

Universidad Católica de Santa María
Escuela de Postgrado
Maestría en Ciencias Biomédicas



**EVALUACIÓN DEL COMPLEJO
SUPRAMOLECULAR UREASA DE
Helicobacter pylori A DIFERENTES pHs
Y LA ACCIÓN DE NUEVOS
INHIBIDORES: UN ENFOQUE
TEÓRICO COMPUTACIONAL EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Tesis presentada por la Bachiller:

Barazorda Ccahuana, Haruna Luz

Para Optar el Grado Académico de:

Maestra en Ciencias Biomédicas

Asesor:

PhD Madurga Diez, Sergio

Arequipa – Perú
2019



Universidad Católica de Santa María

(5154)251210 (5154)251213 ucsm@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350
AREQUIPA – PERU

“En la Ciencia y en la Fe esta nuestra Fortaleza para mayor Gloria de Dios”

Arequipa, 05 de marzo del 2019

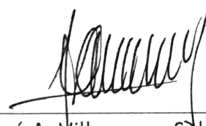
Señor Doctor,
José A. Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado,
Universidad Católica de Santa María.
Presente.

Ref.: Dictamen de Borrador de Tesis – Expediente 2019-2144

De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado **“EVALUACION DEL COMPLEJO SUPRAMOLECULAR UREASA DE *Helicobacter pylori* A DIFERENTES pHs Y LA ACCION DE NUEVOS INHIBIDORES: UN ENFOQUE COMPUTACIONAL EN CIENCIAS BIOMEDICAS”** con el que la bachiller **Haruna Luz Barazorda Ccahuana**, pretende optar el Grado Académico de **Maestro en Ciencias Biomédicas**, debo mencionar que realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, las mismas que de ser salvadas satisfactoriamente, considero se encuentra **APTO** para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado.

Atentamente,



José A. Villanueva Salas, PhD
Docente *LOS*
Escuela de Postgrado

DICTAMEN DE JURADO DICTAMINADOR DE BORRADOR DE TESIS DE
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

DIRIGIDO A: Dr. José Villanueva Salas, Director de la Escuela de Postgrado

MAESTRANDO: HARUNA LUZ BARAZORDA CCAHUANA

EXPEDIENTE: 2019000002144

TESIS: “EVALUACIÓN DEL COMPLEJO SUPRAMOLECULAR UREASA DE
HELICOBACTER PYLORI A DIFERENTES PHS Y LA ACCIÓN DE NUEVOS
INHIBIDORES: UN ENFOQUE TEÓRICO COMPUTACIONAL EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS”

FECHA: 21 de enero del 2019

Dictamen:

Me dirijo a usted en mi calidad de jurado evaluador del borrador de tesis “EVALUACIÓN DEL COMPLEJO SUPRAMOLECULAR UREASA DE HELICOBACTER PYLORI A DIFERENTES PHS Y LA ACCIÓN DE NUEVOS INHIBIDORES: UN ENFOQUE TEÓRICO COMPUTACIONAL EN CIENCIAS BIOMÉDICAS”, luego de haber realizado la lectura exhaustiva, no encuentro observaciones, es que doy MI APROBACIÓN al escrito de la tesis.

Por lo expuesto, considero que el trabajo está listo para la defensa de tesis.

Atentamente,



Prof. Badhin Gómez Valdez, Ph.D.

Profesor Investigador

Código 2632

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

JURADO DICTAMINADOR ESCUELA DE POSTGRADO:

ESCUELA DE POSTGRADO UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Jurado: Dra. Agueda Muñoz Del Carpio Toia

Alumna: Haruna Luz Barazorda Ccahuana

Tesis: “Evaluación del complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori* a diferentes PHS y la acción de nuevos inhibidores : Un enfoque teórico computacional en Ciencias biomédicas”

EVALUACIÓN GENERAL DEL BORRADOR DE TESIS					
Originalidad	Relevancia	Metodología	Análisis de datos	Estilo	Redacción
Si	Si	Adecuada	Adecuado	Adecuado	Adecuada

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN DEL DICTAMINADOR					
	Estándar de calidad	Si cumple	Cumple parcialmente	No cumple	Observaciones
Título	-El título debe ser claro y específico. - Contiene la/las variable/s evaluadas Incluye los sujetos de estudio Lugar y Tiempo.	X			
Autor	Considera los nombres y apellidos del autor	X			
Asesor	Considera los nombres y apellidos del asesor	X			
CAPITULO I Introducción	Presenta el marco teórico, el planteamiento del problema (situación actual), la(s) hipótesis, el (los) objetivo(s), los límites y alcances de la tesis. Lo anterior deberá ser presentado en forma clara y		X		Debe redactar la introducción incluyendo la hipótesis y objetivos, no por separado

	explícita.				
CAPITULO II Marco Teórico	Incluye revisión y análisis exhaustivo de los fundamentos teóricos del problema en estudio Cita adecuada	X			
CAPITULO III Metodología	Describe metodología utilizada Señala instrumentos utilizados para la investigación	X			
CAPITULO IV Resultados y Discusión	Incluye los resultados relevantes acompañados de las tablas y figuras pertinentes. Discute y confronta resultados	X			
CAPITULO V Conclusiones y Recomen- daciones	Tiene conclusiones relacionadas al problema y resultados obtenidos Propone recomendaciones relacionadas a hallazgos	X			
Bibliografía	Incluye bibliografía actualizada Cita bien cada referencia	X			

Debe mejorar el orden de los capítulos según se sugiere en la tabla.

Dictamen final procede para su sustentación cambios menores.

Arequipa 29 de enero 2019



Agueda Muñoz del Carpio Toia

JURADO DICTAMINADOR ESCUELA DE POSTGRADO

Dedicatoria

Dedicado a Sergio B., María Isabel Cc., Hiromi Luz B., Susana Gisel B., Sergio Luigi B., Sergio Andrés Z. y Diego Ernesto V. por su por su apoyo incondicional e infinito cariño.

Epígrafe

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros.
Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y,
sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay
que sentirse dotado para realizar alguna cosa y
alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

Agradecimientos

Al financiamiento otorgado por el proyecto “Efecto de la leche de camélidos sudamericanos (llama “*Lama glama*”, guanaco “*Lama guanicoe*”, alpaca “*Vicugna pacos*” y la vicuña “*Vicugna vicugna*”) de la región Arequipa en cultivo *in vitro* de *Helicobacter pylori* y posterior análisis teórico mediante el uso de la Bioinformática” de resolución 25190-R-2018.

Contenido

Contenido	IV
Índice de Figuras	VII
Índice de Tablas	X
Glosario	XII
Introducción	XVI
Hipótesis	XVIII
Objetivos	XIX
1 Marco Teórico	1
1.1 Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 Estructura	3
1.2.1 Genoma	3
1.3 Patogénesis	4
1.3.1 Ureasa y supervivencia en condiciones ácidas.	4
1.3.2 Flagelos y motilidad bacteriana.	5
1.3.3 Factores de adherencia	6
1.3.4 Factores de Virulencia	7

1.4	Transmisión	8
1.5	Cuadro Clínico	9
1.5.1	Dispepsia	9
1.5.2	Gastritis	10
1.5.3	Úlcera péptica	10
1.5.4	Cáncer gástrico	11
1.5.5	Linfoma MALT	11
1.6	Diagnóstico	12
1.6.1	Métodos no invasivos	12
1.6.2	Métodos invasivos	13
1.7	Tratamiento	13
1.7.1	Principio del tratamiento	13
1.7.2	Nuevas estrategias de tratamiento	14
2	Detalles Computacionales y Metodología	16
2.1	Detalles Computacionales	16
2.2	Métodos	16
2.2.1	Preparación del complejo supramolecular Ureasa	16
2.2.2	Simulador de estados de protonación a diferentes pHs	17
2.2.3	Simulación de dinámica molecular	18
2.2.4	Acoplamiento molecular	19
3	Resultados y Discusión	21
3.1	Análisis estructural de Ureasa a diferentes pHs	21
3.2	Análisis de la simulación de dinámica molecular	23
3.2.1	Root-mean-square deviation - RMSD	23
3.2.2	Root-mean-square fluctuation - RMSF	27

3.2.3	Radio de giro	31
3.2.4	Distancias críticas	31
3.3	Análisis de sistemas interactuantes	41
3.3.1	Librería de ligandos	41
3.3.2	Bolsillos del dímero α/β	43
3.3.3	Acoplamiento molecular	45
	Referencias Bibliográficas	51
	Anexos	61
	A Distancias críticas de βALA170 con αILE328	62
	B Distancias críticas de αGLY47 y αHIS322	75
	C Distancias críticas de βALA173 con αGLU330	88
	D Predicción de acoplamiento en PatchDock	101

Índice de Figuras

3.1	Descripción estructural del complejo supramolecular ureasa.	22
3.2	Root-mean-square deviation - RMSD a partir de 2ns.	24
3.3	RMSD de las flaps a diferentes pHs.	26
3.4	Descripción de flaps post-dinámica a pH 7.	27
3.5	Root-mean-square fluctuation - RMSF por residuo.	29
3.6	RMSF por residuo de los flaps que estuvieron abiertos.	30
3.7	Radio de giro a partir de 2ns.	31
3.8	Distancias críticas β^I ALA170- α^{II} ILE328.	33
3.9	Distancia de β^I ALA170 con α^{II} ILE328.	34
3.10	Distancias críticas α^I GLY47 y α^{II} HIS322.	35
3.11	Distancia de α^I GLY47 con α^{II} HIS322.	36
3.12	Distancias críticas β^I ALA173 con α^{II} GLU330.	37
3.13	Distancia promedio de los puntos críticos β^I ALA173 con α^{II} GLU330.	38
3.14	Distancias críticas pH 2 y pH 7.	39
3.15	Representación en forma de <i>ribbon</i> de la ureasa.	40
3.16	Lista de estructuras moleculares usados para el acoplamiento molecular.	42
3.17	Pockets del dímero.	44
3.18	Dímero α/β de ureasa frente a la úrea.	46
3.19	Sistemas interactuantes.	47

A.1	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 2 del flap 1 al flap 6.	63
A.2	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 2 del flap 7 al flap 12.	64
A.3	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 3 del flap 1 al flap 6.	65
A.4	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 3 del flap 7 al flap 12.	66
A.5	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 4 del flap 1 al flap 6.	67
A.6	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 4 del flap 7 al flap 12.	68
A.7	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 5 del flap 1 al flap 6.	69
A.8	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 5 del flap 7 al flap 12.	70
A.9	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 6 del flap 1 al flap 6.	71
A.10	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 6 del flap 7 al flap 12.	72
A.11	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 7 del flap 1 al flap 6.	73
A.12	Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 7 del flap 7 al flap 12.	74
B.1	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 2 del flap 1 al flap 6.	76
B.2	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 2 del flap 7 al flap 12.	77
B.3	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 3 del flap 1 al flap 6.	78
B.4	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 3 del flap 7 al flap 12.	79
B.5	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 4 del flap 1 al flap 6.	80
B.6	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 4 del flap 7 al flap 12.	81
B.7	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 5 del flap 1 al flap 6.	82
B.8	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 5 del flap 7 al flap 12.	83
B.9	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 6 del flap 1 al flap 6.	84
B.10	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 6 del flap 7 al flap 12.	85
B.11	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 7 del flap 1 al flap 6.	86
B.12	Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 7 del flap 7 al flap 12.	87
C.1	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 2 del flap 1 al flap 6.	89

C.2	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 2 del flap 7 al flap 12.	90
C.3	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 3 del flap 1 al flap 6.	91
C.4	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 3 del flap 7 al flap 12.	92
C.5	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 4 del flap 1 al flap 6.	93
C.6	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 4 del flap 7 al flap 12.	94
C.7	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 5 del flap 1 al flap 6.	95
C.8	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 5 del flap 7 al flap 12.	96
C.9	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 6 del flap 1 al flap 6.	97
C.10	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 6 del flap 7 al flap 12.	98
C.11	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 7 del flap 1 al flap 6.	99
C.12	Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 7 del flap 7 al flap 12.	100

Índice de Tablas

1.1	Regímenes de terapia para la infección por <i>H. pylori</i>	15
3.1	Carga total de los sistemas a diferentes pHs.	23
3.2	RMSD de los flaps del complejo supramolecular ureasa.	25
3.3	RMSF de residuos 304 a 347 de la ureasa a diferentes pHs.	28
3.4	Distancia de β^I ALA170 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} ILE328	32
3.5	Distancia de α^I GLY47 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} HIS322.	34
3.6	Distancia de β^I ALA173 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} GLU330.	36
3.7	Resumen del promedio de distancias críticas	38
3.8	Característica de los ligandos usados en el acoplamiento.	41
3.9	Análisis de pockets del dímero α/β	44
3.10	Energía de contacto atómico de los diferentes sistemas interactuantes.	45
D.1	Predicción de acoplamiento dímero α/β con úrea.	102
D.2	Predicción de acoplamiento dímero α/β con ácido acetohidroxámico.	103
D.3	Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC01611325.	104
D.4	Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC04701037.	105
D.5	Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC05298729.	106

D.6 Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC08034818.	107
D.7 Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC39245715.	108

Glosario

1. PME = Proteína de membrana externa.
2. BabA = Adhesina de unión a antígeno de sangre.
3. SabA = Adhesina de unión a ácido siálico.
4. OipA = Proteína inflamatoria externa.
5. CagA = Citotoxina asociada al gen A.
6. CagPAI = Isla de patogenicidad cagPAI.
7. VacA = Citotoxina vacuolizante A.
8. DupA = Promotor de úlcera duodenal.
9. UreA = Subunidad A o α .
10. UreB = Subunidad B o β .
11. MALT = Tejido linfoide asociado a las mucosas.
12. IBPs = Inhibidores de bombas de protones.
13. GROMACS = GRONingen MACHine for Chemical Simulations.
14. VMD = Visual Molecular Dynamics.
15. DM = Dinámica molecular.
16. OPLS-AA = Optimized Potentials for Liquid Simulations and all atom.
17. PBC = Periodic boundary conditions ó Condiciones periódicas de contorno.
18. vdW = van der Walls

19. PME = Particle-Mesh Ewald
20. flap = solapa
21. pocket = bolsillo o también denominado sitio activo

Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* es un problema de salud pública que afecta aproximadamente al 50% de la población mundial. Esta bacteria presenta diversos factores de patogenicidad, uno de los cuales es la ureasa, una proteína multimérica que cataliza la hidrólisis de la úrea a NH_3 y CO_2 , lo que incrementa el pH del medio, permitiendo la supervivencia de *H. pylori*. La ureasa está conformada por dos subunidades α y β que componen un dodecámero altamente estable $((\alpha\beta)_3)_4$. El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad estructural de la ureasa a diferentes pHs y la búsqueda de nuevos inhibidores en base a un fármaco reportado en estudio clínico. Para ello se usaron técnicas de la física, química y biología computacional aplicada a modelos biológicos. Los resultados nos mostraron que la ureasa es capaz de apoyar la supervivencia de *H. pylori* a condiciones de pHs bajos, debido a que posee 12 sitios catalíticos los cuales presentan dos iones de Ni^{+2} protegido por una solapa o flap que hace posible la apertura y cierre del sitio activo para el sustrato, susceptible a condiciones de pHs bajos. Además, se observó que a pH 2 existen más flaps abiertos que a pH 7. El análisis del acoplamiento receptor con ligando (úrea, ácido acetohidroxámico y cinco derivados del ácido acetohidroxámico) muestra que es necesario considerar al receptor con el flap abierto. La acetamida fue el derivado que presentó un acoplamiento similar a la úrea teniendo gran potencial para estudios futuros. En conclusión, se ha logrado comprender uno de los factores de supervivencia del *H. pylori* mediante la gran estabilidad de la ureasa a pHs bajos.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, ureasa, pH, inhibidores, dinámica molecular .

Abstract

Helicobacter pylori infection is a public health problem that affects approximately 50% of the world population. This bacterium has several factors of pathogenicity, one of which is urease, a multimeric protein that catalyzes the hydrolysis of urea to NH_3 and CO_2 , which increases the pH of the medium, allowing the survival of *H. pylori*. Urease is made up of two α and β subunits that make up a highly stable dodecamer $((\alpha\beta)_3)_4$. The objective of this work was to evaluate the structural stability of urease at different pHs and the search for new inhibitors based on a drug reported in a clinical study. For this study, techniques of physics, chemistry, and computational biology were used and applied to biological models. The results demonstrated that urease could support the survival of *H. pylori* at low pH conditions because the bacterium has 12 catalytic sites which each have two Ni^{+2} ions protected by a flap that opens and closes from the active site to the substrate, susceptible to low pH conditions. In addition, it was observed that at pH 2 there are more open flaps than at pH 7. The coupling analysis (urea, acetohydroxamic acid and five acetohydroxamic acid derivatives) shows that it is necessary to consider the receptor with the flap open. Acetamide was the derivative that presented a similar coupling to urea, having great potential for future studies. In conclusion, one of the factors of *H. pylori* survival is explained by the high stability of urease at low pHs.

Keywords: *Helicobacter pylori*, urease, pH, inhibitors, molecular dynamic

Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa que afecta aproximadamente al 50% de la población mundial, clasificado como el principal factor de riesgo de enfermedades gastrointestinales, como; gastritis, ulceración gástrica y duodenal y carcinoma gástrico. *H. pylori* posee diversos mecanismos para sobrevivir en el estómago humano, teniendo como primera línea de defensa la producción de una enzima denominada ureasa, la cual le proporciona un ambiente adecuado a fin de llegar hasta la célula hospedera. Actualmente son diversos regímenes los que se han propuesto para la erradicación de *H. pylori*, utilizado con mayor frecuencia la triple terapia (amoxicilina, claritromicina e inhibidores de la bomba de protones), con una tasa de éxito del 80%, debido a los efectos secundarios indeseables, cumplimiento deficiente y resistencia a los antibióticos.

La ureasa tiene un rol biológico importante en las patologías inducidas por *H. pylori*. Esta es una enzima que inicia la hidrólisis de la urea, con el objetivo de generar amoníaco y CO₂, ayudando a neutralizar la acidez del estómago y permitiendo la movilidad de la bacteria hasta la célula hospedera. En la unidad estructural del complejo supramolecular ureasa se encuentra conformando parte del sitio activo iones de níquel (Ni²⁺), siendo estos necesarios para el efecto catalítico de la ureasa. Por lo tanto, la ureasa se considera un interesante objetivo en la investigación científica.

Los estudios teóricos mediante modelado molecular son bastante atractivos debido a que no es necesario la utilización de un laboratorio experimental de tratamiento de muestras, sino es más bien una alternativa de estudio para comprender los procesos fisicoquímicos que ocurren en un proceso de interacción de un receptor-ligando, logrando de este modo diferenciar que molécula en sí es la que actúa como inhibidor para la ureasa de *H. pylori*. Es por ello que para aplicar esta herramienta es necesario contar con un equipo de cómputo científico de alto rendimiento, un modelo estructural previamente

secuenciado u obtenido por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear y diversos modelos matemáticos que son capaces de predecir el comportamiento de estas estructuras *in silico* y proponer de esta forma nuevos inhibidores.

Hipótesis

Dado que existen grandes avances en la química, física y biología computacional es factible comprender la ácido resistencia de la ureasa como mecanismo de defensa de *H. pylori* frente a pHs bajos, así mismo comprender el efecto de nuevos inhibidores.

Objetivos

General

Evaluar el complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori* a diferentes pHs y la acción de nuevos inhibidores.

Específicos

- Determinar el modelo del complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori* a diferentes pHs.
- Evaluar los componentes del sitio activo del complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori*.
- Estudiar el acoplamiento molecular receptor-ligando.

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1 Infección por *Helicobacter pylori*

La infección por *Helicobacter pylori* se asocia un 70% a casos de gastritis crónica, 90-95% a úlceras duodenales y 60% a pacientes con cáncer. Se estima que más del 50% de la población mundial se encuentra infectada con este microorganismo, pudiendo agravarse debido a diversos factores de riesgo y su gran adaptación al pH del estómago, siendo este último debido a los diversos cambios evolutivos en la historia. Es así que en los años ochenta el grupo de investigación del australiano Robin Warren lograron cultivar e identificar al microorganismo *H. pylori*,¹ una serie de estudios han abordado las raíces de los antepasados de la bacteria, y el primer análisis genómico de las cepas bacterianas sugirieron que existió una coexistencia con los seres humanos.² Al parecer el *Homo sapiens* y *H. pylori* emigraron juntos fuera de África hace más de 60 mil años aproximadamente, ocurriendo transformaciones graduales del genoma bacteriano dando lugar a varios prototipos.³

En los años noventa con la ayuda de la genómica y proteómica se pudo diferenciar cepas de *H. pylori* de diferentes lugares geográficos, los cuales contribuyeron con el descubrimiento de antígenos de *H. pylori* en heces de antiguos pobladores de América del Sur.⁴ Posteriormente estos estudios demostraron que *H. pylori* en América del Sur era de origen asiático.⁵ Con ello es que los siguientes estudios genómicos de cientos de aislamientos revelaron que todas las cepas de *H. pylori* tuvieron un antepasado común.⁶

Actualmente en Estados Unidos, la infección se presenta con menos frecuencia entre la población caucásica que en la población afroamericana e hispánica, generalmente adquirida durante la infancia y prolongándose durante toda la vida si no llega a ser tratada, siendo de mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo que los países desarrollados.⁷ Por otro lado en Asia del Pacífico la prevalencia es alta, donde un 20 a 84% ocurre en niños y adolescentes respectivamente. En la población adulta en Bangladesh, India, Siberia y Taiwán es de casi 90% infectados, mientras Japón va de 55 a 70%. Así mismo la prevalencia en Australia es del 20%, mientras que las tasas varían en Nueva Zelanda, dependiendo del origen de los sujetos, la tasa de 49% en los ciudadanos de las islas del Pacífico, alrededor del 25% en los asiáticos y los maoríes y 14% en los europeos. En Oriente Medio, la tasa de prevalencia de adultos infectados en Egipto es del 90% y en Libia, Arabia Saudita y Turquía de al menos el 80%. Los estudios de África también han reportado una alta prevalencia global (66.1-91.3% en adultos y 44.3% en niños), mientras que los datos de América del Sur muestran una alta prevalencia en la población adulta de Chile y Brasil (78% y 66%, respectivamente), pero tasas más bajas en niños (24,3% y 40,7%, respectivamente). En América del Norte, la prevalencia es de casi 30% (Canadá y Estados Unidos), pero es mucho mayor (79%) en la subpoblación de estadounidenses pobres (principalmente afroamericanos) en los Estados Unidos; la tasa más alta en este último probablemente esté ligada a su ascendencia africana.⁸

La prevalencia de la infección por *H. pylori* en las poblaciones adultas de Europa Occidental oscila entre el 30 y el 50%, mientras que en Europa Oriental es del 70%. La prevalencia más baja se ha encontrado en niños en Holanda (1,2%) y adultos en Suecia (11%), el más alto en la población albanesa (70,7%).^{9,10} La incidencia y prevalencia entre los diferentes países son atribuibles a variaciones en las características de las cepas de *H. pylori* y la interacción de la bacteria con el huésped, pero también están vinculadas a condiciones socioeconómicas y factores ambientales que contribuyen a determinar la expresión de la enfermedad.²

De los diversos factores de riesgo explorados, varios han demostrado afectar significativamente el resultado de la infección por *H. pylori*:

- **Bajo nivel socioeconómico:** Este es un factor de alto riesgo establecido para

la adquisición de la infección, especialmente durante la infancia favorecida por las malas condiciones higiénicas, el hacinamiento familiar, la educación limitada, el acceso limitado al agua potable y la mala alimentación.¹¹

- **Edad:** La incidencia de infección, más prevalente en las categorías de edad más avanzada, aumenta proporcionalmente a la edad, aunque en los países en desarrollo la infección es más frecuente en las categorías de edad más jóvenes, la mayoría de los niños infectados tienen 10 años de edad.²
- **Género:** en adultos en todo el mundo, la infección por *H. pylori* es más frecuente en los varones, pero no se ha reportado tal diferencia en los niños.²
- La presencia de hermanos infectados y diferentes grupos étnicos (especialmente ascendencia africana en algunos grupos de ciudadanos estadounidenses) también han sido reportados como factores de riesgo para la infección.²

1.2 Estructura

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa de forma espiral (0.5 a 1.0 μ m de ancho y 2.5 a 5.0 μ m de longitud), microaerófila y altamente motil debido a la presencia de dos a seis flagelos. Es un microorganismo con capacidad de sobrevivir a condiciones de pH ácido (2-6) debido a la producción de la ureasa, la cual se ve involucrada en regular las condiciones ácidas del medio que rodea a *H. pylori* en el estómago por la hidrólisis de la urea fisiológica y posteriormente la producción de amonio en el medio.¹

1.2.1 Genoma

El genoma de *H. pylori* es circular y relativamente pequeño (1.6-1.73Mb) con un contenido de "G" y "C" del 39%. El análisis de la secuencia ha demostrado que *H. pylori* posee sistemas bien desarrollados para la restricción y modificación del ADN. Además, *H. pylori* posee una gran variedad de genes que codifican adhesinas, lipoproteínas y proteínas de membrana externa que sugieren complejas interacciones huésped-patógeno. El análisis de la secuencia ha mostrado sólo un repertorio metabólico limitado y capacidad biosintética, compatible con su adaptación a un nicho ecológico especial: el

estómago. *H. pylori* consisten de una gran diversidad de cepas, siendo la cepa "26695" una de las más representativas, la cual consiste de aproximadamente 1,7 millones de pares de bases, con unos 1550 genes. Las dos cepas secuenciadas muestran grandes diferencias genéticas, con hasta 6% de los nucleótidos diferentes, el estudio del genoma de *H. pylori* se centra en los intentos de entender la patogénesis, la capacidad de este organismo para causar la enfermedad. Aproximadamente el 29% de los *loci* están en la categoría de "patogénesis" de la base de datos del genoma.¹²

1.3 Patogénesis

En términos generales la patogénesis de *H. pylori*, se debe a su alta supervivencia en el medio ácido y su migración hacia las células epiteliales. La actividad ureasa de *H. pylori* permite neutralizar el ambiente ácido antes de ocasionar la infección. Con ello en acción, *H. pylori* pone en funcionamiento su sistema flagelar que la ayuda a moverse hacia las células epiteliales gástricas del huésped, continuando con la adhesión mediada por proteínas específicas denominadas adhesinas bacterianas que logran ser reconocidas por los receptores de la célula huésped las cuales comprenden proteínas de la membrana externa, incluyendo BabA, SabA, OipA, AlpA, AlpB, NAP, y Hsp60, logrando la colonización y una infección persistente. Finalmente, *H. pylori* libera toxinas efectoras, incluido el gen A asociado a citotoxinas (CagA) y la citotoxina vacuolante (VacA), que causan daños al tejido del huésped. Por lo tanto, cuatro pasos son fundamentales para la colonización y la patogénesis de *H. pylori*: supervivencia al medio ácido, movimiento hacia células epiteliales, adhesión a receptores, y daño tisular.

