de docking molecular.	57
Tabla 8: Número de moléculas preseleccionadas.	59
Tabla 9: Energías de ΔG_{bind} para los compuestos DJM, HAE, BME y urea con proteína en 2 estados LYN y KCX.	60
Tabla 10: Números de moléculas con energía igual o más favorable a la de cada compuesto control.	61
Tabla 11: Números de moléculas seleccionadas como precandidatas en el conjunto de moléculas que interactúan con ambas variantes.	63
Tabla 12: Números de moléculas seleccionadas como precandidatas en el conjunto que solo interactúa con KCX.	65
Tabla 13: Tiempo de cálculos y análisis por cada procedimiento de LBVS y SBVS (Considerando una de las variantes).	72