1.3.1 Ureasa y supervivencia en condiciones ácidas.

La primera descripción de la molécula aislada y cristalizada de la ureasa fue en 1926 y prontamente en 1934 se determinó la masa molecular de 540kDa aproximadamente. Es una enzima dependiente de Ni^{2+} que hidroliza la urea en subproductos de NH_3 y CO_2 , y que tiene dos subunidades funcionales: UreA (26,5KDa) y UreB(60,3KDa), estos conforman un dodecámero compuesto de seis subunidades UreA y seis subunidades UreB, dispuestas en un anillo doble con un diámetro de 13nm.^{13,14} La síntesis de la

ureasa activa requiere la expresión además de los genes estructurales de UreA y UreB, otros cinco genes accesorios: UreE, UreF, UreG, UreH y UreI. Donde UreE, F, G y H son necesarios para la incorporación de iones níquel en la apoenzima y UreI codifica una proteína de membrana interna de seis segmentos transmembrana, la cual permite el ingreso de la urea a la membrana interna de *H. pylori*.¹⁵ La actividad ureasa permite que la bacteria sobreviva en el ambiente del ácido gástrico sobreviviendo durante varias horas a pH 1, restringiendo su supervivencia a la presencia de urea fisiológica (aproximadamente 3mM en el intestino humano y 1mM en el jugo gástrico).¹⁶ La ureasa se encuentra principalmente en el citoplasma bacteriano, sin embargo algunos reportes presentan que la ureasa también ha sido encontrada en la superficie extracelular.¹⁷⁻¹⁹ La cooperación entre las diferentes ureasas es esencial en *H. Pylori* para tolerar condiciones de acidez. El amoníaco generado por la catálisis de la urea permite la supervivencia, sin embargo este metabolito es tóxico para las células huésped, causando hinchazón de los compartimentos ácidos intracelulares, alteraciones en el transporte de la membrana vesicular, reducción de la síntesis de proteínas y producción de ATP y detención del ciclo celular. El amoníaco también puede formar compuestos carcinogénicos al reaccionar con productos intermedios liberados a través de la actividad mieloperoxidasa de las células polimorfonucleares que infiltran la mucosa gástrica inflamada. Finalmente, la ureasa está implicada en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en la mucosa inflamada, y en el desencadenamiento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias.^{20,21}

1.3.2 Flagelos y motilidad bacteriana.

H. pylori posee un sistema flagelar motorizado autoensamblable que contribuye con la motilidad de la bacteria hacia las células epiteliales donde el pH es aproximadamente 7. Este sistema presenta proteínas con alta antigenicidad que pueden ser objetivo de estudios como dianas terapéuticas. El sistema flagelar esta compuesto por el cuerpo basal, el gancho y el filamento flagelar. Cada flagelo presenta dos subunidades proteicas FlaA y FlaB, estas conocidas también como flagelinas. FlaA es una flagelina que esta expuesta al ambiente, mientras que FlaB se ubica en la base. Adicionalmente, en este sistema se observa una morfología helicoidal que facilita el movimiento en el ambiente

ácido y al mismo tiempo viscoso.^{22,23}

1.3.3 Factores de adherencia

El (4%) de la capacidad de codificación del genoma de *H. pylori* se dedica a las proteínas de membrana externa (PME), estas tienen la función de adherirse al epitelio gástrico constituyendo de esta forma un factor importante para la virulencia por *H. pylori*, asegurando la unión de las células del hospedero. Los lipopolisacáridos forman parte de la estructura de membrana externa en la bacteria, la cual ayuda a unirse a una glicoproteína de la matriz extracelular del huésped (laminina). Estos lipopolisacáridos contribuyen con la disminución de la producción de pepsinógeno por parte del huésped y evitando la degradación de la célula bacteriana.²⁴ Esta adhesión protege a *H. pylori* de la acidez gástrica y disminuye la probabilidad de ser eliminado por el flujo permanente de los líquidos, movimientos peristálticos, reducción del jugo gástrico y el desprendimiento de la mucosa que se da normalmente como proceso de regeneración.²⁵⁻²⁸ A continuación se detallan algunas adhesinas:

- **Adhesina de unión a antígeno de sangre (BabA - Blood group antigen binding adhesin).** Se han identificado tres alelos bab (BabA1, BabA2, y BabB), sólo el gen BabA2 es funcionalmente activo. La estructura del receptor BabA es similar al antígeno de sangre de tipo O. Cuando esta proteína se une a los antígenos Lewis b (Leb) incrementa su adherencia. Por lo que *H. pylori* se une a las células receptoras del hospedero induciendo grandes cambios inmediatos en el genoma que generan señales de transducción, estableciendo mecanismos para evadir la respuesta inmune.^{25,29,30}
- **Adhesina de unión a ácido siálico (SabA- Sialic acid-binding adhesin).** Es la segunda adhesina mejor caracterizada, y asociada con el desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia gástrica y cáncer gástrico.^{31,32} SabA puede reconocer el antígeno Lewis X (LeX), presente en la superficie de las células epiteliales gástricas humanas.
- **Proteína A Activadora De Neutrófilos (NAP - Neutrophil activating protein A).** Es una adhesina que estimula el daño de tejidos locales por la

producción de especies reactivas de oxígeno de los neutrófilos los cuales logran unirse a las células infectadas por *H. pylori* induciendo la expresión y liberación de IL-8. Finalmente logra ser un agente causal de la gastritis crónica.³³

- **Proteína de choque térmico 60 (Hsp60 - Heat shock protein 60).** Es una proteína inmunógena que induce la liberación de IL-6, IL-8, factor α de necrosis tumoral (TNF- α), y producción de células epiteliales gástricas.³⁴
- **Proteína inflamatoria externa (OipA - Outer inflammatory protein A).** El gen OipA codifica para esta proteína, pero sólo algunas suelen expresarse.^{35,36} Esta proteína tiene un peso molecular de 33-35kDa, inicialmente fue denominada como proteína de respuesta proinflamatoria, asociada con el incremento de la secreción de IL-8; en las células epiteliales gástricas. OipA es capaz de inducir la activación del centro de la quinasa de adhesión y promover el reordenamiento del citoesqueleto.³⁷

1.3.4 Factores de Virulencia

Los factores de virulencia aumentan la probabilidad del desarrollo de la enfermedad, pudiendo ser de por vida y asintomática, sin embargo estos factores facilitan principalmente la colonización y la persistencia de la infección.

- **CagA (Citotoxina asociada al gen A).** El gen CagA como miembro importante de CagPAI (Isla de patogenicidad cagPAI) presenta mutaciones y polimorfismos que están relacionadas con el cáncer gástrico. Una vez dentro de la célula, CagA es fosforilado por quinzas en el motivo Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) encontrado en la mitad del dominio C-terminal de la proteína. La CagA fosforilada se dirige al complejo de unión apical de la monocapa de células epiteliales a través del extremo N-terminal de la molécula, con lo cual es suficiente para interrumpir los mecanismos que mantienen la diferenciación epitelial normal, incluyendo la adhesión celular, la polaridad celular, y la inhibición de la migración celular. A través de sus motivos EPIYA fosforilados, CagA interactúa con un gran número de proteínas de células hospederas que llevan dominios SH2, lo que da lugar a reordenamientos del citoesqueleto y en la desregulación de varias vías de trans-

ducción de señales. Todos estos efectos parecen estar controlados por diferentes dominios de la proteína CagA, algunos de los cuales son dependientes de la fosforilación, especialmente aquellos que interfieren con cascadas de señalización, mientras que aquellos que se relacionan con las uniones apicales son independientes de fosforilación.^{38,39}

- **VacA (Citotoxina vacuolizante A).** El gen VacA está prácticamente presente en todas las especies de *H. pylori*, la toxina tiene un peso molecular de aproximadamente 87kDa, induce la vacuolización, formando canales en la membrana, así mismo esta involucrada en promover la liberación del citocromo C de la mitocondria generando muerte celular por apoptosis. Recientemente, se encontró que VacA induce la fosforilación de la quinasa Src la cual es responsable de la fosforilación de tirosina de CagA.^{39,40}
- **DupA (Promotor de úlcera duodenal).** El gen promotor DupA se encuentra en la región de plasticidad del genoma de *H. pylori*. La patogénesis de DupA parece estar implicado en la inducción de la producción de IL-8 en el antro, lo que conduce a la gastritis predominante en el antro, característica bien conocida de la úlcera duodenal.⁴¹ Así mismo se ha descrito que *H. pylori* induce la producción de IL-12 de monocitos.^{39,42}

1.4 Transmisión

Aunque existe una amplia investigación epidemiológica sobre *H. pylori*, todavía existe incertidumbre en la forma en que se transmite, la transmisión de la infección ocurre comúnmente vía oral-oral a través de la saliva o vómito y fecal-oral, sin embargo se ha propuesto que la vía principal de entrada del organismo se ha trazado como lo siguiente: oral-oral, gastro-oral, y fecal-oral. La transmisión puede ocurrir en un modo vertical u horizontal. El transporte oral de *H. pylori* puede desempeñar un papel en la transmisión de la infección.⁴³⁻⁴⁵

- **Transmisión oral-oral.** La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de *H. pylori* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva;

también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva; pero otras bacterias de la flora oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada. El escollo más importante para esta posibilidad es el pobre acervo bibliográfico relacionado con el cultivo de la bacteria a partir de muestras orales.⁴⁶

- **Transmisión gastro-oral.** Se transmite durante periodos de enfermedad, a través del contacto con vómito y de manera iatrogénica a través de procedimientos como colocación de sondas orogástricas, endoscopías y accesorios.⁴⁷
- **Transmisión fecal-oral.** Es la transmisión de los patógenos en heces de una persona a la cavidad oral de otra persona, la ingesta directa o indirecta de aguas contaminadas.⁴⁸

1.5 Cuadro Clínico

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o después de años logra desarrollar úlcera péptica o gastritis. Pocos sujetos infectados tienen síntomas y no desarrollan complicaciones clínicas relevantes. La mayoría de los pacientes sintomáticos se quejan en principio de episodios de gastritis, con síntomas inespecíficos como: hinchazón, eructos, sensación de quemazón, dolor epigástrico con náuseas, vómitos y sensación vaga de malestar abdominal. Estos síntomas suelen ceder espontáneamente y pueden repetirse persistiendo y progresando, sólo una pequeña proporción de pacientes infectados desarrolla enfermedades gastroduodenales mayores relacionadas con *H. pylori*, debido a las complejas interrelaciones entre las características genéticas de la cepa infectante de *H. pylori*, factores ambientales, estilo de vida y respuesta inmunológica.⁴⁹

1.5.1 Dispepsia

Tradicionalmente, el término se refiere a una serie de síntomas inespecíficos localizados en la región abdominal superior. La dispepsia se puede dividir en dos categorías principales: orgánica y funcional. Las posibles causas de dispepsia orgánica incluyen úlcera

péptica, ERGE (enfermedad por reflujo gastroesofágico), cáncer gástrico o esofágico, enfermedades pancreáticas o hepatobiliares e intolerancia alimentaria.⁵⁰ La dispepsia funcional es un trastorno gastroduodenal funcional que presenta síntomas dispépticos como plenitud postprandial, saciedad temprana, quema epigástrica o dolor epigástrico en ausencia de enfermedad orgánica, resultado de lesiones gastroduodenales, las causas son multifactoriales, pero la infección por *H. pylori* es un candidato probable.⁵¹ La infección con este patógeno da lugar claramente a una inflamación crónica de la mucosa en el estómago y el duodeno, lo que a su vez puede conducir a anormalidades en la motilidad gastroduodenal y en la sensibilidad. La gastritis crónica también puede afectar una variedad de funciones endocrinas del estómago, incluyendo la producción de las hormonas gastrointestinales y neurotransmisores somatostatina, gastrina y ghrelina. Aunque estas anomalías pueden generar síntomas en algunos pacientes con dispepsia funcional, la evidencia clínica necesita ser evaluada críticamente antes de que esta hipótesis pueda ser confirmada.⁵²

1.5.2 Gastritis

La gastritis es una afección inflamatoria común de la mucosa gástrica, la extensión y distribución de la gastritis están relacionadas con su etiología y las respuestas del huésped; se manifiesta como una enfermedad transitoria leve caracterizada por dolor epigástrico, náuseas, hallazgo histológico de gastritis neutrofílica y una hipoclorhidria transitoria. Diversos estudios epidemiológicos revelaron una estrecha relación de la gastritis con *H. pylori*, por lo que produce una serie de enzimas irritantes para las células del estómago, otras activas contra la capa de moco, tornándose más débil, dejando la pared del estómago desprotegida contra el contenido ácido, por lo cual provocan inflamación de la mucosa del estómago, lo cual lleva a la gastritis.⁵³⁻⁵⁵

1.5.3 Úlcera péptica

Son lesiones benignas de la mucosa que penetran profundamente en la pared intestinal, más allá de la mucosa muscular y forman cráteres rodeados de infiltrados inflamatorios agudos y crónicos. Un individuo infectado con *H. pylori* tiene un riesgo estimado de por vida de aproximadamente 10-20% para el desarrollo de úlcera péptica. La infección por

H. pylori se puede diagnosticar en el 90-100% de los pacientes con úlcera duodenal y en el 60-100% de los casos de úlcera gástrica. La gastritis inducida por *H. pylori* puede progresar hasta la ulceración de la mucosa. La apoptosis de las células epiteliales y el posterior compromiso en la barrera protectora de la mucosa expone la mucosa gástrica al ataque directo del ácido luminal y la pepsina. La oclusión de las arterias terminales de la mucosa debido a la alteración de la actividad fibrinolítica puede contribuir a la naturaleza focal de la úlcera péptica.^{56,57}

1.5.4 Cáncer gástrico

H. pylori ha sido implicado como el factor de riesgo más fuerte en la patogénesis del adenocarcinoma gástrico, especialmente el tipo distal y por lo tanto, ha sido clasificado como un carcinógeno de clase I por la OMS (Organización Mundial de la Salud). La patogénesis del cáncer gástrico incluye una secuencia de eventos que comienza con la gastritis superficial crónica inducida por *H. pylori*, progresando hacia la gastritis atrófica, la metaplasia intestinal, la displasia y finalmente el cáncer gástrico. Esta secuencia tarda décadas en completarse. Varios aspectos del medio inflamatorio que han sido implicados como carcinógenos incluyen: aumento del estrés oxidativo y la formación de radicales libres de oxígeno que conduce al daño del ADN, aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1B y TNF que estimulan una mayor rotación celular y reducen Apoptosis, y el potencial de reparación de ADN defectuoso o incompleto.⁵⁸⁻⁶⁰

1.5.5 Linfoma MALT

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) es el resultado de un proceso de múltiples etapas que comienza con la infección por *H. pylori* y el consiguiente reclutamiento de células B y T. Es un tipo de linfoma que puede afectar a diversos órganos del cuerpo humano, entre otros al estómago, causada por la secreción de ureasa por parte de *H. pylori*, desencadenando la infiltración de linfocitos y por lo tanto el establecimiento de MALT. Las células B y T son estimuladas por células específicas de *H. pylori*, adquiere anomalías genéticas formando clones, posiblemente por trisomía 3, convirtiéndose en linfoma de bajo grado dependiente de *H. pylori*. Los factores de virulencia de *H.*

pylori parecen ser cruciales para el desarrollo del linfoma gástrico.⁶¹

1.6 Diagnóstico

Una variedad de métodos para la detección de *H. pylori* se han descrito y se han mejorado y extendido continuamente con el tiempo. Los métodos diagnósticos para la infección por *H. pylori* suelen clasificarse como invasivos y no invasivos, donde; las pruebas invasivas requieren endoscopia gastrointestinal para obtener la muestra, mientras los métodos no invasivos incluyen la prueba de aliento de urea, serología y prueba de antígeno de heces.^{62,63}

1.6.1 Métodos no invasivos

- **Test de urea**, detecta la actividad de la enzima ureasa de *H. pylori*, donde el CO_2 que difunde a través de la mucosa gástrica a la circulación general, posteriormente a la circulación venosa capilar y difundiéndose a través del plexo capilar hacia los alvéolos, para finalmente ser expulsado en el aliento y este ser detectado por moléculas de carbono marcadas (^{13}C y ^{14}C). Por su cualidad radioactiva, se recomienda evitar el uso de ^{14}C en niños y gestantes. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentra alrededor de 88% a 95% y 90% a 100% respectivamente.⁶⁴
- **Serología**, detecta anticuerpos IgG o IgA contra *H. pylori* en el suero, sangre total u orina del paciente, mediante la técnica de ELISA. Puede ser realizada de manera cuantitativa y cualitativa a través de kits especiales. La sensibilidad de este método se encuentra alrededor de 90% a 100%, mientras que la especificidad varía entre 76% a 96%. La serología es de bajo costo, fácil y rápida realización; sin embargo no diferencia entre una infección activa y de otra inactiva, y su valor predictivo positivo y negativo depende en gran medida de la probabilidad de infección previa al test. Las pruebas en suero y orina muestran una eficacia similar, a diferencia de las realizadas en saliva, cuya sensibilidad y especificidad es bastante inferior.⁶⁵

- **Detección del antígeno en heces**, detecta la presencia de antígenos de *H. pylori* en las heces de los pacientes infectados mediante la técnica de inmunoensayo enzimático. Se realiza en el laboratorio con anticuerpos policlonales. La sensibilidad y especificidad de esta prueba se encuentra alrededor de 94% y entre 86% a 92% respectivamente. La sensibilidad disminuye a 69% si la muestra de heces permanece a temperatura ambiente por 2 a 3 días.⁶⁵

1.6.2 Métodos invasivos

- **Histología**, La histología fue el primer método utilizado para la detección de *H. pylori*, con este método se observa la reacción inflamatoria del tejido en presencia de *H. pylori*, así mismo la alta sensibilidad de la histología a menudo está influenciada por el sitio, el número y el tamaño del material de las biopsias recogidas.⁶⁶
- **Test de la ureasa en tejido gástrico biopsiado**, detecta la enzima ureasa en muestras de biopsia del antro gástrico. La más común de las técnicas es la CLOtest (prueba “Campylobacter like organism”), que consiste en colocar una o dos piezas de tejido biopsiado en agar con urea y un reactivo de pH. La ureasa hidroliza la urea liberando amonio, el cual alcaliniza el pH, produciendo un cambio de color del reactivo.⁶⁷
- **Cultivo**, el uso del cultivo ocurre principalmente después del fracaso del tratamiento con antibióticos, es un método que ofrece la posibilidad de realizar una prueba de sensibilidad antibiótica; sin embargo, es costoso, de larga duración (el tiempo promedio de incubación es de 10 días) y es necesario tener cuidado a la hora de manipular el tejido biopsiado.⁶⁸

1.7 Tratamiento

1.7.1 Principio del tratamiento

Los fármacos diseñados para eliminar a *H. pylori* requieren ingresar a la mucosa gástrica, para ello es necesario disminuir la producción de mucosa gástrica con los

inhibidores de bombas de protones (IBPs) los cuales disminuyen el volumen del jugo gástrico y aumentan la permeabilidad. Actualmente forma parte del régimen de tratamiento para dirigir los fármacos que se encargan de inhibir al patógeno, debido a que estos son inestables a bajos pHs. La claritromicina es muy sensible de degradación a la acidez gástrica teniendo un tiempo de vida media menor a una hora en pH 2, el metronidazol es muy estable a condiciones de acidez con un tiempo de vida media de 800 horas. La amoxicilina es menos estable a pH bajo con un tiempo de vida medio de 15 horas.⁶⁹

Actualmente el tratamiento se basa en una combinación de agentes antimicrobianos y antisecretores, por lo que elevar el pH con agentes antisecretores promueve efecto bactericida. Los agentes antimicrobianos y antisecretores no solo dependen de su acción farmacológica, sino de sus propiedades farmacocinéticas. Muchos agentes antimicrobianos que incluyen a la amoxicilina, claritromicina, levofloxacina, metronidazol, tetraciclina, rifabutina y compuestos que contienen bismuto, son usados en la terapia con *H. pylori*, mientras como antisecretores se encuentran los inhibidores de bombas de protón (IBPs).⁷⁰ En la Tabla 1.1 se muestra una lista de los regímenes de tratamiento propuestos para el manejo de la infección de *H. pylori*.

1.7.2 Nuevas estrategias de tratamiento

Con el proyecto del Genoma Humano se abre un camino para la medicina personalizada contribuyendo con el descubrimiento de nuevos fármacos y el tratamiento dirigido de diversas enfermedades. Por lo que actualmente un área que esta ganando mucha importancia dentro de las ciencias, y que permite explorar diversos acontecimientos que se dan dentro de una célula es el uso de simulaciones de dinámica molecular mediante el uso de un ordenador con programas que pueden hacer aproximaciones matemáticas de diversos comportamientos biológicos que ocurren en menos de un milisegundo. Es por ello que en este trabajo de investigación teniendo en cuenta el gran avance dentro de la ciencias biomédicas y especialmente con el uso de la física, química y biología computacional es posible reproducir y aproximarnos al real comportamiento de blancos terapéuticos como es el caso de la ureasa de *H. pylori* a condiciones de pH bajos y el estudio de nuevos inhibidores con prometedoras funciones.

Tabla 1.1: Regímenes de terapia para la infección por *H. pylori*

Terapia de Primera Línea	
Terapia triple estandar	IBP (Dosis estandar, dd), claritromicina (500mg, dd) y amoxicilina (1g, dd) por 7 -14 días
Terapia concomitante	IBP (Dosis estandar, dd), claritromicina (500mg, dd), amoxicilina (1g, dd) y metrodinazol (500mg, dd) por 7-10 días
Terapia híbrida	Terapia dual de 7 días con IBP (Dosis estandar, dd) y amoxicilina (1g, dd) seguido por una terapia cuádruple de 7 días con IBP (Dosis estandar, dd), amoxicilina (1g, dd), claritromicina (500mg, dd) y metrodinazol (500mg, dd)
Terapia cuádruple que contiene bismuto	IBP (Dosis estandar, dd), bismuto (Dosis estandar, cd), tetraciclina (500mg, cd), y metrodinazol (250mg, cd) por 10-14 días
Terapia de Segunda Línea	
Terapia triple basada en levofloxacina	IBP (Dosis estandar, dd), levofloxacina (500mg, ud), y amoxicilina (1g, dd) por 10 días
Terapia cuádruple que contiene bismuto	IBP (Dosis estandar, dd), bismuto (Dosis estandar, cd), tetraciclina (500mg, cd) y metrodinazol (500mg, td)
Terapia Secuencial	
Terapia secuencial	Terapia dual de 5 días con IBP (Dosis estandar, dd) y amoxicilina (1g, dd) seguida por terapia triple de 5 días con IBP (Dosis estandar, dd), claritromicina (500mg, dd) y metrodinazol (500mg, dd)
Terapia de Tercera Línea	
Terapia de cultivo guiado	Terapia cuádruple de 10 días que comprende IBP (Dosis estandar, dd), bismuto (Dosis estandar, cd) y dos antibióticos seleccionados por pruebas de sensibilidad antimicrobiana
Terapia cuádruple basada en levofloxacina	IBP (Dosis estandar, dd), bismuto (Dosis estandar, cd), levofloxacina (500mg, ud) y amoxicilina (500mg, cd) por 10 días

Abreviación: dd, dos veces al día; IBP, inhibidor de bomba de protón; ud, una vez al día; cd, cuatro veces al día; td, tres veces al día

Capítulo 2

Detalles Computacionales y Metodología

2.1 Detalles Computacionales

Los cálculos de simulación de dinámica molecular se realizaron en un ordenador de cómputo científico, con procesador i7 de 3.2GHz, 64Gb de memoria RAM, 2 discos duros de 04 y 06 TB, y dos aceleradores de Video GTX 1080. Los programas computacionales fueron de libre distribución e instalados en el sistema operativo Linux. Estos programas fueron: GROMACS 2016, VMD, PROPKA, GNU PLOT.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparación del complejo supramolecular Ureasa

El primer paso para aplicar los métodos de simulación de dinámica molecular fue la obtención del complejo supramolecular, para lo cual se hizo uso de la base de datos de estructuras protéicas Protein Data Bank - PDB (<https://www.rcsb.org>), bajo el código de acceso PDB ID: 1E9Z descargado como “Biological Assembly”. Esta estructura protéica consistió de 12 heterodímeros (α/β), cada heterodímero con un sitio activo conformado por iones de Ni^{+} y además de una molécula de *OH* que mantiene la unión de los metales a los residuos de la proteína. Se identificaron a los siguientes residuos

como parte del sitio activo de la cadena α : HIS136, HIS138, HIS248, HIS274, ASP362 y KCX219 (lisina carboxilada). Todas las visualizaciones se realizaron en el programa VMD (visual molecular dynamics).⁷¹

2.2.2 Simulador de estados de protonación a diferentes pHs

La evaluación de un sistema para un pH dado, requiere del conocimiento de constantes de acidez (pK_a) de cada residuo. Para este trabajo se usó el programa PROPKA,⁷² el cual calcula el pK_a de los residuos ionizables en una proteína mediante cinco criterios; el primer paso hace la lectura de las coordenadas espaciales de cada residuo que compone la proteína, el segundo utiliza algoritmos simples para determinar la posición de los puentes de hidrógeno que se generan por los grupos ionizables, el tercero realiza el cálculo temporal del pK_a para los grupos ionizables, el cuarto verifica el valor de pK_a iterativo del sistema y el quinto consolida las predicciones anteriores para un sólo cálculo. Por lo que el valor del pK_a de un grupo ionizable en una proteína se predice aplicando una perturbación ambiental que actúa en base a los cinco criterios. La ecuación 2.1 se define por lo siguiente:

$$pK_a = pK_{model} + \Delta pK_{DS} + \Delta pK_{HB} + \Delta pK_{CC} \quad (2.1)$$

Donde pK_{model} es el pK de los residuos ionizables en un entorno acuoso ideal, ΔpK_{DS} evalúa la penalización por desolvación, ΔpK_{HB} evalúa el efecto de los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral y esqueleto, y ΔpK_{CC} evalúa el efecto de la interacción con otros grupos cargados. Posterior al cálculo de el valor de pK_a estimado para cada residuo se preparó un sistema para diferentes condiciones de pH restringiendo la carga de los residuos que componen el sitio activo, para ello se usó el procedimiento SGCMC (semi-grand canonical Monte Carlo) el cual usa un conjunto de microestados considerando la distribución de los diferentes estados de protonación para cada residuo que conforma la proteína compatible con una carga total neta. El algoritmo de Monte Carlo consideró la energía libre asociada con el proceso de protonación/desprotonación de cada residuo cargado de acuerdo con la ecuación 2.2^{73,74}:

$$\Delta G = \pm K_B T (\ln(10)) (pH - \log(K_i)) \quad (2.2)$$

Esta ecuación usa un signo positivo para la protonación, y un signo negativo para la desprotonación. K_i es la constante de protonación de cada residuo cargado "i", obtenida del programa PROPKA. Las simulaciones de Monte Carlo se realizaron utilizando los valores de pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, y pH 7, en un total de 100 000 pasos.

2.2.3 Simulación de dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es una técnica de simulación por ordenador en el cual se puede seguir la evolución temporal de un conjunto de átomos que interactúan integrando sus ecuaciones de movimiento.

La simulación de dinámica molecular es un método que se caracteriza por el uso de física estadística el cual conecta la física microscópica con la física macroscópica, buscando entender las propiedades macroscópicas y su dependencia por constituyentes microscópicos. La física estadística depende de herramientas matemáticas, con el previo entendimiento de la termodinámica, mecánica clásica y mecánica cuántica.

Para los cálculos de todas las simulaciones se usó el paquete computacional Gromacs (Groningen Machine for Chemical Simulation) v. 2016.4⁷⁵ y el campo de fuerza OPLS-AA.⁷⁶ Se trabajó el complejo supramolecular ureasa a los siguientes pHs: pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, y pH 7. Cada proteína fue puesta en una caja cúbica de 1.5 nm de distancia del centro de masa hacia la pared de la caja, así mismo se consideró el modelo de agua TIP4P⁷⁷ que proporcionan una descripción razonable del agua y se adicionaron iones de Na^+ y Cl^- .

La simulación de minimización de energía se realizaron con el algoritmo *steepest-descent* con un paso de 1 fs durante una trayectoria de 200 ps. Este proceso de minimización de energía se realizó con el fin de relajar la geometría molecular, evitando cualquier choque atómico que pueda existir. Se usaron condiciones periódicas de contorno (PBC)⁷⁸ en todas las direcciones, se consideró un cut-off de 1.0 nm para las interacciones electrostáticas van der Waals (vdW) de corto alcance y Particle-Mesh Ewald (PME)⁷⁸ de largo alcance.

Para el cálculo de las propiedades termodinámicas de los sistemas macroscópicos, a partir de sus propiedades microscópicas fue necesario el cálculo de los promedios sobre los posibles estados microscópicos representados en la colectividad. La colectividad representa el conjunto de copias asociada al sistema, cada una de ellas en cualquier microestado posible. En general existen 3 colectivos formales para las aplicaciones teóricas; la colectividad microcanónica que evalúa el sistema aislado en el que no puede intercambiar energía o partículas con su entorno, la colectividad canónica que analiza el sistema en un baño térmico, y la colectividad macrocanónica aplicado al equilibrio sólido-vapor.

Además de estas principales colectividades, se han diseñado otras para cada conjunto de ligadura que pueda estar sujeto a un sistema termodinámico, por lo que otro colectivo que estudia el intercambio energético en un baño térmico, modificando su volumen para alcanzar el equilibrio resulta ser el colectivo isobárico-isotérmico, el cual fue usado para los cálculos de la producción de dinámica molecular en el presente trabajo.

Los cálculos de las propiedades termodinámicas de los diferentes sistemas se realizaron mediante simulaciones de dinámica molecular con el integrador *leap-frog* considerando el equilibrio y la producción de la simulación. El equilibrio se dio en el colectivo canónico - NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante) por 0.2 ns de trayectoria, con restricción de la posición de proteína. La producción se realizó en el colectivo isobárico-isotérmico - NPT (número de moléculas, presión y temperatura constante) sin restricción de la posición de la proteína con 10 ns de tiempo de cálculo. La temperatura fue de 309.65°K regulada con el termostato de V-rescale,⁷⁹ una modificación del termostato de Berendsen y a 1.0 bar de presión usando el barostato Parrinello-Rahman.⁸⁰

2.2.4 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método muy usado para predecir el sitio de unión de un ligando a una diana terapéutica. Así mismo este método se ha convertido en una herramienta cada vez más importante para el descubrimiento de fármacos. Las predicciones de acoplamiento se dieron en el programa PatchDock, ampliamente usado para el acoplamiento y detección virtual de moléculas pequeñas a receptores macro-

moleculares mediante el acoplamiento rígido-rígido.^{81,82} El acoplamiento rígido-rígido con la variabilidad/flexibilidad de la superficie abordada implícitamente a través de la penetración intermolecular, ignorando la flexibilidad de las moléculas y tratándolas como objetos. El algoritmo realiza transformaciones en el espacio 3D de una de las moléculas que la haga encajar de manera óptima con la otra molécula en términos de una función de puntuación (score).

En nuestro estudio se tomó en cuenta uno de los heterodímeros de la ureasa (α/β) como receptor. En cuanto al ligando se consideró la elección de la librería en base al fármaco ácido acetohidroxámico el cual ha mostrado capacidad de inhibir a la ureasa. Sin embargo, a la fecha no se cuenta con inhibidores de la ureasa de *H. pylori*, por lo que usaremos al ácido acetohidroxámico y derivados de este, con un identidad al 70%. Se usó la base de datos ZINC Docking (<http://zinc.docking.org/>) en el cual se encuentran reportados diversos compuestos disponibles comercialmente para la detección virtual de nuevos fármacos.⁸³ Por otro lado para verificar la calidad del sitio activo se usó PockDrug disponible bajo el siguiente link: <http://pockdrug.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/index.py?page=Druggability>.

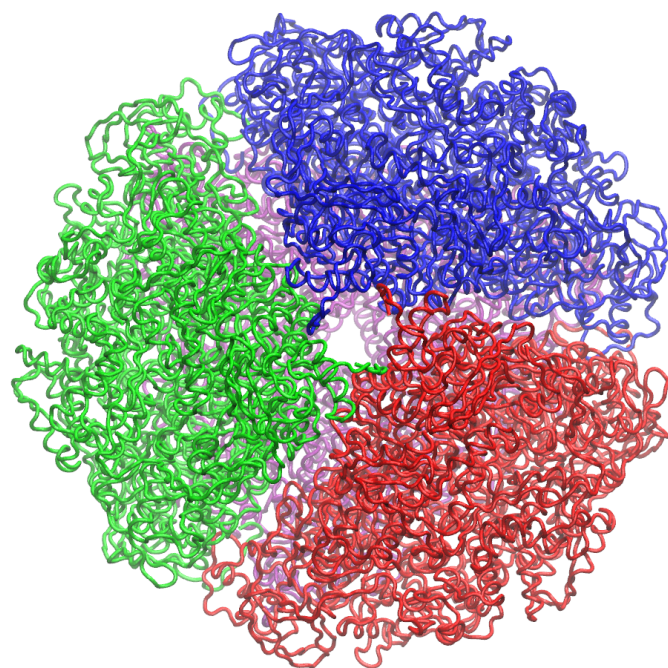
Capítulo 3

Resultados y Discusión

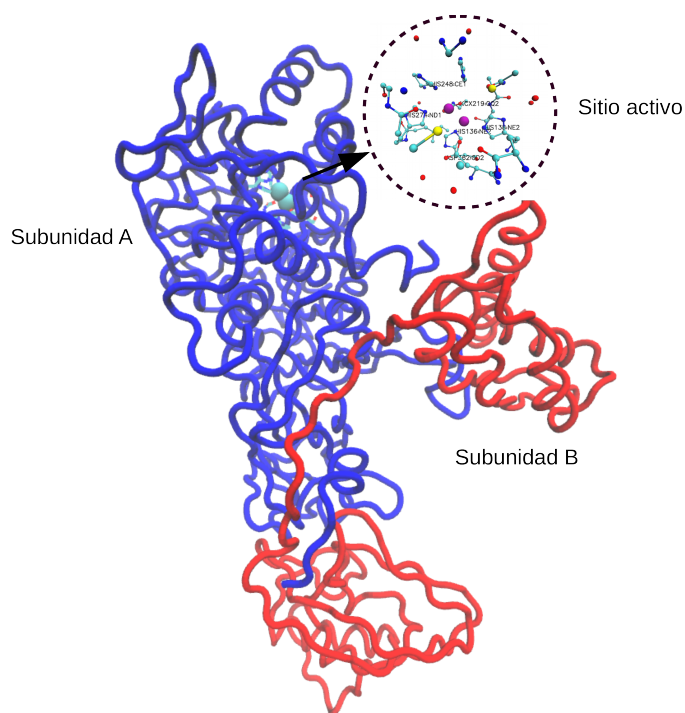
3.1 Análisis estructural de Ureasa a diferentes pHs

La ureasa es una proteína multimérica, provista de 12 heterodímeros, cada heterodímero compuesto de dos subunidades α y β , la primera pesa 61.7 kDa y la segunda 26.5 kDa. La subunidad α presenta los residuos del sitio activo. La estructura de la ureasa de *H. pylori* a diferencia de otras especies, forma 4 unidades de tres heterodímeros obteniendo un modelo de $((\alpha\beta)_3)_4$ que forma un dodecámero. En la Figura 3.1 se muestra la estructura del complejo molecular ureasa, además la representación de un heterodímero $\alpha\beta$ con el sitio activo, por lo que la arquitectura de la ureasa apoya su resistencia y supervivencia en las condiciones ácidas duras del estómago.

Sin embargo dentro de las características estructurales, también se han encontrado que al igual que otras ureasas, esta se encuentra cubierta por una solapa móvil de sus siglas en inglés "flap" que cumple un rol fundamental para el ingreso de la urea al sitio activo y de esta forma hidrolizarla y generar subproductos de NH_3 y CO_2 que ayuden a *H. pylori*. Así mismo vemos que los flaps dependen de las variaciones de pH. En *H. pylori* se ha identificado que el flap va desde los residuos 304 al 347 de la subunidad α .



(a)



(b)

Figure 3.1: Descripción estructural del complejo supramolecular ureasa. (a) Cuatro grupos de tres dímeros que forman la estructura multimérica. (b) Heterodímero ($\alpha\beta$) y su sitio activo compuesto por níquel.

Teniendo en cuenta la descripción estructural de la ureasa, se analizó el complejo supramolecular para diferentes condiciones de pH. La carga total de la ureasa para los diferentes pHs se muestran en la Tabla 3.1, así mismo se reportan a los iones que fueron adicionados para cada sistema. En este punto se pudo verificar que la ureasa del pH 2 al pH 6 se le adicionaron iones de Cl^- , mientras que al único sistema que se le adicionó iones de Na^+ fue al de pH 7. Durante este proceso, se vio que uno de los problemas actuales para la simulación de proteínas a un pH diferente, requiere de previos tratamientos del modelo estructural que consideren la restricción de la carga neta de la ureasa. En este punto notamos la importancia de los procesos de protonación/desprotonación de los residuos ionizables en el vacío, los cuales dependen principalmente de sus características de basicidad estimada mediante el valor de pK_a obtenido en PROPKA.

Además de considerar el efecto del pH en los análisis, las ureasas son las únicas hidrolasas que poseen cationes de Ni^{+2} en el sitio activo. Por lo que fue necesario considerar la ubicación aproximada del níquel, teniendo en cuenta la coordinación pentamérica y hexamérica. Para la ideal coordinación de los níquels, fue necesario la incorporación de una molécula de OH.

Tabla 3.1: Carga total de los sistemas a diferentes pHs.

	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Carga Total	1382	1224	838	422	203	-8*

* Neutralizada con iones de Na^+

3.2 Análisis de la simulación de dinámica molecular

3.2.1 Root-mean-square deviation - RMSD

Utilizando el primer marco de lectura después del equilibrio como punto de referencia, se analizó el RMSD promedio a partir de 2 ns del *backbone* de cada complejo supramolecular. Este análisis nos indicó que los sistemas mostraron a pH2 (0.44 ± 0.05 nm), pH3 (0.41 ± 0.04 nm), pH4 (0.38 ± 0.04 nm), pH5 (0.28 ± 0.02 nm), pH6 (0.24 ± 0.02 nm), y pH7 (0.22 ± 0.01 nm).

Los valores de RMSD más grandes de las estructuras indicaron que las topologías generales de las estructuras han cambiado, siendo la estructura a pH2 la que mayor RMSD promedio obtuvo.

En la Figura 3.2, se muestran las diferencias de los modelos estructurales a diferentes pHs, donde la ureasa a pH 2 sufre para llegar a su estabilidad mostrándose en la figura una tendencia por encima de los demás pHs, por lo que a pesar de que es la misma proteína existe un efecto sobre la estructura de la proteína mediada por el efecto del pH.

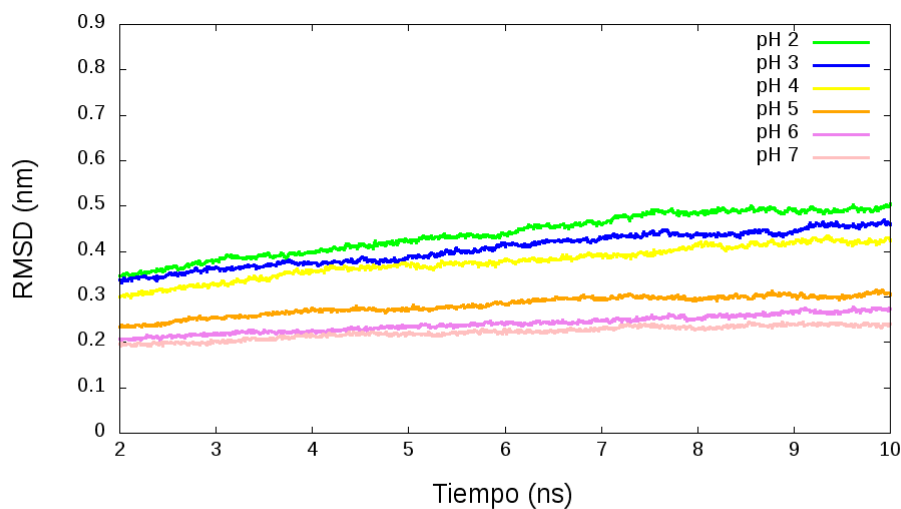


Figure 3.2: Root-mean-square deviation - RMSD a partir de 2ns. La línea de color verde nos indica el promedio del RMSD de la ureasa a pH 2 en función del tiempo, a diferencia de los demás pHs este modelo se muestra divergente a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

Por otro lado según otros reportes de investigación los flaps se encuentran abiertos a condiciones de pHs bajos. En nuestro estudio se hizo el análisis de 12 flaps, los cuales se ubicaron cerca del sitio activo, a esta región se le hizo el análisis del RMSD de la subunidad α en las posiciones 304 a 347.

En la Tabla 3.2 se muestra el promedio y desviación estándar para cada solapa a diferentes pH. En esta se observa que el promedio por cada pH queda mayormente

abierto para pH 2, lo que nos indica que efectivamente las condiciones de pHs bajos favorecen la apertura de las flaps, permitiendo el ingreso de la urea al sitio activo. Finalmente podemos notar que los valores de RMSD promedio mayor a 0.2 nm nos indica un flap abierto mientras que menor a 0.2 nm el flap se muestra cerrado.

Tabla 3.2: RMSD de los flaps del complejo supramolecular ureasa.

Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
1	0.26	0.03	0.19	0.02	0.19	0.02	0.21	0.01	0.17	0.01	0.17	0.02
2	0.2	0.03	0.25	0.02	0.2	0.01	0.16	0.02	0.16	0.03	0.16	0.01
3	0.37	0.03	0.24	0.02	0.15	0.01	0.24	0.02	0.16	0.01	0.15	0.01
4	0.3	0.04	0.23	0.02	0.2	0.02	0.16	0.01	0.19	0.03	0.14	0.01
5	0.2	0.01	0.18	0.01	0.2	0.02	0.15	0.01	0.12	0.01	0.15	0.01
6	0.29	0.01	0.25	0.03	0.21	0.02	0.24	0.02	0.22	0.01	0.24	0.05
7	0.3	0.02	0.15	0.02	0.25	0.02	0.19	0.03	0.18	0.02	0.16	0.01
8	0.21	0.01	0.2	0.01	0.27	0.02	0.1	0.02	0.21	0.02	0.2	0.02
9	0.33	0.01	0.18	0.01	0.19	0.02	0.2	0.03	0.19	0.03	0.13	0.01
10	0.22	0.03	0.31	0.04	0.16	0.02	0.2	0.02	0.22	0.01	0.13	0.01
11	0.23	0.01	0.15	0.02	0.18	0.02	0.16	0.01	0.13	0.01	0.19	0.02
12	0.23	0.01	0.19	0.02	0.2	0.02	0.22	0.02	0.23	0.04	0.17	0.01
Promedio	0.26	0.02	0.21	0.02	0.2	0.02	0.18	0.02	0.18	0.02	0.17	0.02

En la Figura 3.3; se muestra el RMSD correspondiente a los 12 flaps. Un valor alto de RMSD indica un flap abierto y un valor bajo indica un flap cerrado. Cabe mencionar que los flaps pueden estar presentes bajo tres modalidades: abierto, semiabierto y cerrado. Para el caso del pH 6 y pH 7 se observaron en sus tres modos, mientras que a pH 5, pH 4, pH 3, y pH 2 el sistema esta semiabierto y abierto.

Los valores que son representados en la Figura 3.3 nos muestra que los flaps a pH 2 se encuentran por encima de un RMSD promedio de 2.0 nm, lo cual nos indica que mayormente los flaps se encuentran abiertos, a diferencia del pH 3 y pH 4 en donde existen mayormente los flaps en su estado semiabierto, los demás gráficos muestran aleatoriamente los flaps en sus tres modalidades.

Estos resultados del RMSD describe el comportamiento estructural de la ureasa en el tiempo, en el cual se logrado notar que el comportamiento de esta enzima suele ser de tipo aleatorio, donde mayormente el estado abierto se encuentra a pH 2. Lo que podría entenderse el porqué de la supervivencia de *H. pylori* a condiciones de pH bajos, en donde podría estar hidrolizando más úrea del medio hasta regular el pH de su medio. Lo contrario parece ocurrir si es que el flap se encuentra cerrado, donde por

ejemplo a pH 7 no se podrá hidrolizar la úrea al ritmo que lo haría una ureasa a pH 2, en este caso esto nos indicaría que la ureasa terminó de cumplir su rol principal en la supervivencia de *H. pylori* a la acidez estomacal.

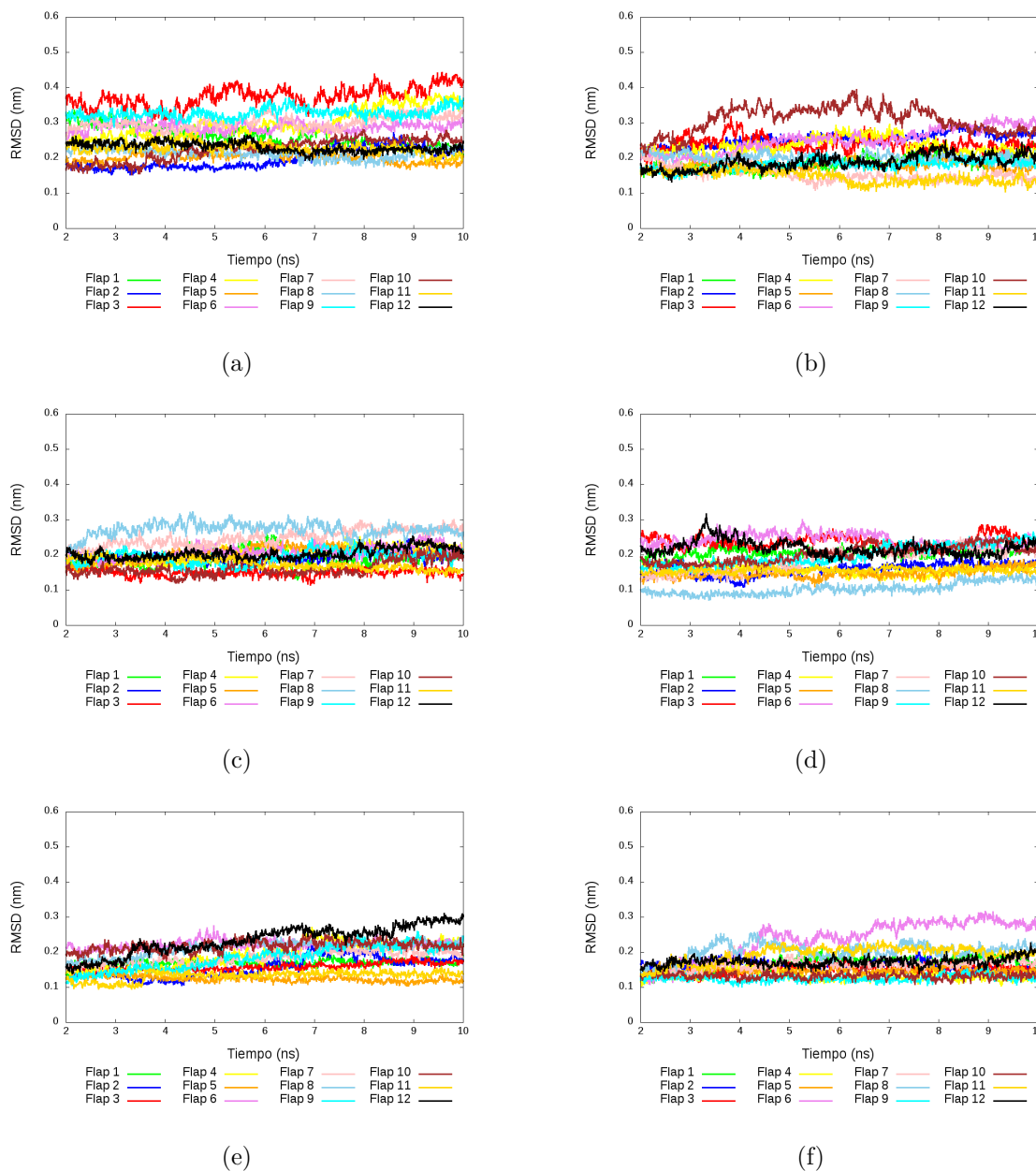


Figure 3.3: RMSD de las flaps a diferentes pHs. (a) pH 2. (b) pH 3. (c) pH 4. (d) pH 5. (e) pH 6. (f) pH 7

En la Figura 3.4 se representa a los flaps abierto, semi-abierto, y cerrado para el caso de la ureasa a un pH 7, claramente se observa que existen cambios estructurales en esta zona de la ureasa.

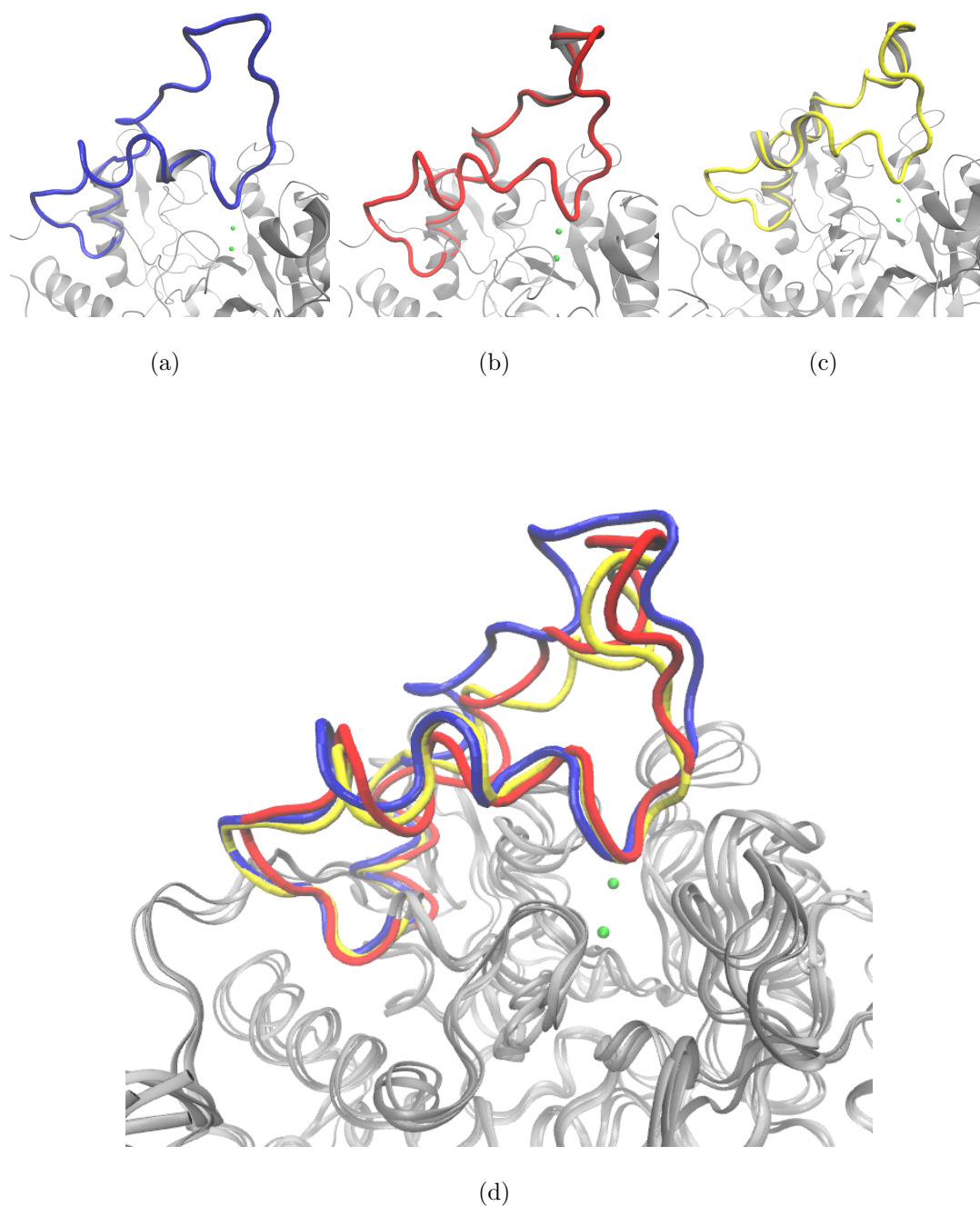


Figure 3.4: Descripción de flaps post-dinámica a pH 7. (a) Flap 6 abierto. (b) Flap 11 semi-abierto. (c) Flap 9 - cerrado. (d) Flaps abierto (azúl), semi-abierto (rojo), y cerrado (amarillo).

3.2.2 Root-mean-square fluctuation - RMSF

Otro análisis de la estructura de la ureasa mediante métodos de simulación de dinámica molecular, es el estudio del RMSF el cual nos informa del promedio de las fluctuaciones

ocurridas por cada residuo que compone la proteína durante una trayectoria de tiempo.

El análisis se enfocó en el promedio del RMSF por residuo en base a los átomos del carbono alfa (C-alfa) de todos los residuos que forman parte de los flaps. Los valores más altos de RMSF indicaron una mayor flexibilidad durante la simulación de MD, en nuestro trabajo vimos que las mayores fluctuaciones se presentaron a pH 2, pH 3 y pH 4 a diferencia de los demás pHs.

Tabla 3.3: Root-mean-square fluctuation - RMSF de residuos 304 a 347 de la ureasa a diferentes pHs.

Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
1	0.11	0.04	0.10	0.04	0.12	0.04	0.10	0.02	0.07	0.02	0.07	0.02
2	0.11	0.04	0.10	0.03	0.11	0.04	0.08	0.02	0.08	0.02	0.08	0.02
3	0.12	0.05	0.11	0.03	0.11	0.02	0.09	0.03	0.07	0.02	0.07	0.02
4	0.11	0.05	0.11	0.03	0.10	0.03	0.08	0.03	0.09	0.03	0.08	0.03
5	0.12	0.04	0.10	0.03	0.10	0.03	0.08	0.03	0.07	0.02	0.07	0.03
6	0.10	0.03	0.10	0.03	0.10	0.03	0.08	0.02	0.08	0.03	0.08	0.04
7	0.11	0.04	0.11	0.03	0.10	0.03	0.08	0.03	0.08	0.03	0.07	0.02
8	0.15	0.04	0.09	0.03	0.11	0.03	0.08	0.02	0.08	0.02	0.07	0.02
9	0.10	0.04	0.11	0.03	0.10	0.03	0.09	0.02	0.08	0.02	0.06	0.02
10	0.12	0.05	0.11	0.04	0.10	0.03	0.08	0.03	0.08	0.02	0.07	0.02
11	0.11	0.03	0.10	0.03	0.11	0.03	0.08	0.02	0.08	0.02	0.07	0.02
12	0.09	0.03	0.10	0.03	0.11	0.03	0.09	0.02	0.08	0.03	0.07	0.02
Promedio	0.11	0.04	0.10	0.03	0.11	0.03	0.08	0.02	0.08	0.02	0.07	0.02

De manera similar a los resultados mostrados para el RMSD los valores del RMSF para el pH 2 muestran valores considerablemente más altos que los demás pHs. Estos valores son presentados en la Tabla 3.3. En donde se demuestra que los estados de protonación alteran el comportamiento estructural de la ureasa, por lo que al parecer suele ser susceptible a estos cambios, incrementando las fluctuaciones por residuo en la región del flap.

En la Figura 3.5 se observa que el comportamiento por cada flap, es aleatorio lo que demuestra que estos no únicamente están siempre abiertos para todos los pHs, tal es el caso de la ureasa a pH 7 en donde el sistema abierto, semiabierto y cerrado se aprecia claramente. Esto también se menciona en el análisis del RMSD por cada flap.

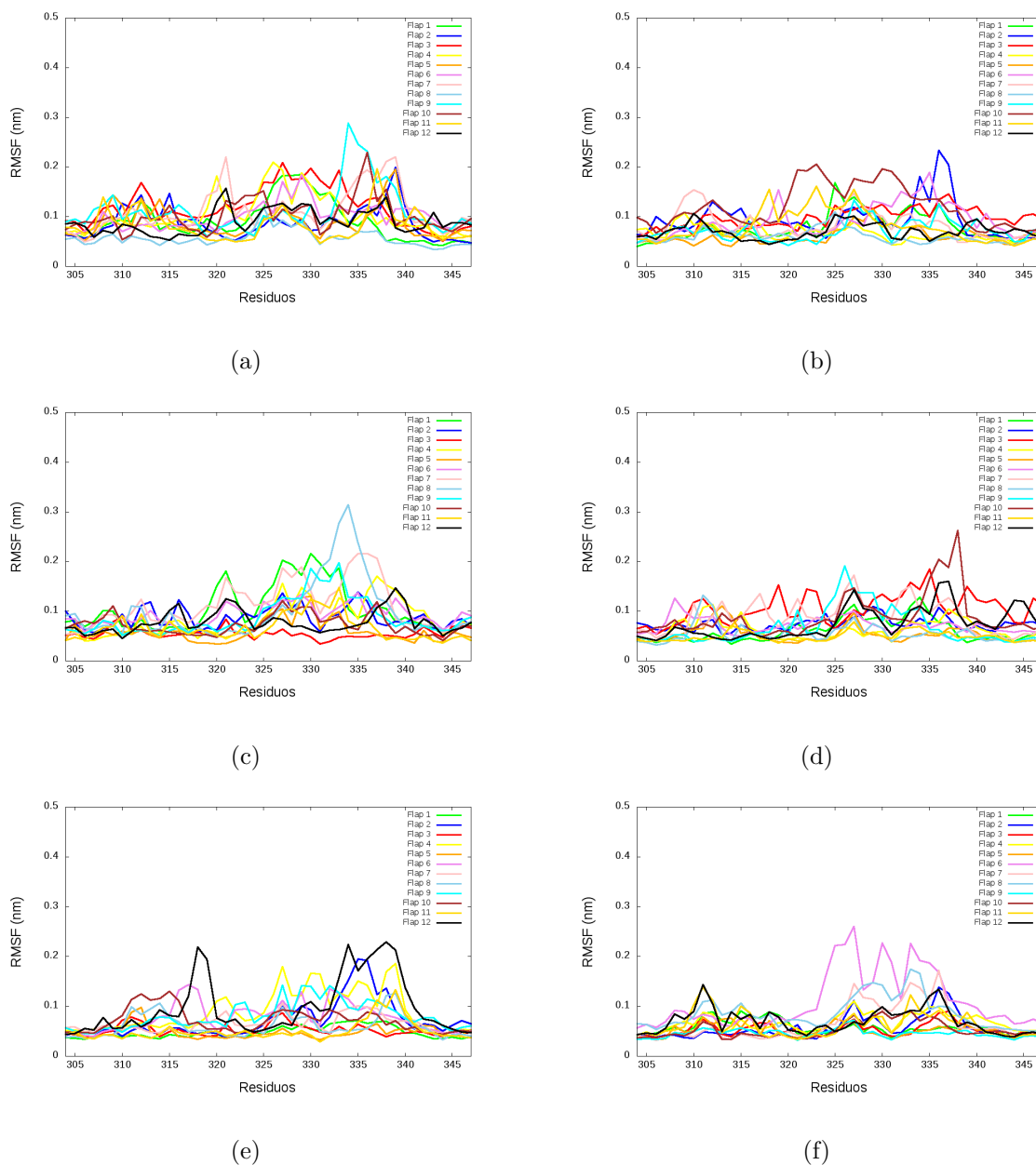
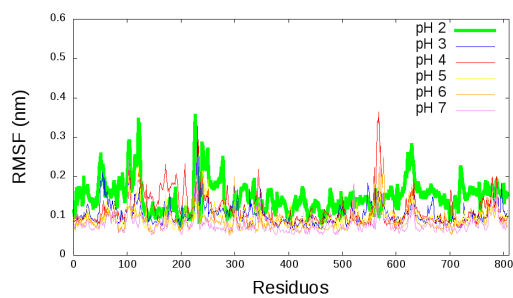
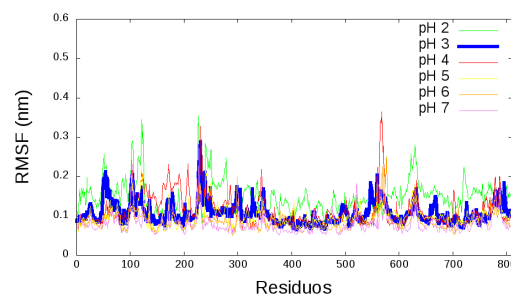


Figure 3.5: Root-mean-square fluctuation - RMSF por residuo. (a) pH 2. (b) pH 3. (c) pH 4. (d) pH 5. (e) pH 6. (f) pH 7

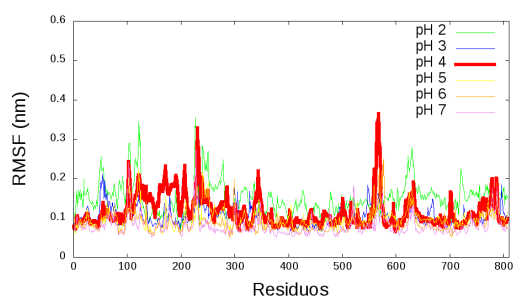
Tomando de referencia a los flaps más abiertos de cada sistema, es que se eligió el RMSF promedio de todo el sistema, mostrando con un color resaltado las subunidades α/β , de color verde se muestra el resultado del RMSF a pH 2, en el que claramente se observa con un RMSF mayor a 0.1 nm a diferencia de los otros RMSFs. En la Figura 3.6 el pH 2, pH 3, y pH 4 suelen estar más abiertos que a pH 5, pH 6, y pH 7.



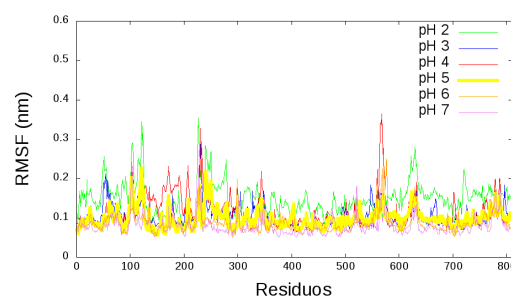
(a)



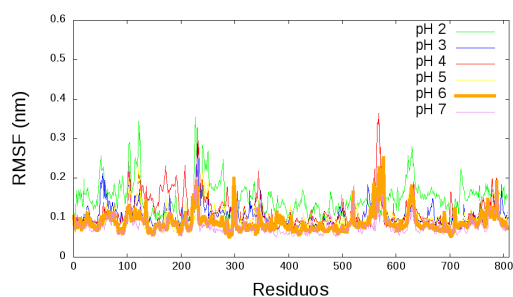
(b)



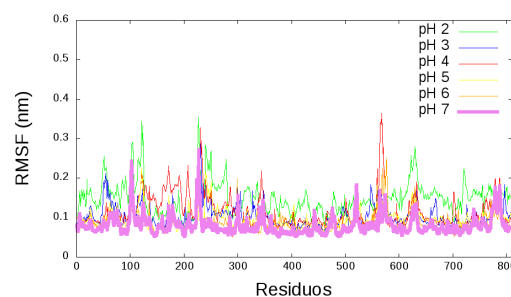
(c)



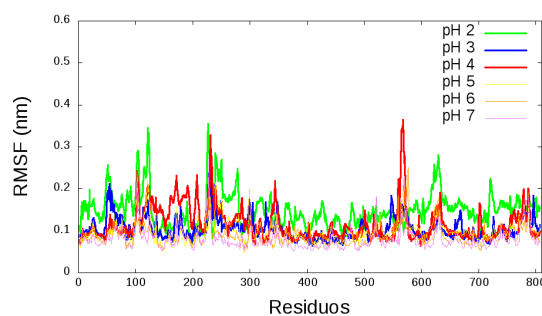
(d)



(e)



(f)



(g)

Figure 3.6: RMSF por residuo de los flaps que estuvieron abiertos. (a) Flap 8 del pH 2. (b) Flap 4 del pH 3. (c) Flap 1 del pH 4. (d) Flap 1 del pH 5. (e) Flap 4 del pH 6. (f) Flap 2 del pH 7. (g) RMSF de todos los sistemas.

3.2.3 Radio de giro

El plegamiento de macromoléculas biológicas es todo un reto a pesar de contar con un gran conjunto de posibles conformaciones, por lo que se ha identificado que la tasa de plegamiento disminuye al aumentar el tamaño de la proteína. El empaquetamiento espacial molecular de los residuos de aminoácidos es un aspecto importante de la estabilidad de la proteína. Por lo que en este estudio analizar el radio de giro de la ureasa, nos ayudó a comprender cómo es que se ve alterado su empaquetamiento, además que este indicador describe la conformación de equilibrio de un sistema total en el tiempo. Los cálculos nos indicaron que el RG de pH2 (6.30 ± 0.04 nm), pH3 (6.28 ± 0.03 nm), pH4 (6.24 ± 0.03 nm), pH5 (6.17 ± 0.02 nm), pH6 (6.13 ± 0.02 nm), y pH7 (6.11 ± 0.01 nm). En la Figura 3.7 se observa que a pH 5, pH 6 y pH 7 se muestra relativamente estable a diferencia de los pH 2, pH 3 y pH 4 en los cuales va variando significativamente.

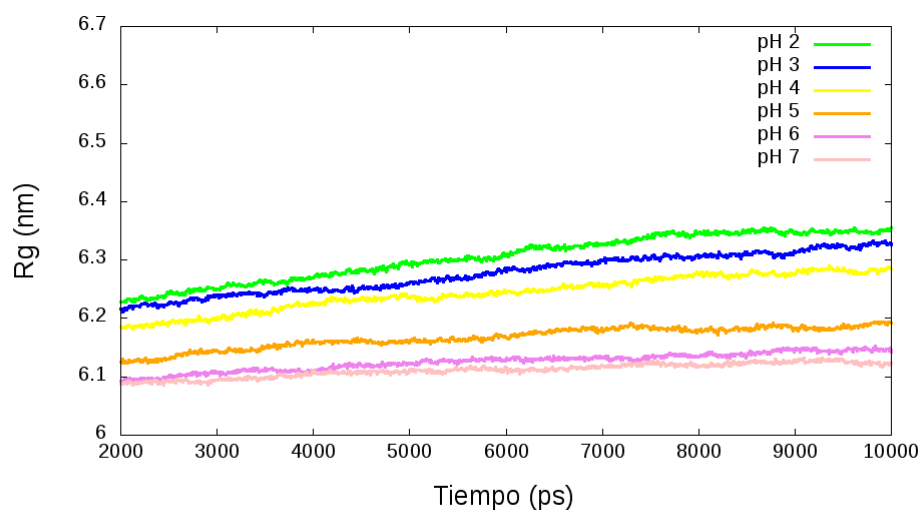


Figure 3.7: Radio de giro a partir de 2ns.

3.2.4 Distancias críticas

Teniendo en cuenta el primer estudio de simulación de dinámica molecular realizado por Minkara y colaboradores,⁸⁴ se vio por conveniente analizar tres distancias críti-

cas que validan el movimiento del flap durante la simulación. Con ello es que se logró analizar los residuos que forman parte de una subunidad $(\alpha/\beta)^I$ con respecto a otra subunidad vecina $(\alpha/\beta)^{II}$, las cuales correspondieron a: β^I ALA170- α^{II} ILE328, α^I GLY47- α^{II} HIS322 y β^I ALA173- α^{II} GLU330 para las 12 flaps a los diferentes pHs.

Tabla 3.4: Distancia de β^I ALA170 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} ILE328

Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
1	1.49	0.20	1.61	0.08	1.81	0.20	1.53	0.06	1.21	0.07	1.20	0.05
2	1.12	0.09	1.16	0.05	1.39	0.14	1.54	0.15	1.49	0.06	1.18	0.04
3	2.92	0.28	1.67	0.11	1.89	0.07	1.13	0.03	1.14	0.03	1.18	0.05
4	2.06	0.26	1.97	0.10	1.43	0.06	1.18	0.04	1.35	0.09	1.73	0.11
5	1.42	0.14	1.60	0.10	1.36	0.08	1.45	0.06	1.30	0.05	1.18	0.04
6	2.12	0.18	1.27	0.05	1.86	0.17	1.83	0.09	1.34	0.08	1.48	0.12
7	1.56	0.10	1.59	0.12	1.73	0.15	1.05	0.14	1.42	0.08	1.39	0.13
8	1.53	0.13	1.62	0.09	1.49	0.06	1.70	0.10	1.59	0.07	1.50	0.14
9	1.36	0.11	1.47	0.10	1.27	0.11	1.26	0.11	1.46	0.08	1.22	0.04
10	1.53	0.14	2.09	0.22	2.19	0.17	1.23	0.07	1.37	0.09	1.24	0.06
11	1.36	0.09	1.91	0.15	1.22	0.07	1.43	0.04	1.22	0.04	1.34	0.09
12	1.12	0.08	1.65	0.11	1.28	0.06	1.26	0.06	1.24	0.05	1.18	0.09
Promedio	1.63	0.15	1.63	0.11	1.58	0.11	1.38	0.08	1.34	0.07	1.32	0.08

En la Tabla 3.4 se presentan las distancias β^I ALA170- α^{II} ILE328 en promedio de los 12 flaps. Teniendo en cuenta los valores máximos y mínimos de estos promedios; para el pH 2 (2.92 nm y 1.12 nm), pH 3 (2.09 nm y 1.16 nm), pH 4 (2.19 nm y 1.22 nm), pH 5 (1.83 nm y 1.05 nm), pH 6 (1.59 nm y 1.14 nm), y pH 7 (1.73 nm y 1.18 nm), los cuales nos indican que los flaps estarán abiertos entre 1.59 nm a 2.92 nm, estarán cerrados dentro del rango 1.05 nm a 1.22 nm, y semi-abiertos de 1.22 nm a 1.59 nm. Considerando la distancia crítica β^I ALA170- α^{II} ILE328, la ureasa a pH 3 y pH 4 son las que mayormente presentaron flaps abiertos, mientras que a pH 2 existen más flaps semi-abiertos, y a pH 5, pH 6, y pH 7 los flaps muestran su estado semi-abierto y cerrado en algunos casos.

Estos resultados nos indicaron que la distancia entre dos subunidades vecinas de la ureasa esta relacionada con los flaps en su estado abierto, semi-abierto, y cerrado. El promedio de distancia crítica inicial entre la ureasa a pH 2 y pH 3 son iguales, sin embargo el análisis específico por cada flap a pH 2 muestra que existen flaps muy abiertos con los valores más altos si son comparados con los demás flaps a los diferentes

pHs. Las diferencias de los flaps con respecto a otro se pueden observar en la Figura 3.8. Adicionalmente para el caso del pH 5, pH 6 y pH 7 va disminuyendo la cantidad de flaps abiertos, incrementando la aparición de flaps cerrados.

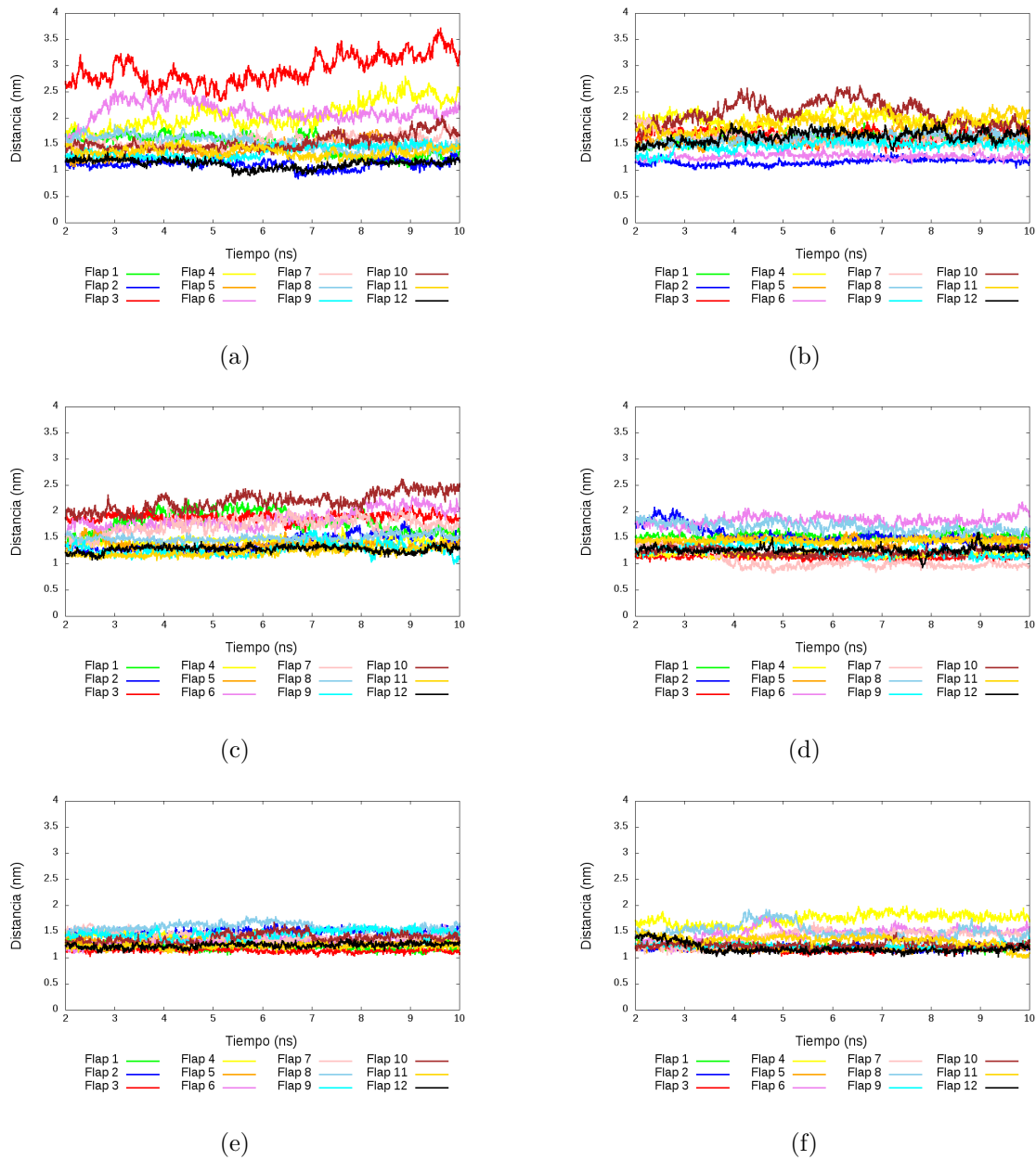


Figure 3.8: Distancias críticas β^I ALA170- α^{II} ILE328. (a) pH 2. (b) pH 3. (c) pH 4. (d) pH 5. (e) pH 6. (f) pH 7.

En la Figura 3.9 muestra de forma resumida el promedio de distancia de los flaps para cada sistema con respecto al pH.

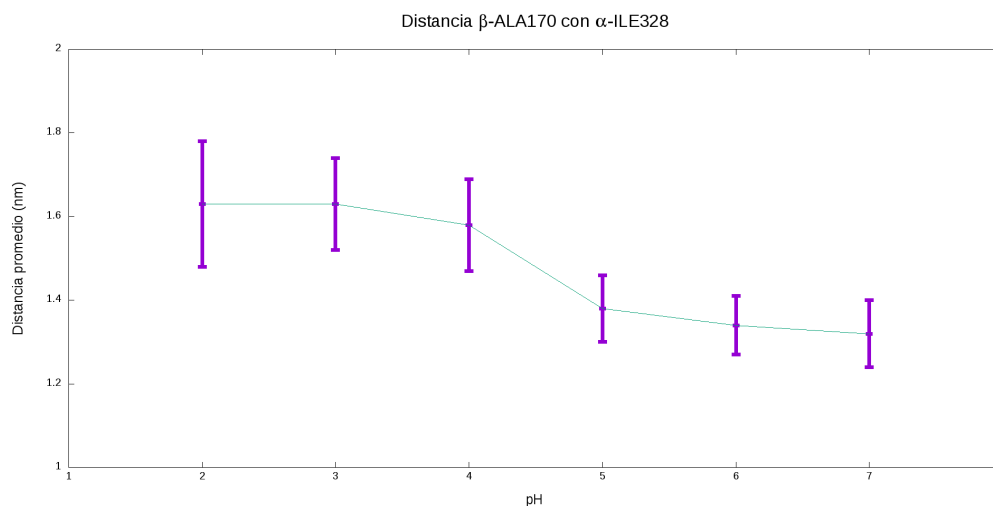
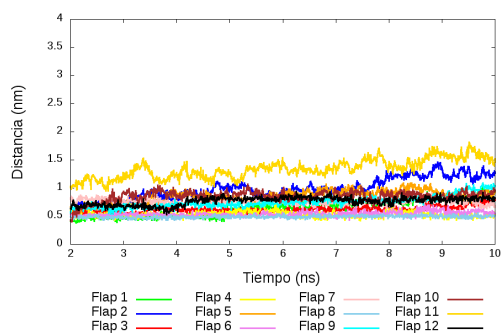


Figure 3.9: Distancia de β^I ALA170 con α^{II} ILE328.

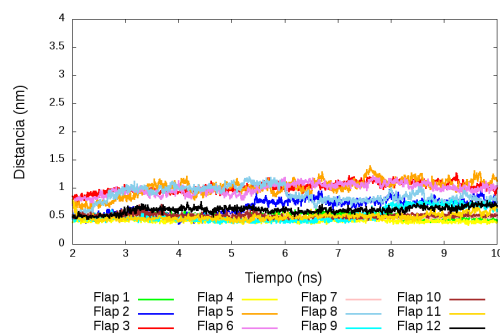
La Tabla 3.5 y Figura 3.10 describe las distancias entre α^I GLY47 y α^{II} HIS322, como podemos observar en la ureasa a pH 3 presenta una irregularidad con respecto a los demás sistemas, además vemos que la distancia entre estos puntos es menor a la distancia mostrada anteriormente, por lo que la subunidad α de un dímero con respecto a una subunidad vecina α , se muestran muy cercanos uno con respecto del otro. Tal y cómo los datos se muestran en la tabla, estos fueron ploteados para un mejor análisis (Figura 3.11).

Tabla 3.5: Distancia de α^I GLY47 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} HIS322.

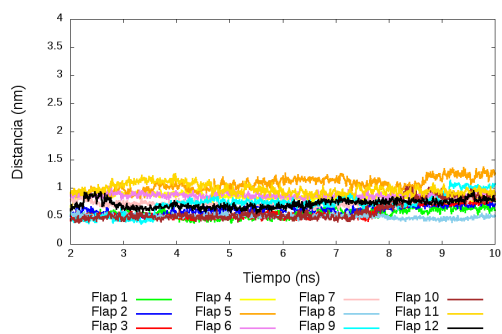
Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
1	0.64	0.14	0.5	0.05	0.55	0.08	0.51	0.04	0.54	0.05	0.67	0.05
2	0.99	0.19	0.66	0.14	0.61	0.08	0.78	0.05	0.91	0.08	0.68	0.1
3	0.62	0.06	1.02	0.08	0.56	0.11	1.02	0.11	0.54	0.04	0.61	0.1
4	0.53	0.05	0.42	0.03	0.85	0.05	0.93	0.04	0.75	0.08	0.79	0.07
5	0.85	0.11	1.01	0.15	1.07	0.12	0.75	0.11	0.8	0.03	0.49	0.02
6	0.54	0.04	0.99	0.1	0.87	0.04	0.58	0.03	0.68	0.04	0.66	0.04
7	0.76	0.05	0.49	0.03	0.73	0.05	0.5	0.03	0.64	0.09	0.57	0.04
8	0.49	0.02	0.88	0.14	0.5	0.03	0.52	0.03	0.53	0.04	0.75	0.05
9	0.75	0.1	0.52	0.12	0.72	0.16	0.92	0.08	0.67	0.04	0.73	0.06
10	0.85	0.09	0.51	0.03	0.59	0.16	0.43	0.03	0.72	0.05	0.68	0.06
11	1.34	0.17	0.49	0.06	0.98	0.09	0.79	0.12	0.5	0.03	0.51	0.02
12	0.77	0.07	0.61	0.06	0.72	0.07	0.74	0.05	0.73	0.05	0.67	0.04
Promedio	0.76	0.09	0.68	0.08	0.73	0.09	0.71	0.06	0.67	0.05	0.65	0.05



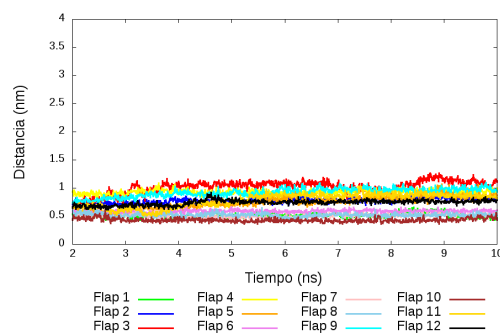
(a)



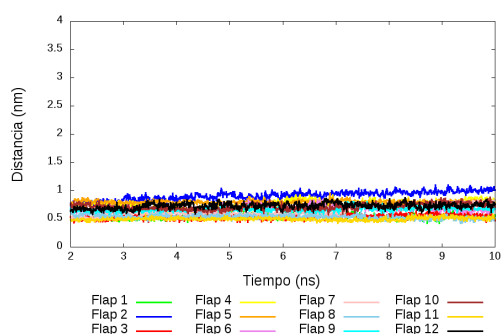
(b)



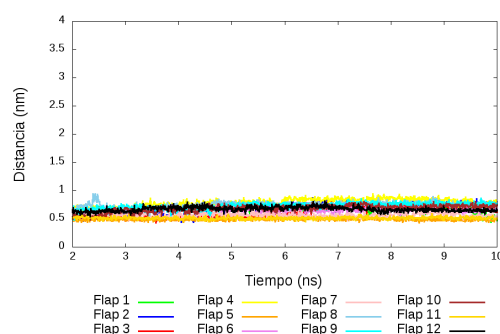
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 3.10: Distancias críticas $\alpha^{I}GLY47$ y $\alpha^{II}HIS322$. (a) pH 2. (b) pH 3. (c) pH 4. (d) pH 5. (e) pH 6. (f) pH 7.

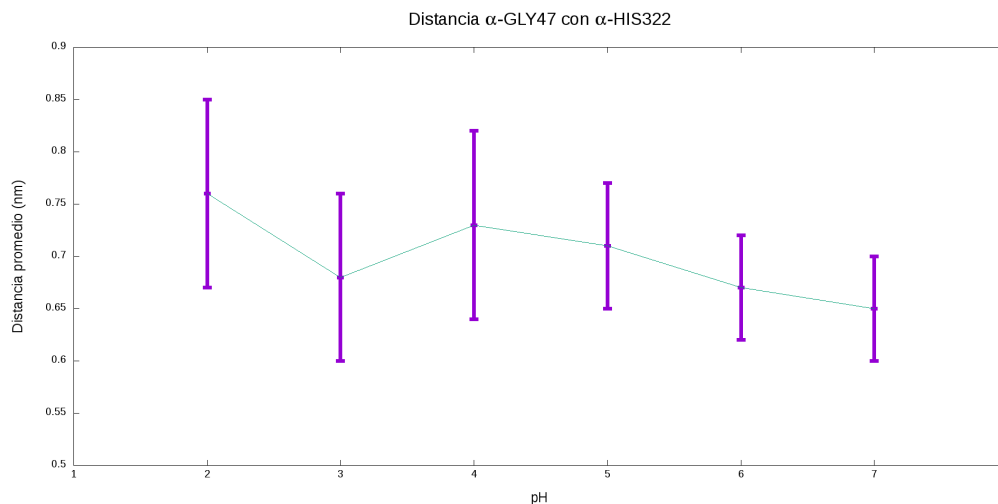
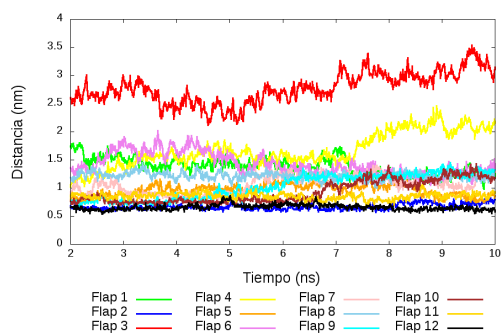


Figure 3.11: Distancia de α^I GLY47 con α^{II} HIS322.

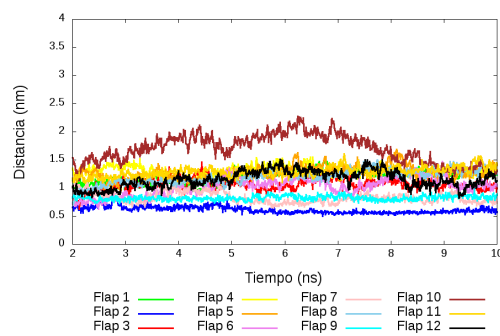
La distancia entre la subunidad β^I ALA173 con su vecino α^{II} GLU330 muestra una distancia promedio total entre 0.89 nm (pH 7) a 1.22 nm (pH 2), con una tendencia a incrementar en cuanto disminuye el pH. Estos resultados son presentados en la Tabla 3.6, además las gráficas para cada pH en la Figura 3.12 y su ploteo en la Figura 3.13. Información adicional de las distancias críticas por cada flap, se encuentra en los Anexos A, B, y C.

Tabla 3.6: Distancia de β^I ALA173 de una subunidad con respecto a una subunidad vecina α^{II} GLU330.

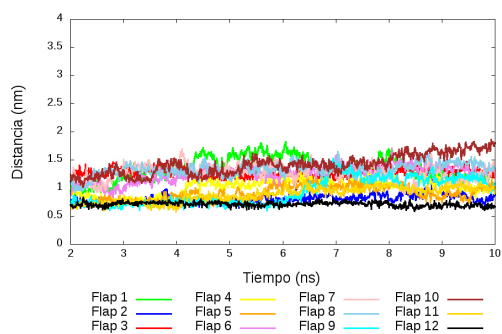
Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
1	1.38	0.16	1.21	0.11	1.35	0.2	1.43	0.09	0.75	0.04	0.78	0.04
2	0.67	0.05	0.61	0.06	0.81	0.08	0.99	0.14	1.1	0.13	0.59	0.05
3	2.77	0.28	1.07	0.11	1.28	0.07	0.77	0.08	0.65	0.05	0.64	0.03
4	1.68	0.3	1.3	0.09	1.01	0.14	0.81	0.06	0.88	0.13	1.18	0.1
5	0.96	0.1	1.26	0.12	0.91	0.13	0.88	0.05	0.66	0.03	0.62	0.02
6	1.43	0.2	1.03	0.16	1.26	0.14	1.36	0.08	0.94	0.06	1.41	0.31
7	1.06	0.15	0.83	0.09	1.28	0.14	0.79	0.09	0.89	0.06	0.77	0.08
8	1.22	0.07	1.2	0.12	1.33	0.12	1.16	0.08	0.92	0.08	0.99	0.07
9	1.03	0.22	0.82	0.04	0.93	0.23	0.87	0.07	1.01	0.19	0.7	0.04
10	0.93	0.2	1.7	0.25	1.41	0.18	0.69	0.04	0.99	0.09	0.94	0.06
11	0.86	0.06	1.29	0.09	0.88	0.13	0.7	0.05	0.78	0.04	0.98	0.09
12	0.66	0.05	1.15	0.15	0.71	0.04	1.02	0.07	0.9	0.1	1.03	0.09
Promedio	1.22	0.15	1.12	0.12	1.1	0.13	0.96	0.07	0.87	0.08	0.89	0.08



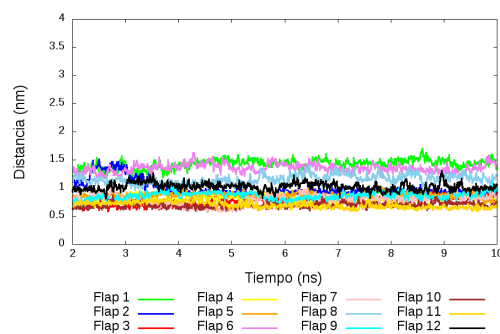
(a)



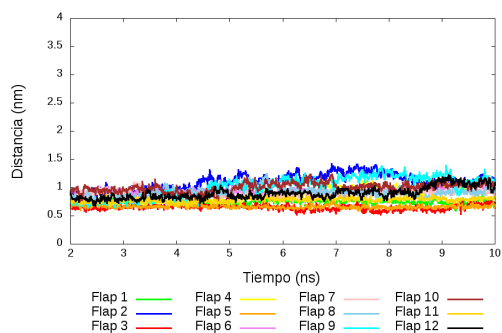
(b)



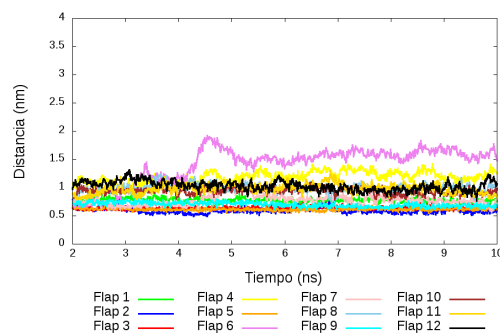
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 3.12: Distancias críticas β^I ALA173 con α^{II} GLU330. (a) pH 2. (b) pH 3. (c) pH 4. (d) pH 5. (e) pH 6. (f) pH 7.

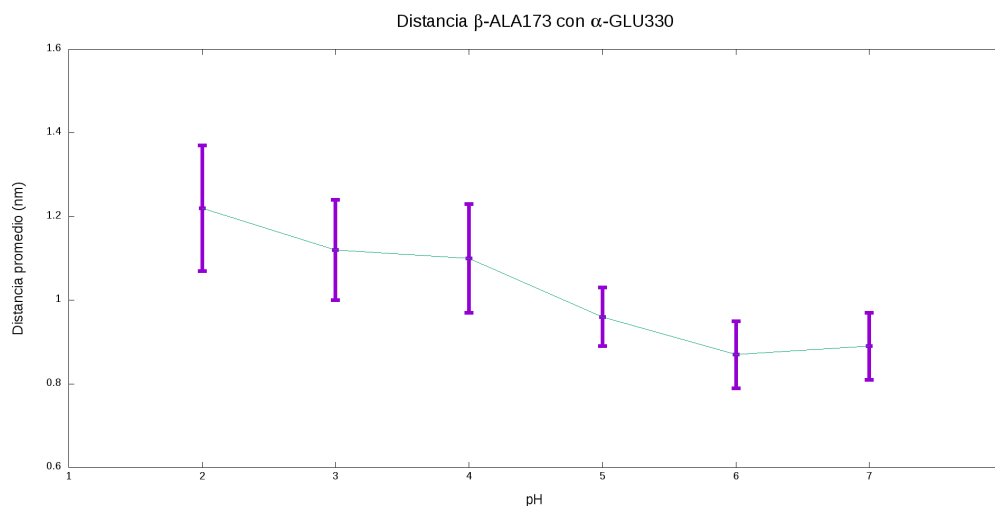


Figure 3.13: Distancia promedio de los puntos críticos β^I ALA173 con α^{II} GLU330.

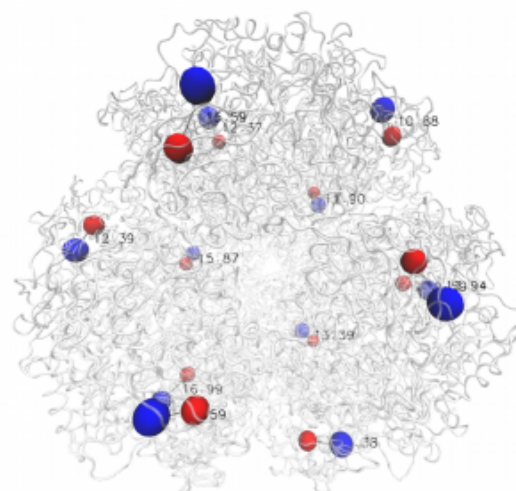
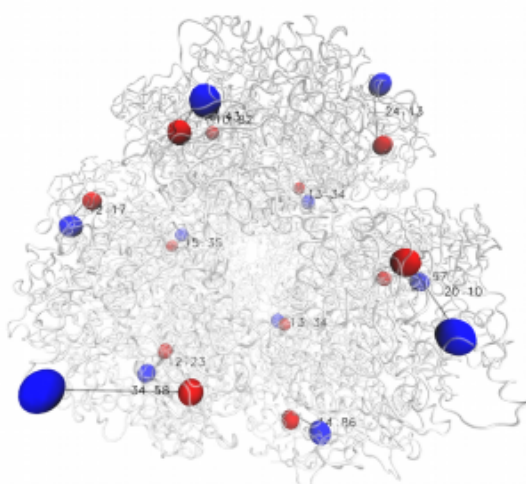
Tabla 3.7: Resumen del promedio de distancias críticas

Flap	pH2		pH3		pH4		pH5		pH6		pH7	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
β^I ALA170- α^{II} Ile328	1.63	0.15	1.63	0.11	1.58	0.11	1.38	0.08	1.34	0.07	1.32	0.08
α^I GLY47- α^{II} HIS322	0.76	0.09	0.68	0.08	0.73	0.09	0.71	0.06	0.67	0.05	0.65	0.05
β^I ALA173- α^{II} GLU330	1.22	0.15	1.12	0.12	1.1	0.13	0.96	0.07	0.87	0.08	0.89	0.08

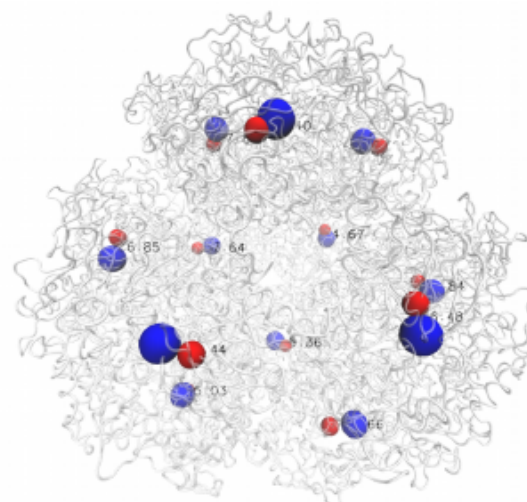
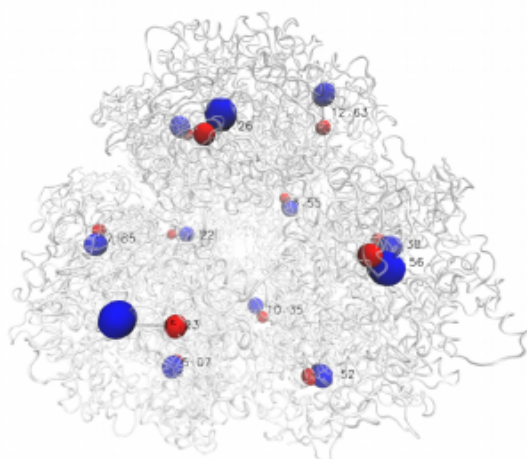
En general, se observa en la Tabla 3.7 las distancias críticas directamente relacionadas con el análisis de RMSD y RG. Así mismo vemos que la distancia α^I GLY47- α^{II} HIS322 es muy corta en comparación con las demás distancias, esto se debe a que estas subunidades α se encuentran muy cerca. Mientras que la tendencia entre la distancia β^I ALA170- α^{II} Ile328 y β^I ALA173- α^{II} GLU330 fueron semejantes. Estos resultados de distancias críticas mantuvieron un tendencia de disminuir a manera que aumenta el pH del medio, por lo que a pH por debajo de 4, se observarían flaps abiertos.

La Figura 3.14 presenta las tres diferentes distancias a pH 2 y pH 7 en el cual se observa claramente cómo incrementa la distancia a pH 2 que a pH 7, esta figura es tomada del último paso de simulación. Así también se muestra que las distancias de α^I GLY47- α^{II} HIS322 visualmente parecen ser insignificantes, pero numéricamente son distancias considerables que también muestra una tendencia a disminuir a pH 7.

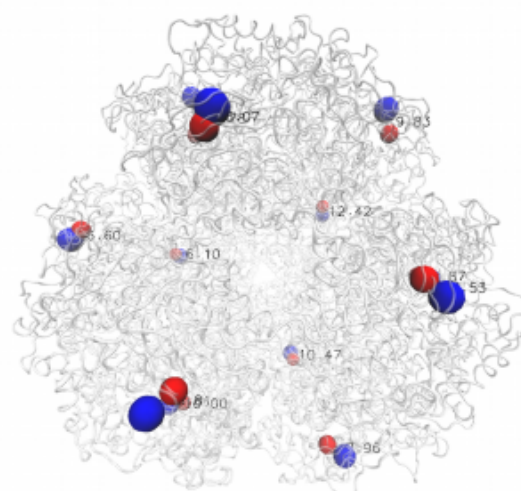
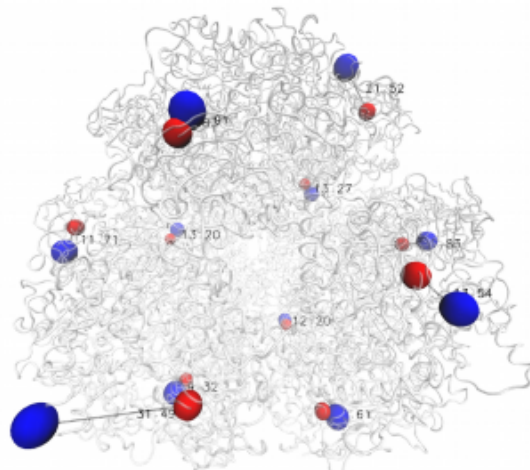
Distancia β^I ALA170- α^II ILE328



Distancia α^I GLY47- α^II HIS322



Distancia β^I ALA173- α^II GLU330



a

b

Figure 3.14: Distancias críticas pH 2 y pH 7. (a) pH 2. (b) pH 7.

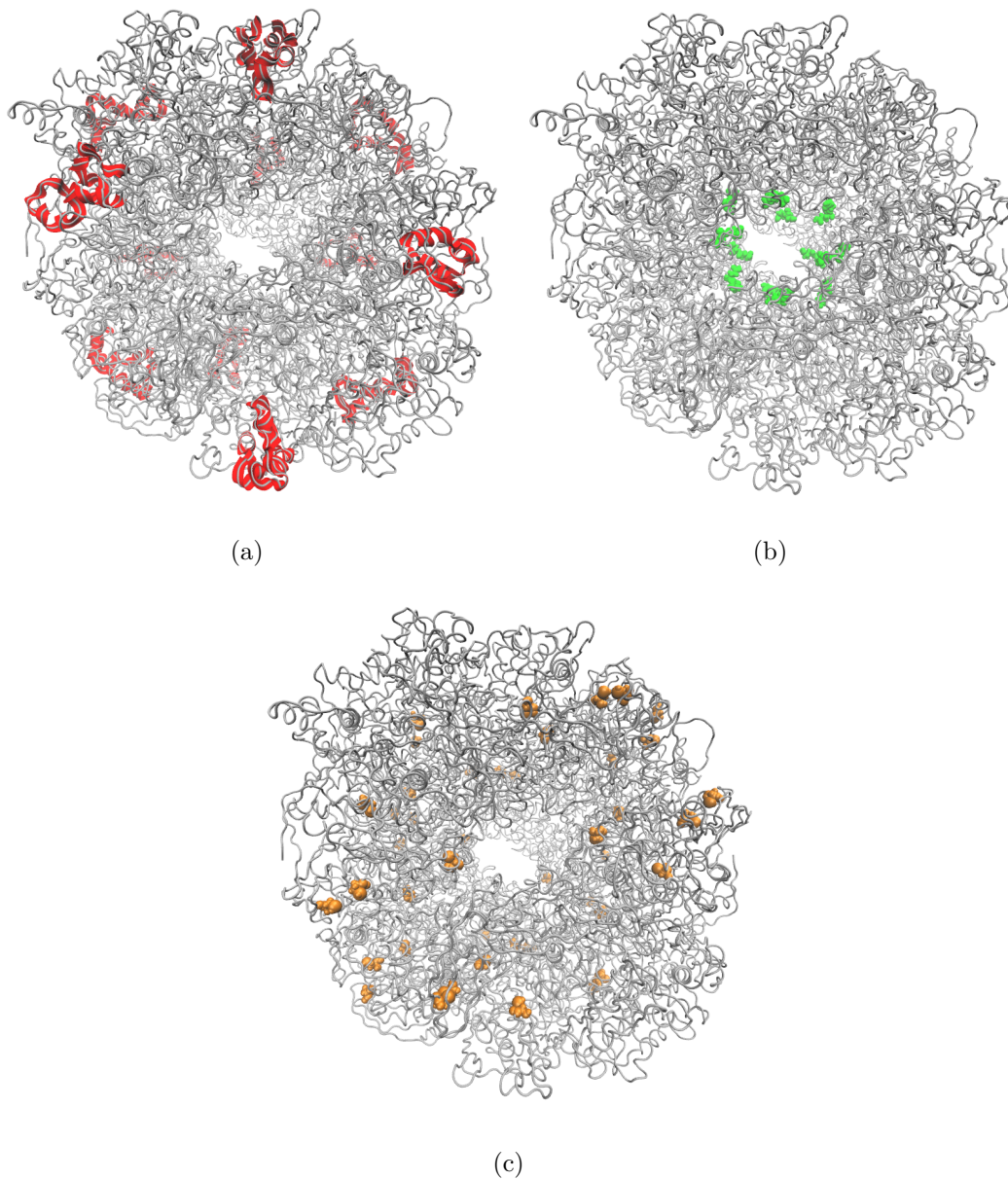


Figure 3.15: Representación en forma de *ribbon* de la ureasa. (a) De color rojo se muestran los flaps, los cuales se encuentran hacia el exterior. (b) De color verde se muestran los residuos GLU505. (c) De color naranja se presentan a las cisteínas, las cuales son de gran importancia para la estabilidad estructural del complejo supramolecular ureasa.

Teniendo en cuenta estos resultados de simulación de dinámica molecular del complejo supramolecular ureasa a diferentes pHs, se observaron la presencia de flaps móviles (Figura 3.15a), los cuales suelen estar aleatoriamente en tres modalidades: abierta, semi-abierta y cerrada. En este estudio se vio que el efecto del pH ácido en la ureasa incrementa el número de flaps abiertos, lo cual parece cumplir un rol muy importante

en la hidrólisis de la urea. Además se observó que la estabilidad estructural se debe a la presencia de puentes disulfuro mediadas por residuos de cisteínas (Figura 3.15c), los cuales se ubican en los extremos de subunidades vecinas $(\alpha/\beta)^I$ y $(\alpha/\beta)^{II}$. Otra característica de su alta estabilidad, es debido a la presencia de residuos de ácido glutámico de cada subunidad los cuales contribuyen con la formación del agujero interno del complejo supramolecular (Figura 3.15b), que este asu vez actúa como reservorio de NH_3 en condiciones de pH 7.

3.3 Análisis de sistemas interactuantes

3.3.1 Librería de ligandos

La elección de la librería fue en base a la búsqueda de inhibidores de la ureasa, para ello actualmente existe un fármaco que aún se encuentra en fase clínica. Este inhibidor es el ácido acetohidroxámico registrado en dos ensayos clínicos que se encuentran en fase II, uno de ellos se evalúa mediante la ingesta oral del fármaco en forma de tableta (litostat) y el otro es utilizado de forma intravenosa.

Tabla 3.8: Característica de los ligandos usados en el acoplamiento.

ZINC ID	Nombre	xlogP	AD ^a	PD ^b	HB ^c	HB ^d	CN ^e	tPSA ^f	PM ^g	ER ^h
ZINC08214514	Urea	-1	-4.58	-8.56	4	3	0	69	60.056	0
ZINC04658603	Acetohydroxamic acid	-0.86	-1.54	-12.98	2	3	0	49	75.067	0
ZINC01611325	N-methoxyacetamide	-0.58	0.68	-11.5	1	3	0	38	89.094	1
ZINC04701037	glycine hydroxamate	-2.09	-4.68	-51.42	5	4	1	76	91.09	1
ZINC05298729	N-hydroxypropanamide	-0.02	-1.34	-12.63	2	3	0	49	89.094	1
ZINC08034818	Acetamide	-0.92	-1.83	-7.75	2	2	0	43	59.068	0
ZINC39245715	N-Hydroxyprop-2-enamide	-0.25	-1.03	-12.68	2	3	0	49	87.078	1

^aDesolvatación apolar en kcal/mol.; ^bDesolvatación polar en kcal/mol.; ^cDonador de puente de hidrógeno.

^dAceptor de puente de hidrógeno.; ^eCarga neta.; ^fÅ².; ^gPeso Molecular en g/mol.; ^hEnlaces rotables.

Por otro lado en la base de datos del PDB actualmente existe información de la ureasa unida a este ligando, bajo el código de acceso PDB ID:1E9Y. El ácido acetohidroxámico presenta cierta conformación similar a la úrea, lo cual parece ser las razones por las que ha sido efectivo en ensayos previos de búsqueda de inhibidores de la ureasa de *H. pylori*.

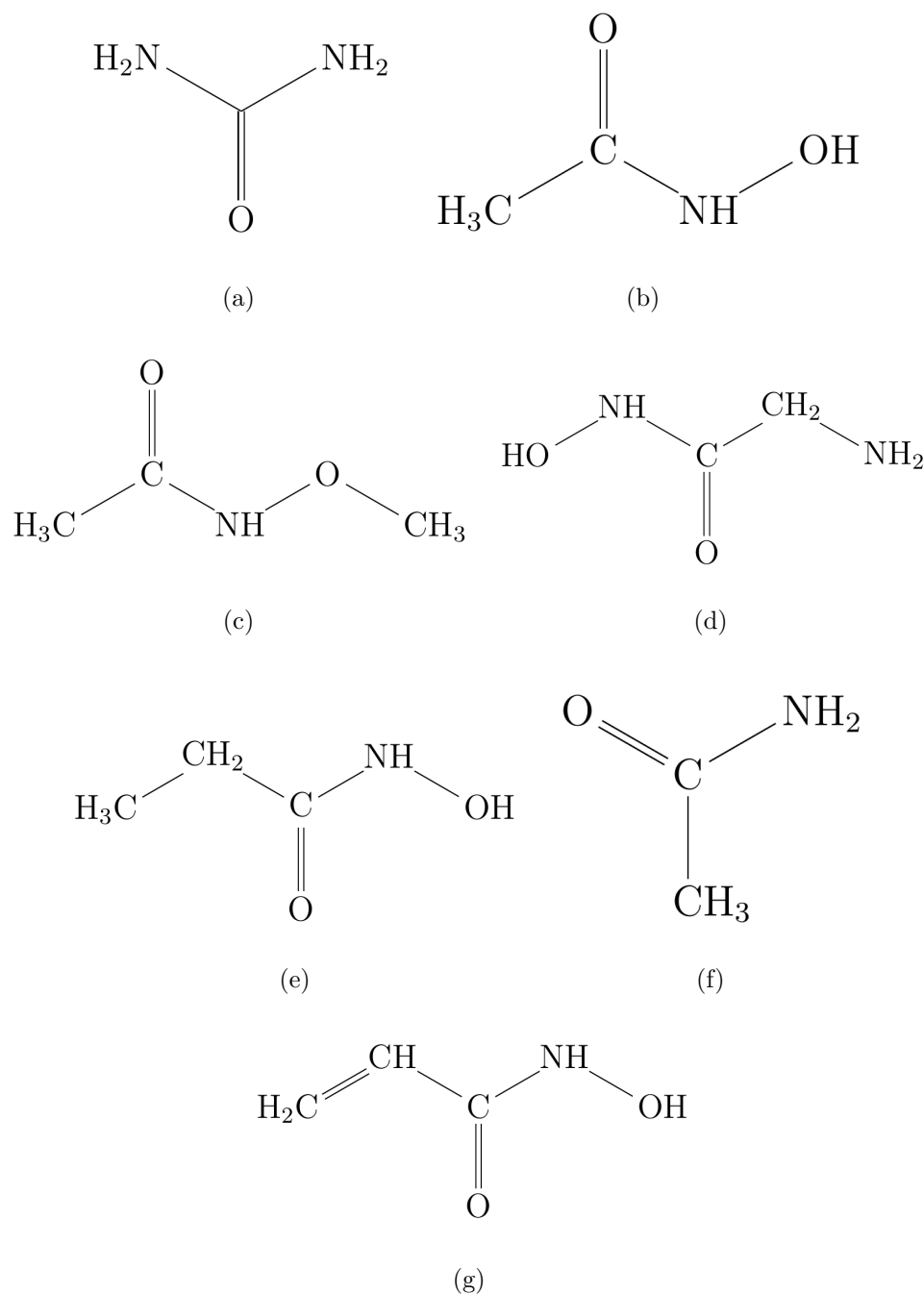


Figure 3.16: Lista de estructuras moleculares usados para el acoplamiento molecular. (a) Úrea (sustrato común). (b) Ácido acetohidroxámico. (c) ZINC01611325. (d) ZINC04701037. (e) ZINC05298729. (f) ZINC08034818. (g) ZINC39245715.

Además con el fin de poder estudiar derivados de este inhibidor es que se hizo una búsqueda en el servidor ZINC Docking, en el cual encontramos 5 modelos con un porcentaje de identidad del 70%. En la Tabla 3.8 notamos que las características de la úrea son las de poseer un coeficiente de partición octanol/agua de compuestos orgánicos

(xlogP) de -1 lo cual nos indica la concentración de úrea en una mezcla de dos fases inmiscibles en equilibrio, siendo hidrofílica a un pH 7. Lo mismo ocurre con los demás ligandos, al poseer un $xlogP < 1$ son compuestos hidrofílicos. Otra característica muy importante es la aceptación y donación de puentes de hidrógeno por los ligandos, siendo la úrea y ZINC04701037 capaces de donar en mayor número. En la Figura 3.16 son presentados la librería de ligandos elegidos para el estudio del acoplamiento.

3.3.2 Bolsillos del dímero α/β

Antes de realizar el estudio de las predicciones de acoplamiento fue importante analizar bolsillo o también denominado *pocket* del dímero. Para lo cual se usó el servidor PockDrug. Se pudo encontrar que existen un total de diez pockets, de los cuales el pocket que representa el sitio activo es el número 4.

En la Tabla 3.9 se describen las características de cada pocket encontrado para el dímero α/β , en donde el pocket P 0 y P 1, muestran un amplio volumen, con un porcentaje de drugabilidad del 99% (0.99), la importancia de este pocket es debido a que este contribuye con la unión a otra unidad dimérica. El pocket P 2 y P 5 forman parte de la subunidad α el cual cumple un rol de unión frente a una subunidad vecina β , siendo el P 2 de menor drugabilidad y el P 5 de baja drugabilidad, en este caso estos pockets no suelen ser ideales para que ocurra un proceso espontáneo de acoplamiento. Por otro lado el pocket P 3 se muestra ubicado como bisagra del flap (residuos 304 - 347) el cual posee un porcentaje de drugabilidad inferior a lo permitido. El pocket P 4, nos muestra su ubicación en el sitio activo con un porcentaje de drugabilidad del 98% (0.98) y volumen de 489.91, favorable para que ocurra los procesos de hidrólisis. Finalmente también fueron reportados pockets pequeños los cuales se presentan bajo la denominación "P x °", estos al poseer un bajo porcentaje de drugabilidad no son aptos para que ocurra un proceso espontáneo de acoplamiento.

En la Figura 3.17 se muestra al dímero con los diferentes lugares probables de unión y de color violeta el pocket número 4, en el cual se encuentran los residuos que son parte del sitio activo.

Tabla 3.9: Análisis de pockets del dímero α/β .

Pockets	Vol. Hull*	Hydroph. Kyte*	Polar Res.*	Aromatic Res.*	Otyr atom	Nb. Res.*	Drugg Prob*	Standard Deviation
P 0	1383.93	1.23	0.21	0.11	0	19	0.99	0
P 1	613.57	1.11	0.29	0.24	0.02	17	0.99	0
P 3	471.69	-1.11	0.86	0.14	0	14	0.18	0.01
P 4	489.91	0.68	0.44	0.44	0	16	0.98	0.02
P 5	342.26	0.01	0.36	0	0	14	0.62	0.08
P 10°	416.71	-1.17	0.6	0.3	0	10	0.31	0.1
P 2	919.56	-1.54	0.73	0.18	0.02	11	0.13	0.02
P 6°	111.41	-0.5	0.5	0.5	0	4	0.78	0.21
P 7°	223.16	-2.42	0.75	0	0	8	0	0
P 8°	231.54	-1.34	0.71	0.29	0.04	7	0.26	0.05
P 9°	353.79	-0.02	0.56	0	0	9	0.6	0.09

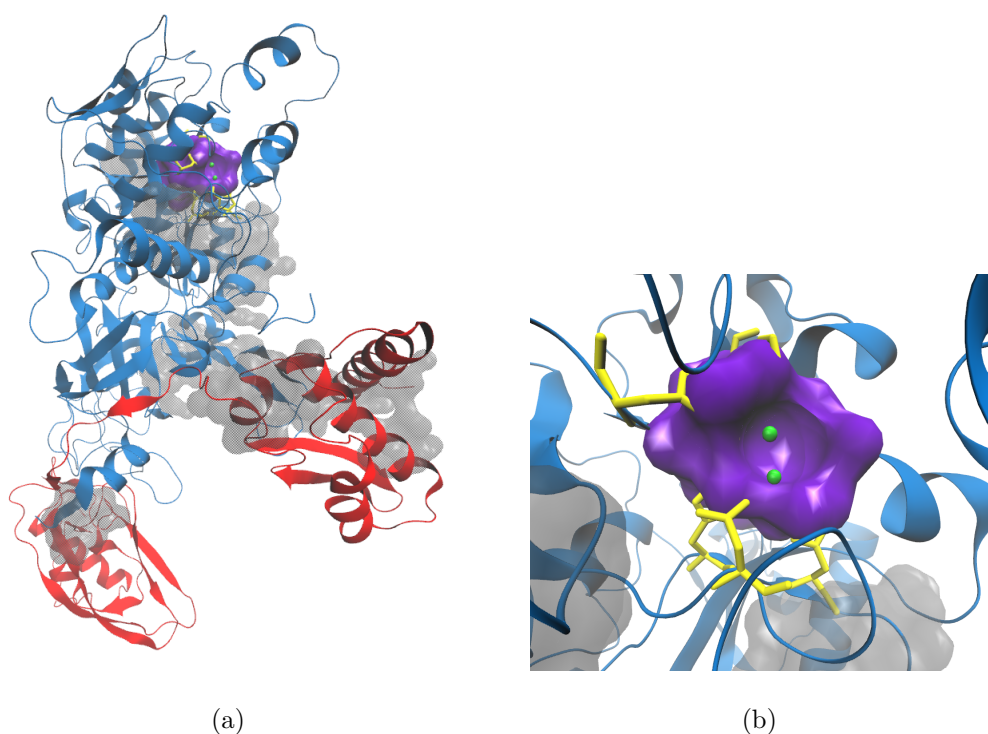


Figure 3.17: Pockets del dímero. (a) Dímeryo α/β con los pockets. (b) Pocket “P 4”.

El análisis del sitio activo de la ureasa, nos indicó la presencia de dos iones de Ni^+ los cuales son importantes para los procesos de hidrólisis de la úrea. Por otro lado los residuos involucrados para el anclaje del sustrato al sitio activo son los residuos HIS136, HIS138, HIS248, HIS274, ASP362 y KCX219 (lisina carboxilada). Sin los estados de protonación adecuados, no se podría dar el anclaje correcto para su hidrólisis. Por lo que el trabajo de investigación permitió considerar el estado de protonación adecuado para su análisis mediante simulaciones de dinámica molecular.

3.3.3 Acoplamiento molecular

Actualmente uno de los estudios complementarios a las predicciones *in silico* es el estudio de las interacciones receptor-ligando los cuales desempeñan un papel importante en todos los procesos biológicos, como el caso de la ureasa con la úrea. El acoplamiento también es una herramienta importante en el diseño de medicamentos asistido por computadora. Por lo que un nuevo fármaco debe ajustarse al sitio activo de un receptor específico. Teniendo en cuenta esta breve descripción de la importancia del acoplamiento de la ureasa frente a un ligando, se realizó la predicción del acoplamiento en el servidor PatchDock en el cual se buscó encontrar la mejor complementariedad geométrica entre el receptor y ligando. Este sistema es comparado como un rompecabezas. En el cual se especificó el radio de agrupamiento RMSD de 1.5 Å, este valor normalmente es usado por el servidor en la etapa final del algoritmo asegurando que la distancia entre cualquiera de las dos soluciones de salida sea al menos el valor RMSD de agrupamiento especificado.

Tabla 3.10: Energía de contacto atómico de los diferentes sistemas interactuantes.

Acoplamiento	*ACE
Ureasa - Úrea	-29.34
Ureasa - Ácido acetohidroxámico	-10.37
Ureasa - ZINC01611325	-10.86
Ureasa - ZINC04701037	-10.57
Ureasa - ZINC05298729	-9.33
Ureasa - ZINC08034818	-23.2
Ureasa - ZINC39245715	-25.65

* En Kcal/mol

Teniendo en cuenta a la úrea como principal sustrato de la ureasa se analizó la energía de acoplamiento de este. Por otro lado se analizó el acoplamiento con el ácido acetohidroxámico como inhibidor de la ureasa y así mismo 5 derivados de este inhibidor. El ACE (Atomic contact energy) proporciona un componente de solvatación de energía libre razonablemente preciso y rápidamente evaluable, y por lo tanto hace posible una fiable reproducción de cálculos de acoplamiento, diseño y plegamiento de proteínas.⁸⁵

El sistema ureasa-úrea tuvo un valor ACE de -29.34 Kcal/mol, mientras que el acoplamiento con el ácido acetohidroxámico y sus derivados mostró valores interesantes, los cuales se muestran en la Tabla 3.10. Los valores de tres derivados del ácido acetohidroxámico: ZINC01611325 (-10.86 Kcal/mol), ZINC04701037 (-10.57 Kcal/mol), y ZINC05298729 (-9.33 Kcal/mol) fueron similares al ácido acetohidroxámico (-10.37 Kcal/mol), mientras que los otros dos derivados; ZINC08034818 (-23.2 Kcal/mol) y ZINC39245715 (-25.65 Kcal/mol) obtuvieron valores parecidos al de la úrea (-29.34 Kcal/mol). En el Anexo D se presentan 30 de los mejores acoplamientos para cada sistema, del cual se ha considerado el de mayor puntuación.

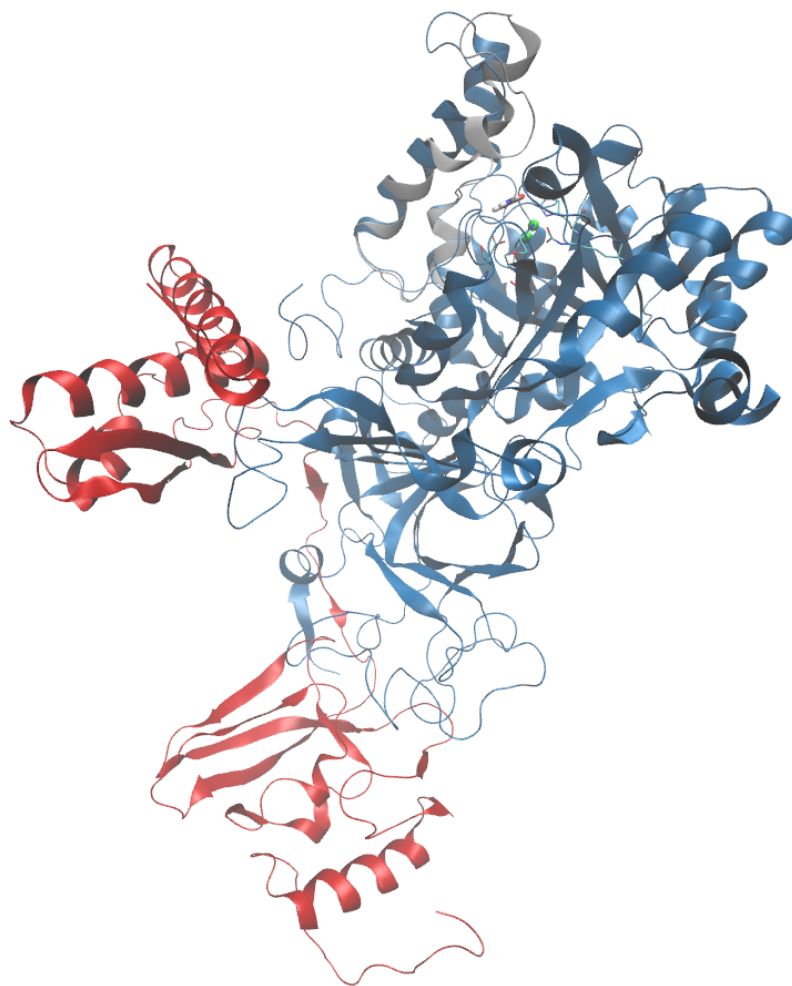


Figure 3.18: Dímero α/β de ureasa frente a la úrea. Representación en forma de *cartoon* del dímero (α - azul y β - rojo) y de color gris la porción de proteína que corresponde al flap cerrado.

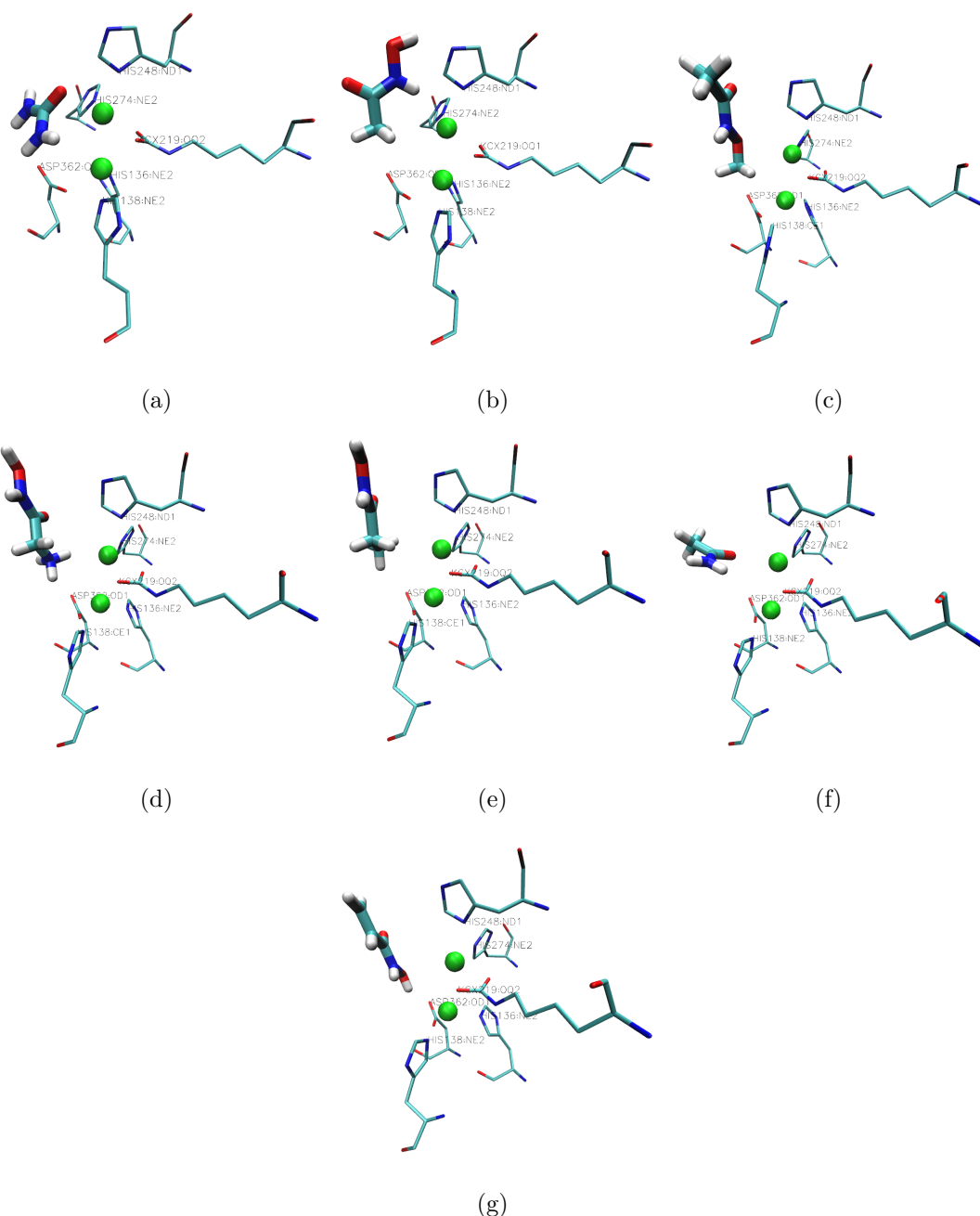


Figure 3.19: Sistemas interactuantes. (a) Ureasa - Úrea. (b) Ureasa - Ácido aceto-hidroxámico. (c) Ureasa - ZINC01611325. (d) Ureasa - ZINC04701037. (e) Ureasa - ZINC05298729. (f) Ureasa - ZINC08034818. (g) Ureasa - ZINC39245715.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la acetamida (ZINC08034818) con respecto al N-Hydroxyprop-2-enamida (ZINC39245715) vemos que el que se comporta similar a la úrea es la acetamida. Por lo que considerando estas propiedades y su ACE, parece ser un posible candidato para futuros estudios de inhibición de la ureasa. Finalmente el estudio del acomplamiento molecular receptor-ligando nos mostró

que para que se de un adecuado acoplamiento es necesario que el flap se encuentre en su modo abierto. En la Figura 3.18 se muestra al dímero α/β y adicionalmente la superposición de las residuos de un dímero con el flap cerrado, claramente se puede observar que el flap de color gris representa el sistema que obstruye la entrada del sitio activo. Adicionalmente en la Figura 3.19 fueron representados los diferentes sistemas interactuantes, donde las esferas de color verde nos indican los átomos de Niquel, así como los principales residuos que conforman el sitio activo (HIS136, HIS138, HIS248, HIS274, ASP362, y KCX219).

Dentro del campo de las Ciencias Biomédicas se pueden lograr grandes aportes a la medicina moderna, debido a que actualmente se busca acelerar el descubrimiento de nuevos compuestos activos. Particularmente dentro de la búsqueda de nuevos inhibidores de *Helicobacter pylori*, los métodos de ensayos clínicos son muy costosos y muchas veces se necesita de largos periodos de prueba para poder encontrar algo que funcione realmente. En este punto es que las herramientas de la física, química y biología computacional son capaces de facilitar enormemente la investigación clínica sobre el estudio de nuevos inhibidores, logrando la predicción del comportamiento estructural de proteínas como blancos terapéuticos, el cribado virtual de fármacos, y su actividad en enfermedades nuevas antes de realizar los ensayos clínicos.

Conclusiones

- Se determinó el modelo del complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori* a pH 2, 3, 4, 5, 6 y 7; cuya estructura está conformada por 24 subunidades proteicas con 12 sitios activos cubiertos por un *flap*, permitiendo la apertura de estos sitios activos en pHs bajos.
- Se evaluó el sitio activo del complejo supramolecular ureasa de *Helicobacter pylori* a través de la conformación de su estructura terciaria, donde se evidenció la presencia de dos cationes de níquel (Ni^{+2}), uno pentacoordinado y el otro hexacoordinado, esa coordinación está mediada por tres histidinas (HIS138, HIS248, y HIS274), una lisina carboxilada (KCX219), un ácido aspártico (ASP362), y una molécula de agua. Así mismo este lugar muestra una alta drugabilidad y un amplio volumen que permiten el acceso del sustrato y/o un inhibidor.
- Se estudió el acoplamiento molecular entre un heterodímero de la ureasa (receptor) y cinco moléculas derivadas del ácido acetohidroxámico (ligandos); el sitio de unión estuvo conformado por HIS136, HIS138, HIS248, HIS274, ASP362, y KCX219; siendo el mejor candidato para el acoplamiento la acetamida con un ACE de -23.2 Kcal/mol y con propiedades fisicoquímicas parecidas a la úrea.

Recomendaciones

Para poder comprender mejor el efecto de la acetamida como posible prometedora inhibidora de la ureasa de *H. pylori* se debería de analizar su efecto en placas de cultivo de *H. pylori*. Además algo adicional para fortalecer este hallazgo sería el análisis mediante simulaciones del acoplamiento molecular y posterior análisis de energía de unión en función del tiempo mediante MM/PBSA considerando el efecto de los estados de protonación para pHs bajos.

Referencias Bibliográficas

- [1] Barry J Marshall and J Robin Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, 323(8390):1311–1315, 1984.
- [2] Mārcis Leja, Anthony Axon, and Hermann Brenner. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 21(S1):3–7, 2016.
- [3] Barry Marshall. A Brief History of the Discovery of *Helicobacter pylori*. In *Helicobacter pylori*, pages 3–15. Springer, 2016.
- [4] Muhammad Miftahussurur and Yoshio Yamaoka. Human Migration. In *Helicobacter pylori*, pages 19–32. Springer, 2016.
- [5] Millie I Darling and Helen D Donoghue. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America-A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2):131–139, 2014.
- [6] F MÚgraud, Philippe Lehours, and Filipa F Vale. The history of *Helicobacter pylori*: from phylogeography to paleomicrobiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(11):922–927, 2016.
- [7] Kwong Ming Fock, David Y Graham, and Peter Malfertheiner. *Helicobacter pylori* research: historical insights and future directions. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10(8):495–500, 2013.
- [8] Kwong Ming Fock, Nick Talley, Paul Moayyedi, Richard Hunt, Takeshi Azuma, Kentaro Sugano, Shu Dong Xiao, Shiu Kum Lam, Khean Lee Goh, Tsutomu Chiba, et al. Asia–Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(3):351–365, 2008.

- [9] Nayoung Kim. Prevalence and Transmission Routes of *H. pylori*. In *Helicobacter pylori*, pages 3–19. Springer, 2016.
- [10] Bárbara Peleteiro, Ana Bastos, Ana Ferro, and Nuno Lunet. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Digestive diseases and sciences*, 59(8):1698–1709, 2014.
- [11] Helen CS Meier, Mary N Haan, Carlos F Mendes de Leon, Amanda M Simanek, Jennifer B Dowd, and Allison E Aiello. Early life socioeconomic position and immune response to persistent infections among elderly Latinos. *Social Science & Medicine*, 166:77–85, 2016.
- [12] Jean-F Tomb, Owen White, Anthony R Kerlavage, Rebecca A Clayton, Granger G Sutton, Robert D Fleischmann, Karen A Ketchum, Hans Peter Klenk, Steven Gill, Brian A Dougherty, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642):539–547, 1997.
- [13] Heidi Q Hu, Ryan C Johnson, D Scott Merrell, and Michael J Maroney. Nickel Ligation of the N-terminal Amine of HypA is required for urease maturation in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 56(8):1105–1116, 2017.
- [14] Aleksandra W Debowski, Senta M Walton, Eng-Guan Chua, Alfred Chin-Yen Tay, Tingting Liao, Binit Lamichhane, Robyn Himbeck, Keith A Stubbs, Barry J Marshall, Alma Fulurija, et al. *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. *PLoS Pathogens*, 13(6):e1006464, 2017.
- [15] Dimitrios Tsikas, Erik Hanff, and Gorig Brunner. *Helicobacter pylori*, Its Urease and Carbonic Anhydrases, and Macrophage Nitric Oxide Synthase. *Trends in Microbiology*, 2017.
- [16] Agnts Labigne, Valeirie Cussac, and Pascale Courcoux. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *Journal of bacteriology*, 173(6):1920–1931, 1991.
- [17] Elizabeth A Marcus and David R Scott. Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 6(2):93–99, 2001.

- [18] Nam-Chul Ha, Sang-Taek Oh, Jae Young Sung, Kyeong Ah Cha, Mann Hyung Lee, and Byung-Ha Oh. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(6):505–509, 2001.
- [19] N Allocati, M Masulli, C Di Ilio, and V De Laurenzi. Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell death & disease*, 6(1):e1609, 2015.
- [20] Duane T Smoot, HL Mobley, Gwynn R Chippendale, JF Lewison, and JH Re-sau. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infection and immunity*, 58(6):1992–1994, 1990.
- [21] Yuping Liu, Hongzhi Tang, Zhanglin Lin, and Ping Xu. Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology advances*, 33(7):1484–1492, 2015.
- [22] Elizabeth A Marcus and David R Scott. Gastric Colonization by *H. pylori*. In *Helicobacter pylori*, pages 23–34. Springer, 2016.
- [23] Eitaro Aihara, Chet Closson, Andrea L Matthis, Michael A Schumacher, Amy C Engevik, Yana Zavros, Karen M Ottemann, and Marshall H Montrose. Motility and chemotaxis mediate the preferential colonization of gastric injury sites by *Helicobacter pylori*. *PLoS pathogens*, 10(7):e1004275, 2014.
- [24] Hong Li, Tingting Liao, Aleksandra W Debowski, Hong Tang, Hans-Olof Nilsson, Keith A Stubbs, Barry J Marshall, and Mohammed Benghezal. Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 21(6):445–461, 2016.
- [25] Yuichi Matsuo, Yasutoshi Kido, and Yoshio Yamaoka. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*, 9(3):101, 2017.
- [26] Mónica Oleastro and Armelle Ménard. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. *Biology*, 2(3):1110–1134, 2013.
- [27] Behnam Kalali, Raquel Mejías-Luque, Anahita Javaheri, and Markus Gerhard. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators of inflammation*, 2014, 2014.

- [28] Bradley J Voss, Jennifer A Gaddy, W Hayes McDonald, and Timothy L Cover. Analysis of surface-exposed outer membrane proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology*, 196(13):2455–2471, 2014.
- [29] Suresh Subedi, Kristof Moonens, Ema Romao, Alvin Lo, Guy Vandebussche, Jeanna Bugaytsova, Serge Muyldermans, Thomas Borén, and Han Remaut. Expression, purification and X-ray crystallographic analysis of the *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin BabA. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(12):1631–1635, 2014.
- [30] Naim Hage, Tina Howard, Chris Phillips, Claire Brassington, Ross Overman, Judit Debreczeni, Paul Gellert, Snow Stolnik, G Sebastiaan Winkler, and Franco H Falcone. Structural basis of Lewis b antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Science advances*, 1(7):e1500315, 2015.
- [31] Siew Siew Pang, Stanley Thai Son Nguyen, Andrew J Perry, Christopher J Day, Santosh Panjekar, Joe Tiralongo, James C Whisstock, and Terry Kwok. The three-dimensional structure of the extracellular adhesion domain of the sialic acid-binding adhesin SabA from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(10):6332–6340, 2014.
- [32] Yu-Lin Su, Hsiang-Ling Huang, Bo-Shih Huang, Po-Chung Chen, Chien-Sheng Chen, Hong-Long Wang, Pin-Hsin Lin, Meng-Shu Chieh, Jiunn-Jong Wu, Jyh-Chin Yang, et al. Combination of OipA, BabA, and SabA as candidate biomarkers for predicting *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Scientific reports*, 6, 2016.
- [33] Alessandra Polenghi, Fleur Bossi, Fabio Fischetti, Paolo Durigutto, Anna Cabrelle, Nicola Tamassia, Marco A Cassatella, Cesare Montecucco, Francesco Tedesco, and Marina De Bernard. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* crosses endothelia to promote neutrophil adhesion in vivo. *The Journal of Immunology*, 178(3):1312–1320, 2007.
- [34] Wei-Tung Hsu, Shu-Yi Ho, Ting-Yan Jian, Han-Ning Huang, Yu-Ling Lin, Chia-Hung Chen, Tsung-Han Lin, Ming-Shiang Wu, Chang-Jer Wu, Yi-Lin Chan, et al. *Helicobacter pylori*-derived heat shock protein 60 increases the induction of regula-

- tory T-cells associated with persistent infection. *Microbial pathogenesis*, 119:152–161, 2018.
- [35] Mayara Luciana Sallas, Jessica Lima Melchiades, Luanna Munhoz Zabaglia, Juliana Ribeiro do Prado Moreno, Wilson Aparecido Orcini, Elizabeth Suchi Chen, Marilia de Arruda Cardoso Smith, Spencer Luiz Marques Payão, and Lucas Trevizani Rasmussen. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, dupA and oipA Genotypes in Patients with Gastric Disease. *Advances in Microbiology*, 7(01):1, 2017.
- [36] Negar Souod, Meysam Sarshar, Hossein Dabiri, Hassan Momtaz, Mohammad Kargar, Alireza Mohammadzadeh, and Saeed Abdi. The study of the oipA and dupA genes in *Helicobacter pylori* strains and their relationship with different gastroduodenal diseases. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 8(Suppl1):S47, 2015.
- [37] Fazal H Tabassam, David Y Graham, and Yoshio Yamaoka. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cellular microbiology*, 10(4):1008–1020, 2008.
- [38] Luisa F Jiménez-Soto and Rainer Haas. The CagA toxin of *Helicobacter pylori*: abundant production but relatively low amount translocated. *Scientific reports*, 6, 2016.
- [39] Yoshio Yamaoka. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. *Gastroenterology research and practice*, 2012, 2012.
- [40] Ameer A Memon and John C Atherton. Reply to “*Helicobacter pylori* vacA as Marker for Gastric Cancer and Gastroduodenal Diseases: One but Not the Only Factor”. *Journal of clinical microbiology*, 52(12):4452–4452, 2014.
- [41] Hussein Ali Osman, Habsah Hasan, Rapeah Suppian, Syed Hassan, Dzulkar-naen Zakaria Andee, NOORIZAN ABDUL MAJID, and BIN ALWI ZILFALIL. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, babA2, and dupA genotypes and correlation with clinical outcome in Malaysian patients with dyspepsia. *Turkish journal of medical sciences*, 45(4):940–946, 2015.

- [42] Masoumeh Douraghi, Marjan Mohammadi, Akbar Oghalaie, Afshin Abdirad, Mohammad Ali Mohagheghi, Mahmoud Eshagh Hosseini, Hojat Zeraati, Amir Ghasemi, Maryam Esmaili, and Nazanin Mohajerani. dupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. *Journal of medical microbiology*, 57(5):554–562, 2008.
- [43] Anthony TR Axon. Transmission of *Helicobacter pylori*. *The Yale journal of biology and medicine*, 70(1):1, 1997.
- [44] Arun R Dayanathi, J Sunitha, Ananthalakshmi Ramamoorthy, Nadeem Jeddy, Sathiya Jeeva, et al. *Helicobacter pylori* and its role in oral diseases: A note on pathogenesis. *Journal of Indian Academy of Dental Specialist Researchers*, 1(2):62, 2014.
- [45] Linda Morris Brown. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews*, 22(2):283–297, 2000.
- [46] SA Dowsett and MJ Kowolik. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(3):226–233, 2003.
- [47] Carolina Palomino Camargo and Elisabetta Tomé Boschian. *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *VOLUMEN 25, N 2, AÑO 2.012*, page 85, 2012.
- [48] David Bui, Heidi E Brown, Robin B Harris, and Eyal Oren. Serologic Evidence for Fecal–Oral Transmission of *Helicobacter pylori*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(1):82–88, 2016.
- [49] Ricardo Sebastián Alba Posse, Roberto Alejandro Toledo, and María Lourdes Viana Cabral. *Helicobacter pylori*: clínica, diagnóstico y tratamiento. *Revista de posgrado de la vía cátedra de medicina*, 158:9–12, 2006.
- [50] Carlo-Federico Zambon, Daniela Basso, Michela Pelloso, Alberto Tessari, and Mario Plebani. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* in Humans. *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections, Volume I*, pages 607–634, 2016.

- [51] Toshihiro Nishizawa, Tatsuhiro Masaoka, and Hidekazu Suzuki. Functional Dyspepsia: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Journal of General and Family Medicine*, 17(3):204–210, 2016.
- [52] Li-Jun Du, Bin-Rui Chen, John J Kim, Sarah Kim, Jin-Hua Shen, and Ning Dai. Helicobacter pylori eradication therapy for functional dyspepsia: Systematic review and meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 22(12):3486, 2016.
- [53] K Uchiyama, K Ida, J Okuda, Y Asai, Y Ohyama, M Kuroda, N Matsumoto, T Takami, T Ogawa, and K Takaori. Correlations of hemoglobin index (IHb) of gastric mucosa with Helicobacter pylori (H. pylori) infection and inflammation of gastric mucosa. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(11):1054–1060, 2004.
- [54] Peter Malfertheiner, Francis KL Chan, and Kenneth EL McColl. Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 374(9699):1449–1461, 2009.
- [55] Philipp Schlaermann, Benjamin Toelle, Hilmar Berger, Sven C Schmidt, Matthias Glanemann, Jürgen Ordemann, Sina Bartfeld, Hans J Mollenkopf, and Thomas F Meyer. A novel human gastric primary cell culture system for modelling Helicobacter pylori infection in vitro. *Gut*, 65(2):202–213, 2016.
- [56] C Sostres, P Carrera-Lasfuentes, R Benito, P Roncales, M Arruebo, MT Arroyo, L Bujanda, LA García-Rodríguez, and A Lanás. Peptic ulcer bleeding risk. The role of Helicobacter pylori infection in NSAID/low-dose aspirin users. *The American journal of gastroenterology*, 110(5):684, 2015.
- [57] Olof Nyrén. Helicobacter pylori infection, peptic ulcer disease and gastric cancer. *GI Epidemiology*, pages 124–142, 2007.
- [58] Manuel Amieva and Richard M Peek. Pathobiology of Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *Gastroenterology*, 150(1):64–78, 2016.
- [59] Jae Jin Hwang, Dong Ho Lee, Ae-Ra Lee, Hyuk Yoon, Cheol Min Shin, Young Soo Park, and Nayoung Kim. Characteristics of gastric cancer in peptic ulcer patients with Helicobacter pylori infection. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(16):4954, 2015.

- [60] Eric Van Cutsem, Xavier Sagaert, Baki Topal, Karin Haustermans, and Hans Prenen. Gastric cancer. *The Lancet*, 388(10060):2654–2664, 2016.
- [61] Masahiko Hashinaga, Rumiko Suzuki, Junko Akada, Takashi Matsumoto, Yasutoshi Kido, Tadayoshi Okimoto, Masaaki Kodama, Kazunari Murakami, and Yoshio Yamaoka. Differences in amino acid frequency in CagA and VacA sequences of *Helicobacter pylori* distinguish gastric cancer from gastric MALT lymphoma. *Gut pathogens*, 8(1):54, 2016.
- [62] Babak Pourakbari, Mona Ghazi, Shima Mahmoudi, Setareh Mamishi, Hossein Azhdarkosh, Mehri Najafi, Bahram Kazemi, Ali Salavati, and Akbar Mirsalehian. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3):795–798, 2013.
- [63] Yao-Kuang Wang, Fu-Chen Kuo, Chung-Jung Liu, Meng-Chieh Wu, Hsiang-Yao Shih, Sophie SW Wang, Jeng-Yih Wu, Chao-Hung Kuo, Yao-Kang Huang, and Deng-Chyang Wu. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(40):11221, 2015.
- [64] Mazen Ferwana, Imad Abdulmajeed, Ali Alhajiahmed, Wedad Madani, Belal Firwana, Rim Hasan, Osama Altayar, Paul J Limburg, Mohammad Hassan Murad, and Bandar Knawy. Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(4):1305, 2015.
- [65] Chiara Ricci, John Holton, and Dino Vaira. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 21(2):299–313, 2007.
- [66] Saurabh Kumar Patel, Chandra Bhan Pratap, Ashok Kumar Jain, Anil Kumar Gulati, and Gopal Nath. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(36):12847, 2014.
- [67] Takahiro Uotani and David Y Graham. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Annals of translational medicine*, 3(1), 2015.
- [68] Giovanni Cammarota, Gianluca Ianiro, Stefano Bibbò, Teresa Antonella Di Rienzo, Luca Masucci, Maurizio Sanguinetti, and Antonio Gasbarrini. Culture-

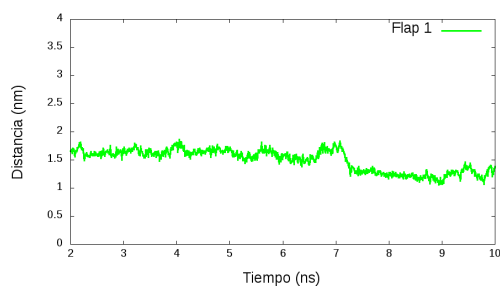
- guided treatment approach for *Helicobacter pylori* infection: review of the literature. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(18):5205, 2014.
- [69] Nimish Vakil and Dino Vaira. Treatment for *H. pylori* infection: new challenges with antimicrobial resistance. *Journal of clinical gastroenterology*, 47(5):383–388, 2013.
- [70] Jyh-Chin Yang, Chien-Wei Lu, and Chun-Jung Lin. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(18):5283, 2014.
- [71] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [72] Hui Li, Andrew D Robertson, and Jan H Jensen. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4):704–721, 2005.
- [73] Sergio Madurga, Josep Lluís Garcés, Encarnació Companys, Carlos Rey-Castro, José Salvador, Josep Galceran, Eudald Vilaseca, Jaume Puy, and Francesc Mas. Ion binding to polyelectrolytes: Monte Carlo simulations versus classical mean field theories. *Theoretical Chemistry Accounts*, 123(1-2):127–135, 2009.
- [74] Sergio Madurga, Carlos Rey-Castro, Isabel Pastor, Eudald Vilaseca, Calin David, Josep Lluís Garcés, Jaume Puy, and Francesc Mas. A semi-grand canonical Monte Carlo simulation model for ion binding to ionizable surfaces: Proton binding of carboxylated latex particles as a case study. *The Journal of chemical physics*, 135(18):184103, 2011.
- [75] Sander Pronk, Szilárd Páll, Roland Schulz, Per Larsson, Pär Bjelkmar, Rossen Apostolov, Michael R Shirts, Jeremy C Smith, Peter M Kasson, David Van Der Spoel, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7):845–854, 2013.
- [76] William L Jorgensen, David S Maxwell, and Julian Tirado-Rives. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and prop-

- erties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45):11225–11236, 1996.
- [77] Jose LF Abascal and Carlos Vega. A general purpose model for the condensed phases of water: TIP4P/2005. *The Journal of chemical physics*, 123(23):234505, 2005.
- [78] G Makov and MC Payne. Periodic boundary conditions in ab initio calculations. *Physical Review B*, 51(7):4014, 1995.
- [79] Giovanni Bussi, Davide Donadio, and Michele Parrinello. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*, 126(1):014101, 2007.
- [80] Michele Parrinello and Aneesur Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*, 52(12):7182–7190, 1981.
- [81] Dina Duhovny, Ruth Nussinov, and Haim J Wolfson. Efficient unbound docking of rigid molecules. In *International workshop on algorithms in bioinformatics*, pages 185–200. Springer, 2002.
- [82] Dina Schneidman-Duhovny, Yuval Inbar, Ruth Nussinov, and Haim J Wolfson. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic acids research*, 33(suppl_2):W363–W367, 2005.
- [83] John J Irwin, Teague Sterling, Michael M Mysinger, Erin S Bolstad, and Ryan G Coleman. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*, 52(7):1757–1768, 2012.
- [84] Mona S Minkara, Melek N Ucisik, Michael N Weaver, and Kenneth M Merz Jr. Molecular dynamics study of helicobacter pylori urease. *Journal of chemical theory and computation*, 10(5):1852–1862, 2014.
- [85] Chao Zhang, George Vasmatazis, James L Cornette, and Charles DeLisi. Determination of atomic desolvation energies from the structures of crystallized proteins1. *Journal of molecular biology*, 267(3):707–726, 1997.

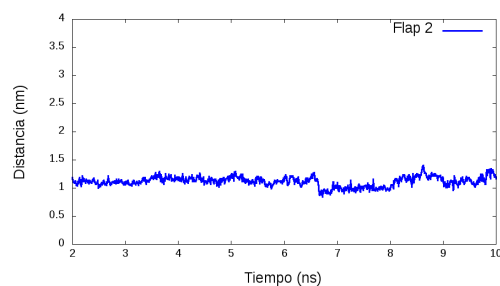
Anexos

Anexos A

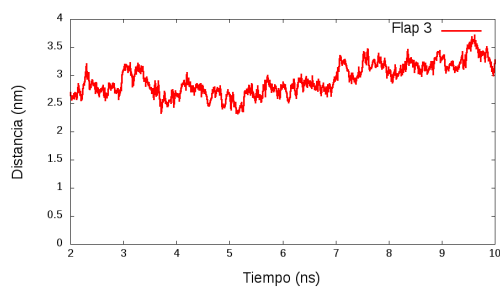
Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328



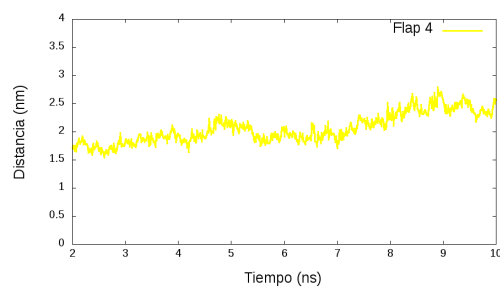
(a)



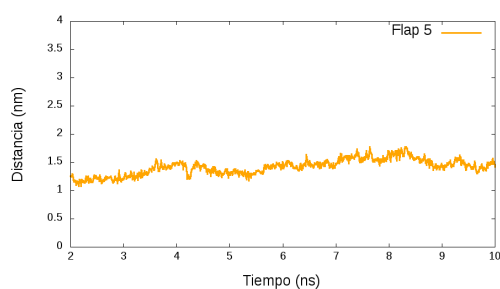
(b)



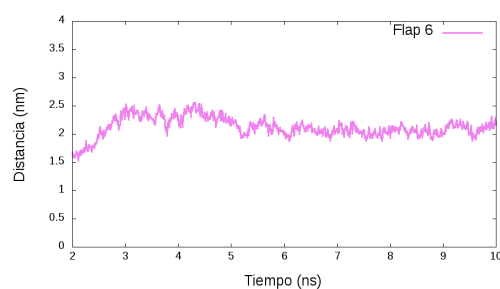
(c)



(d)

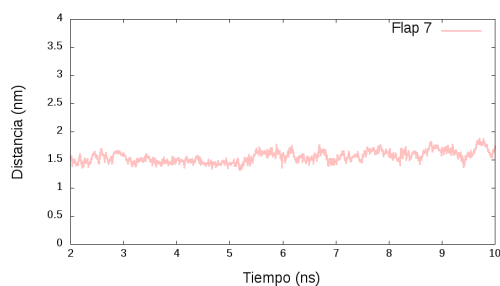


(e)

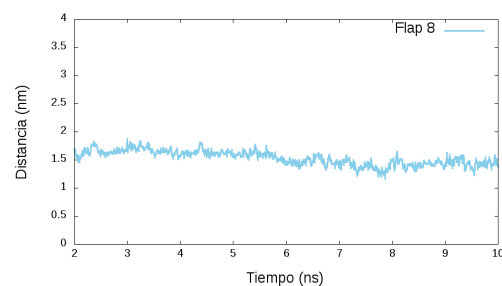


(f)

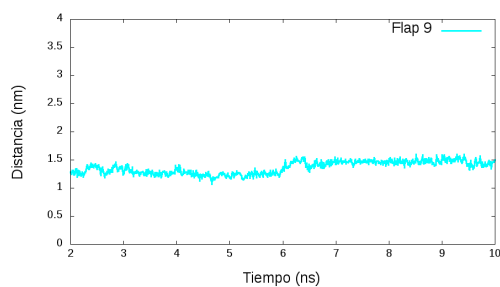
Figure A.1: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 2. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



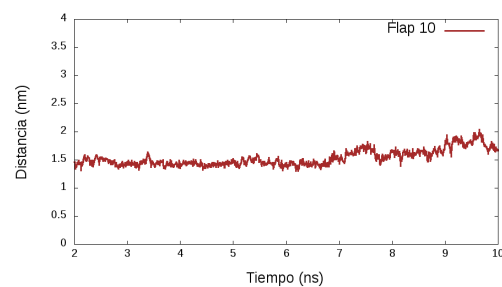
(a)



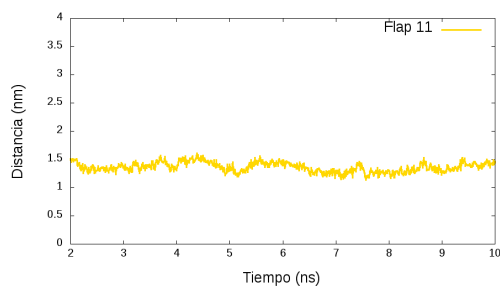
(b)



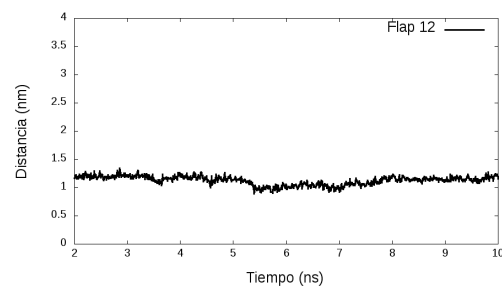
(c)



(d)

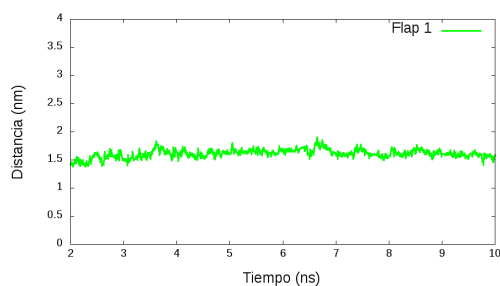


(e)

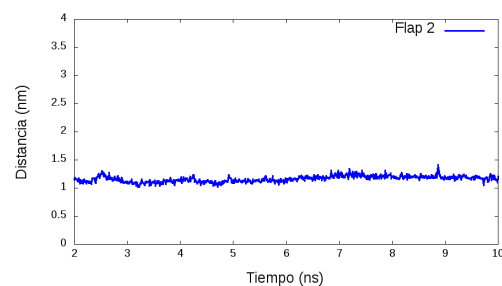


(f)

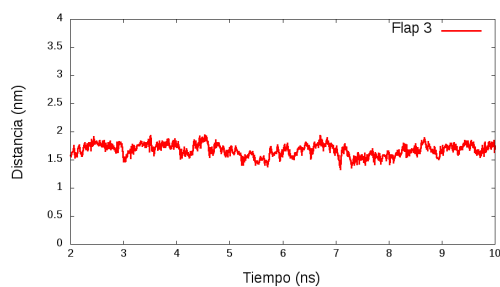
Figure A.2: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 2. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



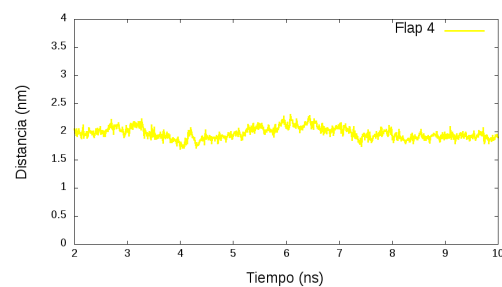
(a)



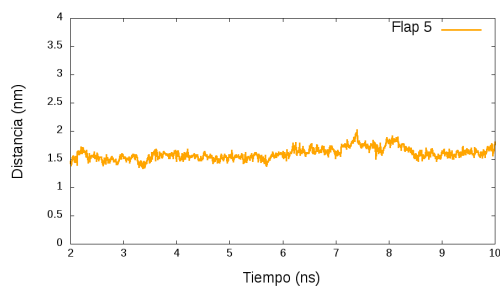
(b)



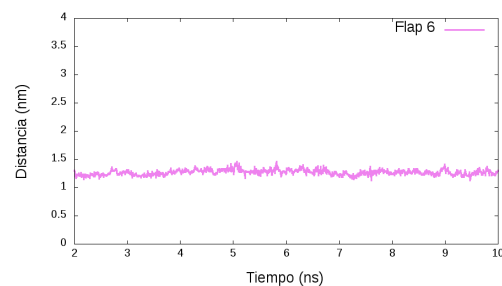
(c)



(d)

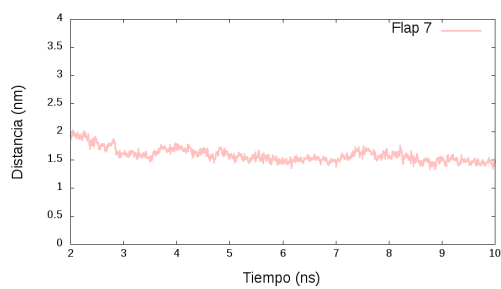


(e)

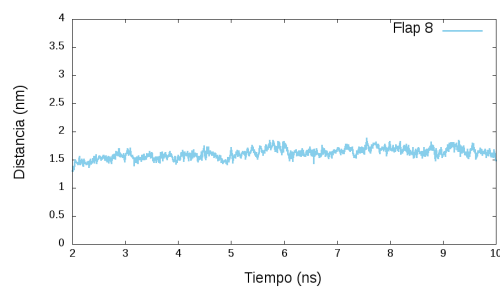


(f)

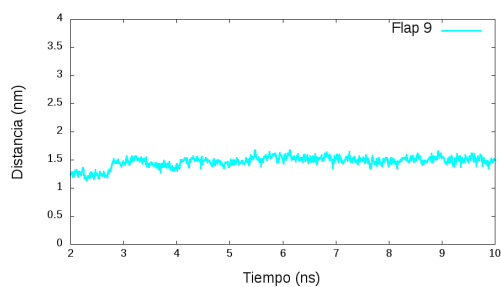
Figure A.3: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 3. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



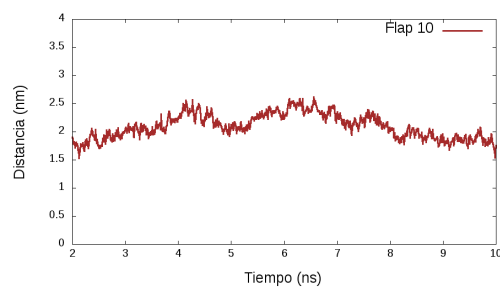
(a)



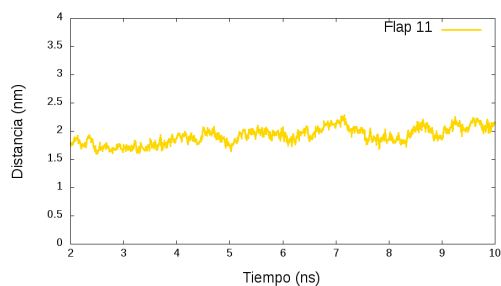
(b)



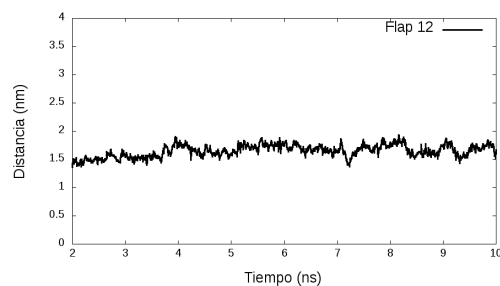
(c)



(d)

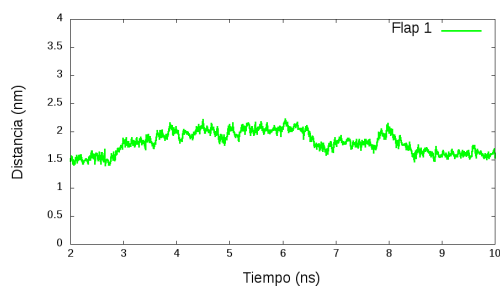


(e)

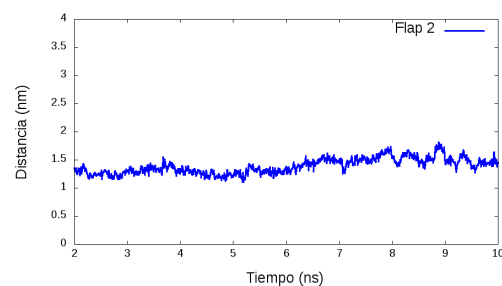


(f)

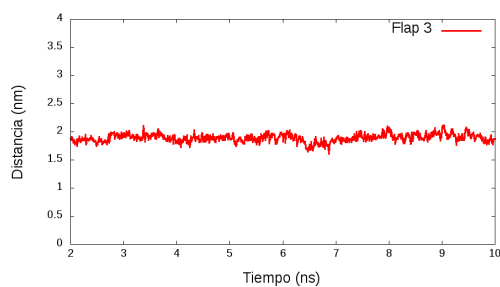
Figure A.4: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 3. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



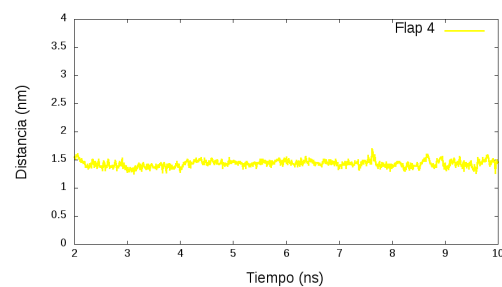
(a)



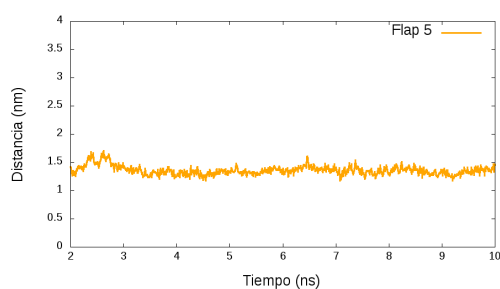
(b)



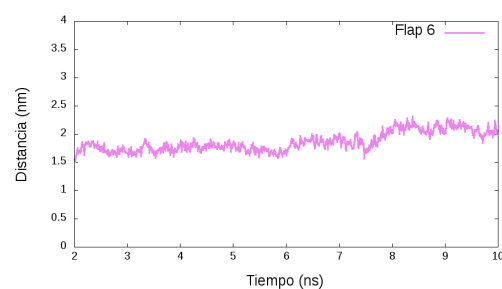
(c)



(d)

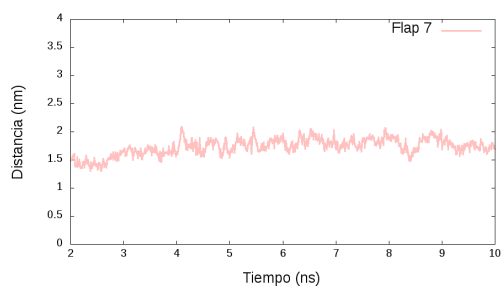


(e)

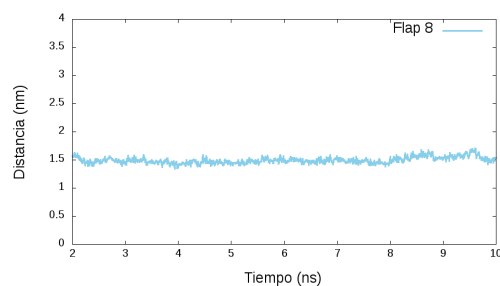


(f)

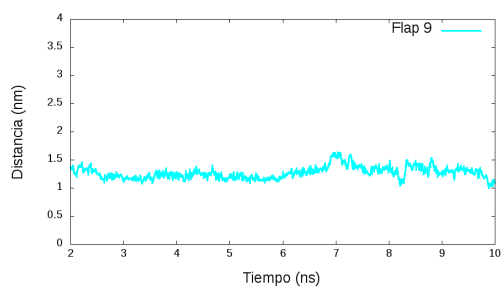
Figure A.5: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 4. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



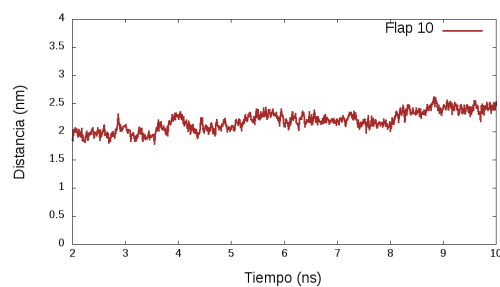
(a)



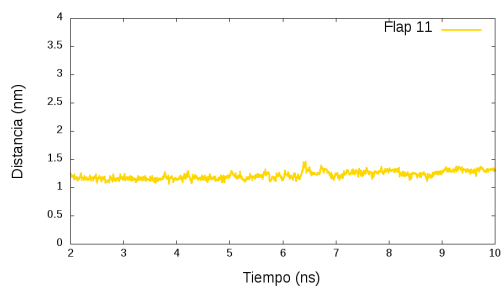
(b)



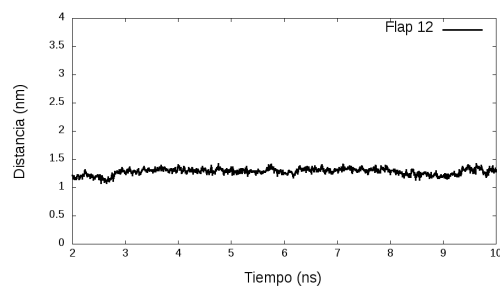
(c)



(d)

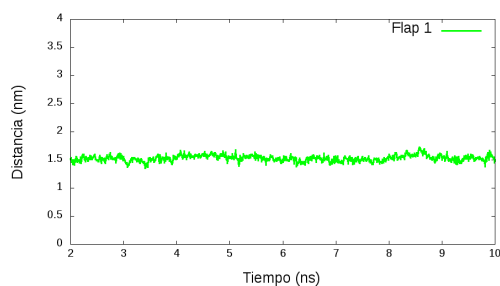


(e)

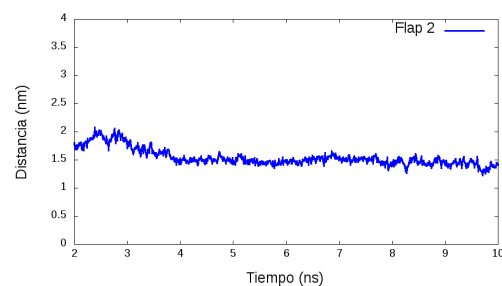


(f)

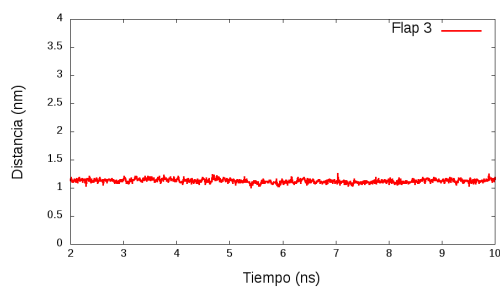
Figure A.6: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 4. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



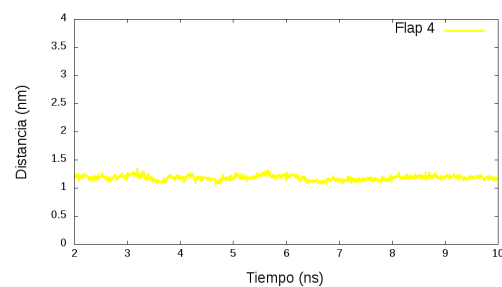
(a)



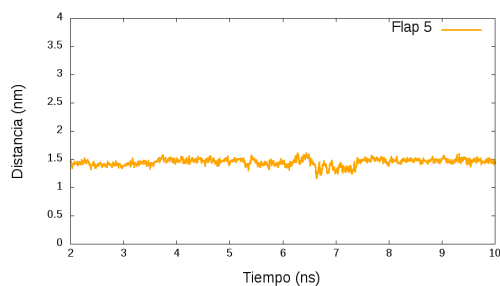
(b)



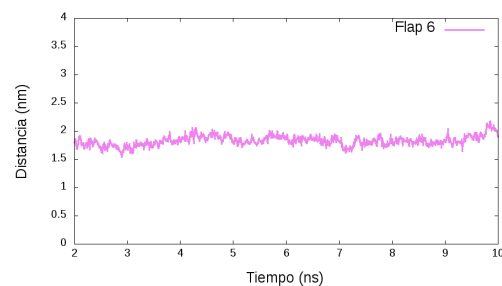
(c)



(d)

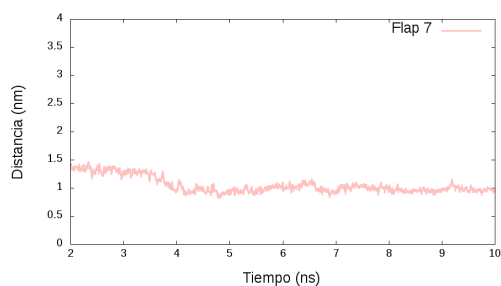


(e)

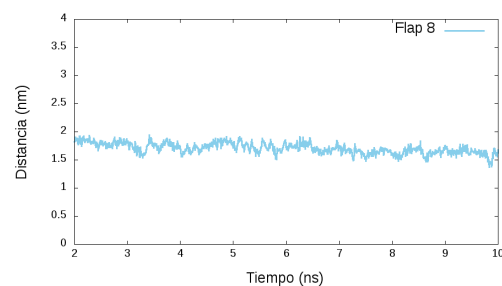


(f)

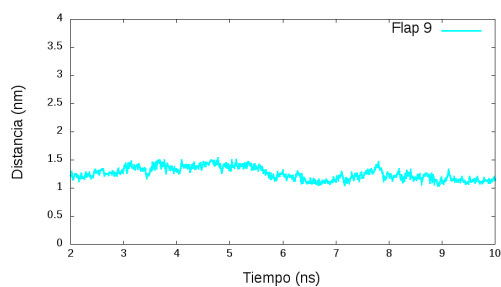
Figure A.7: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 5. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



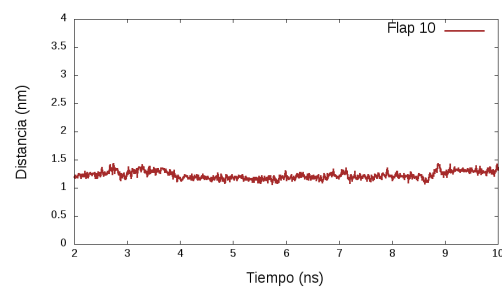
(a)



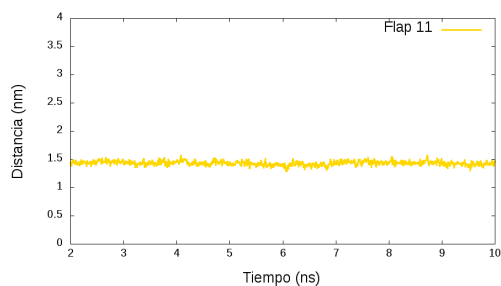
(b)



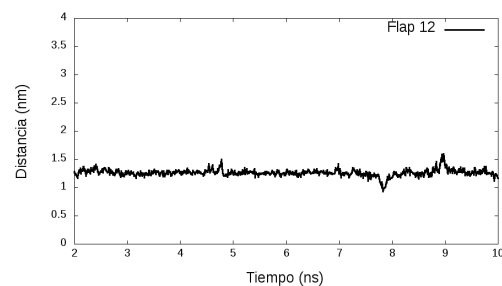
(c)



(d)

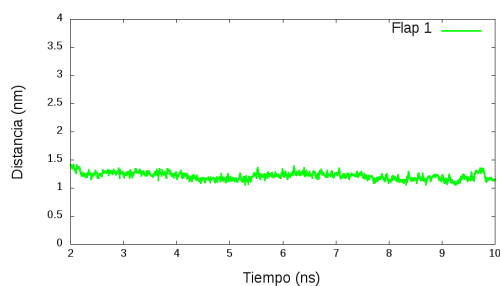


(e)

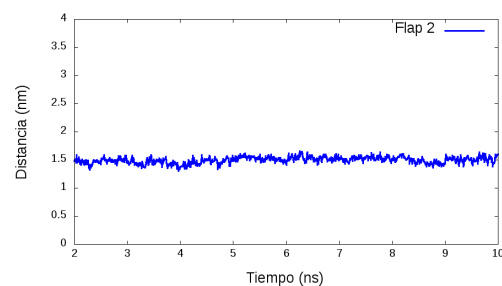


(f)

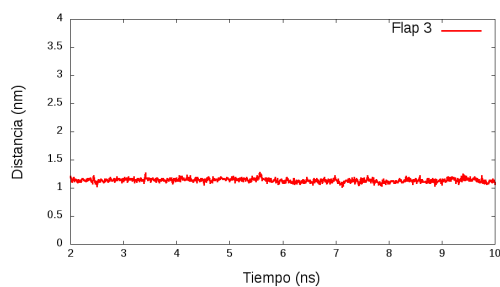
Figure A.8: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 5. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



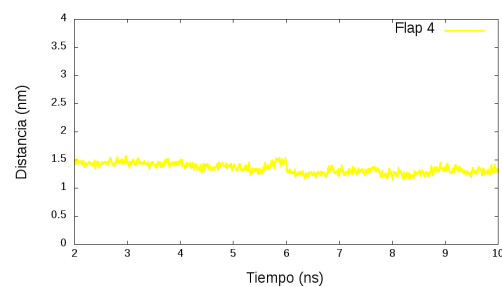
(a)



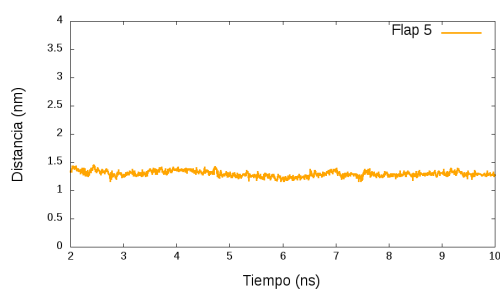
(b)



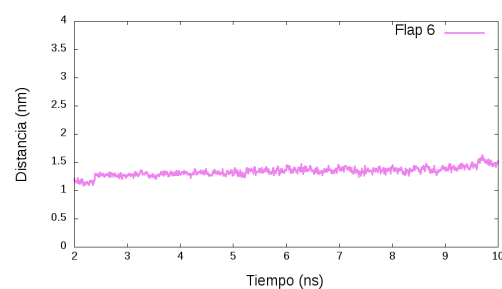
(c)



(d)

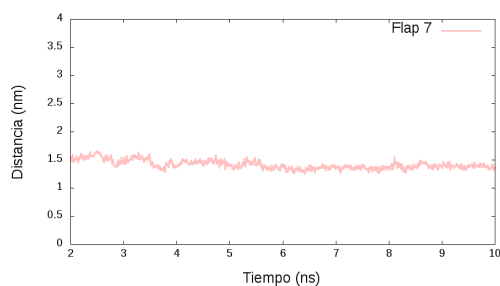


(e)

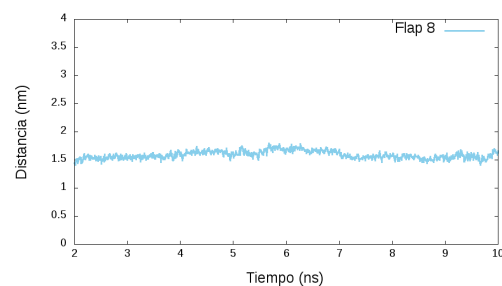


(f)

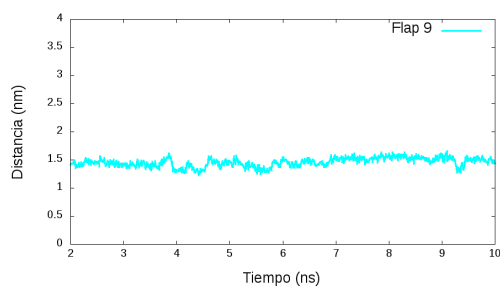
Figure A.9: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 6. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



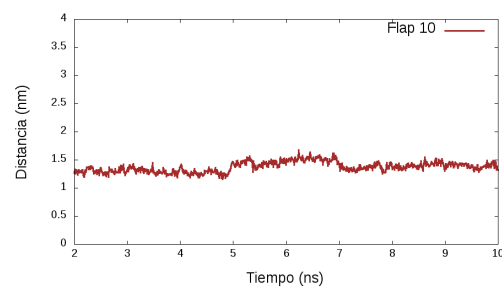
(a)



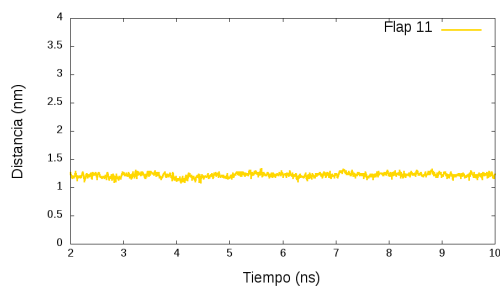
(b)



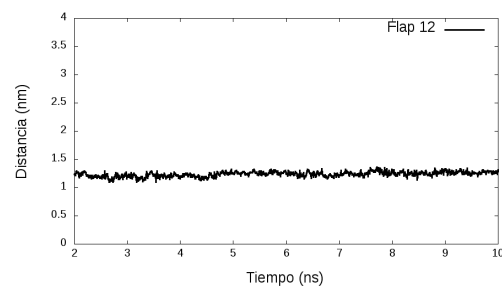
(c)



(d)

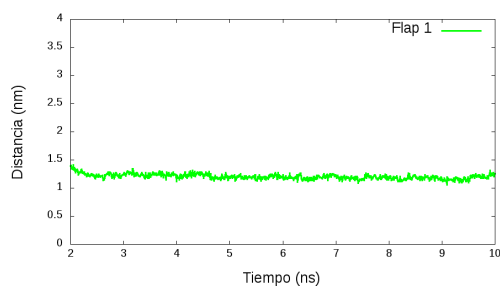


(e)

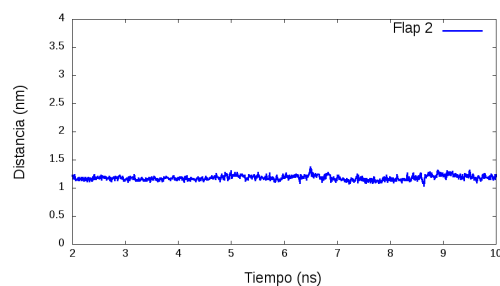


(f)

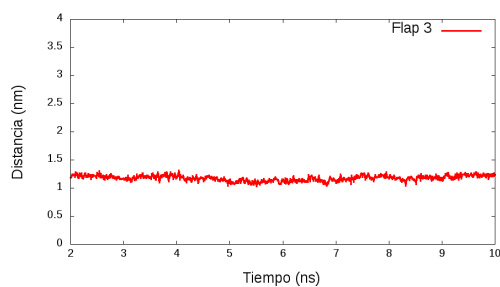
Figure A.10: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 6. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



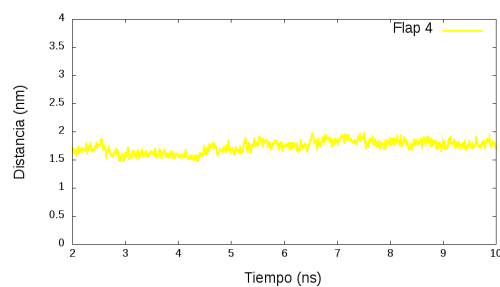
(a)



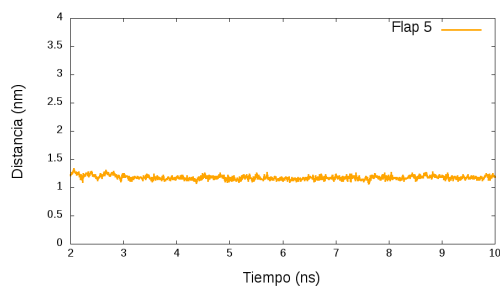
(b)



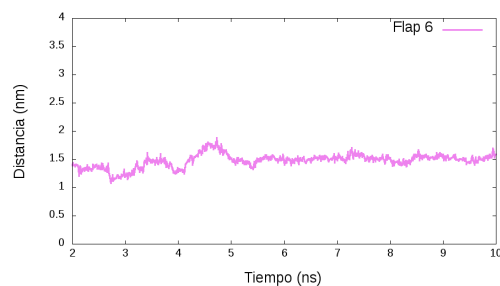
(c)



(d)

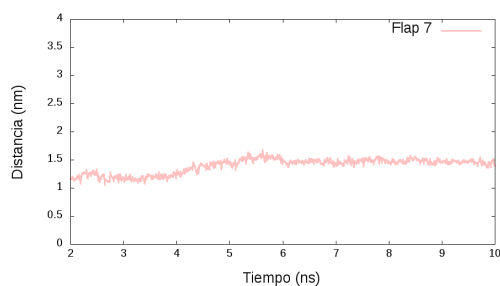


(e)

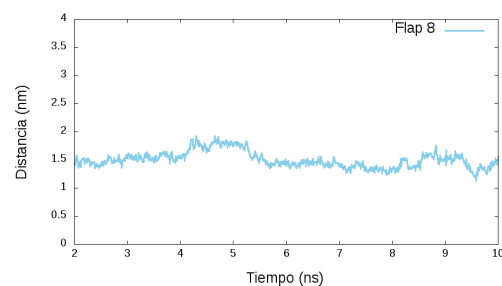


(f)

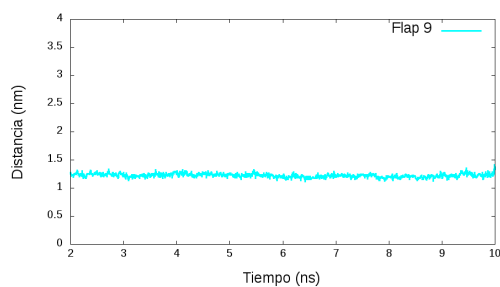
Figure A.11: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 7. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



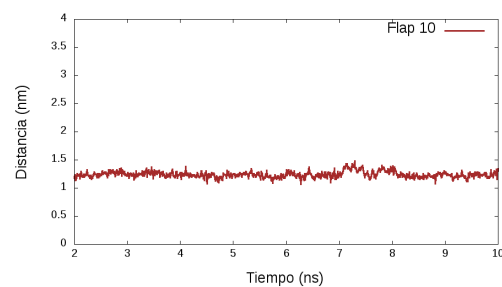
(a)



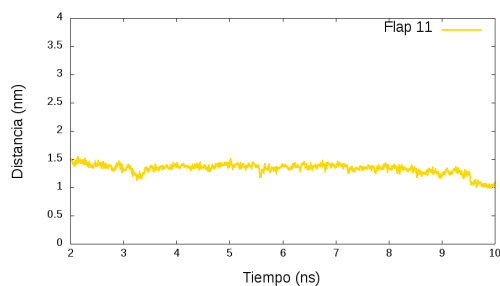
(b)



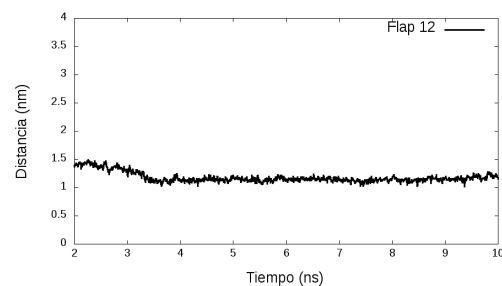
(c)



(d)



(e)

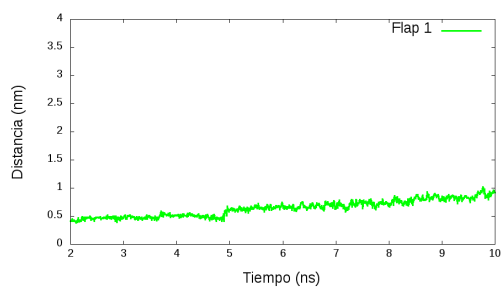


(f)

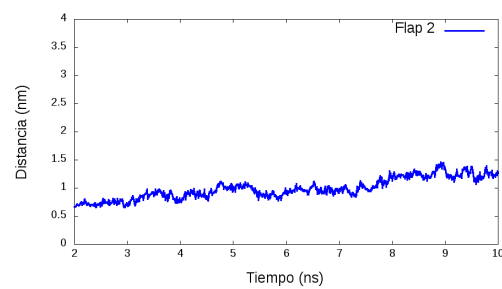
Figure A.12: Distancias críticas de β ALA170 con α ILE328 a pH 7. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.

Anexos B

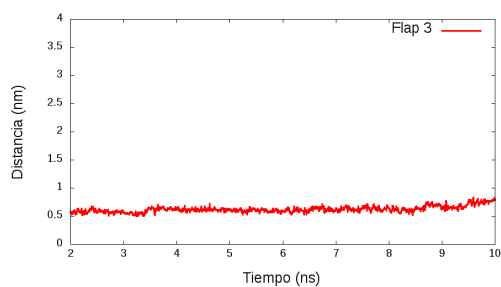
Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322



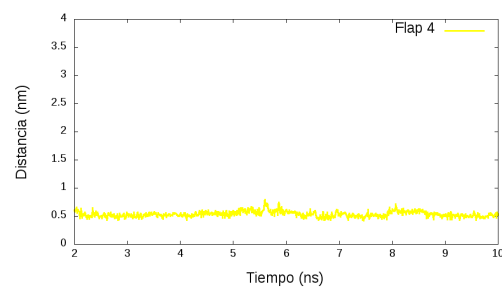
(a)



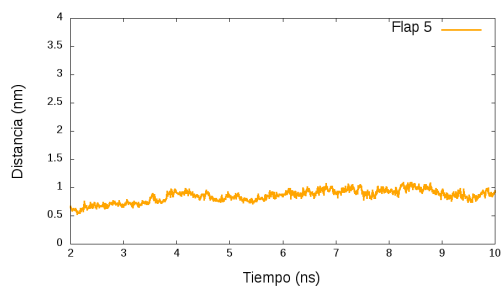
(b)



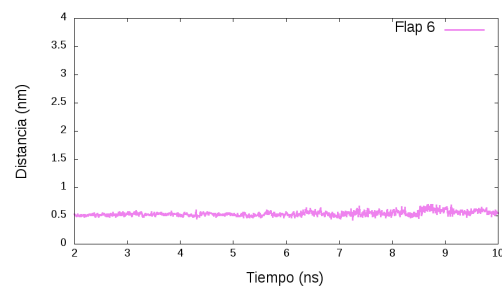
(c)



(d)

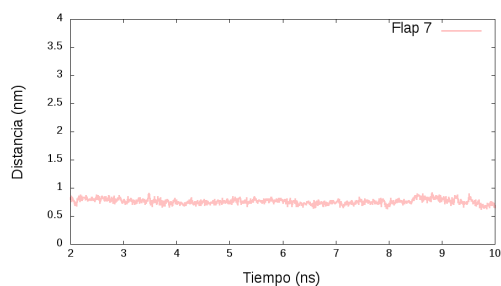


(e)

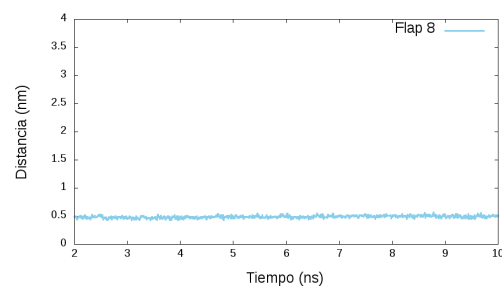


(f)

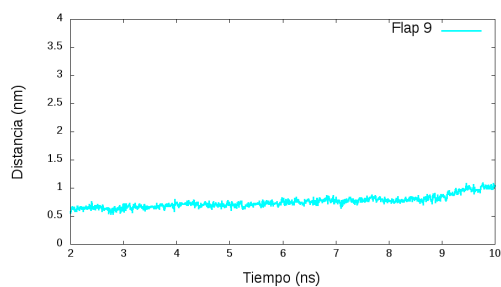
Figure B.1: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 2. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



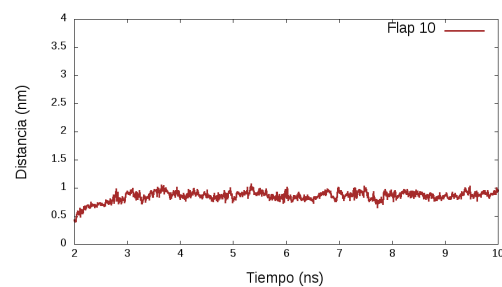
(a)



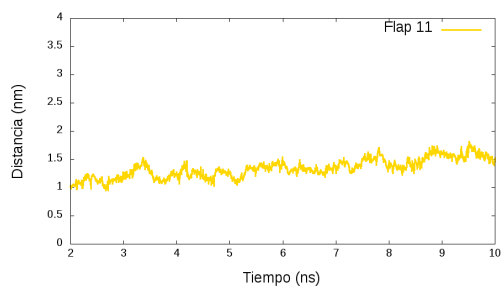
(b)



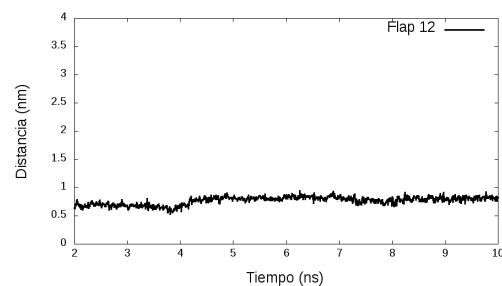
(c)



(d)

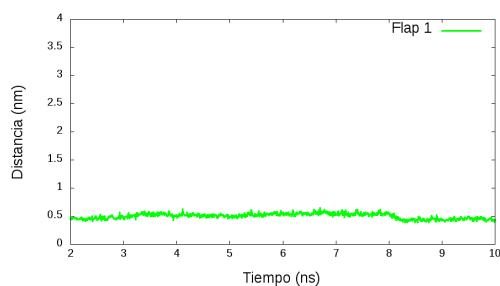


(e)

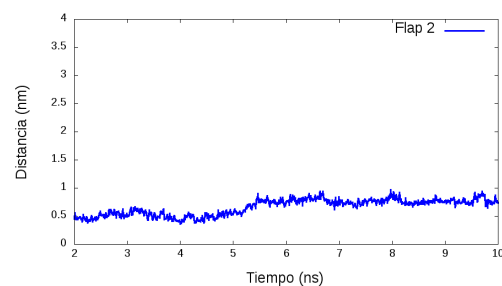


(f)

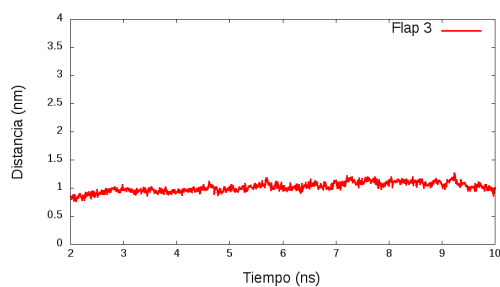
Figure B.2: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 2. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



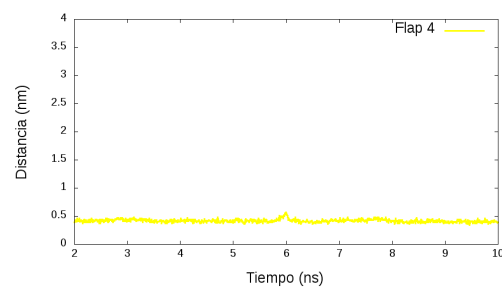
(a)



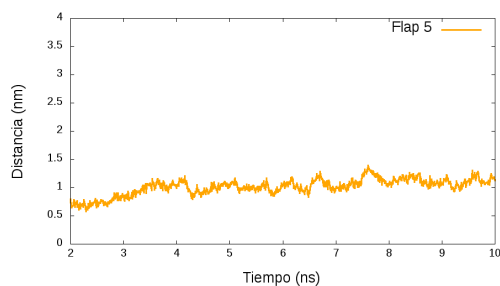
(b)



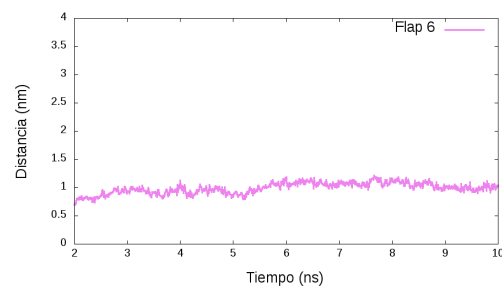
(c)



(d)

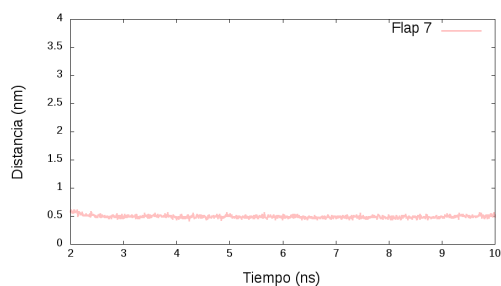


(e)

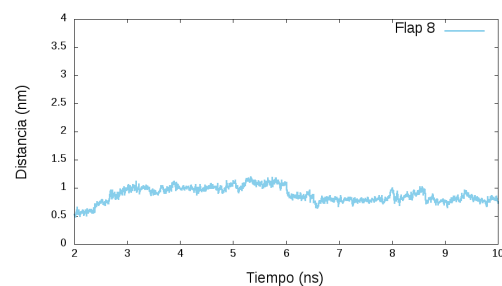


(f)

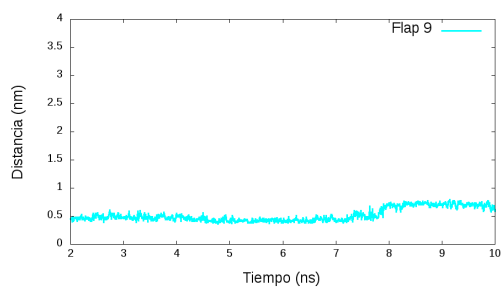
Figure B.3: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 3. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



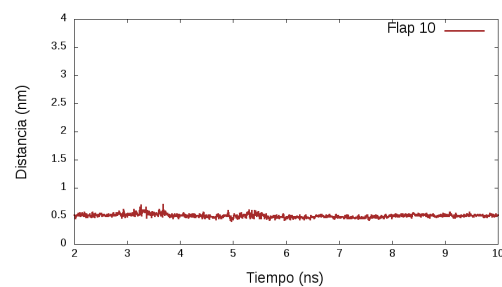
(a)



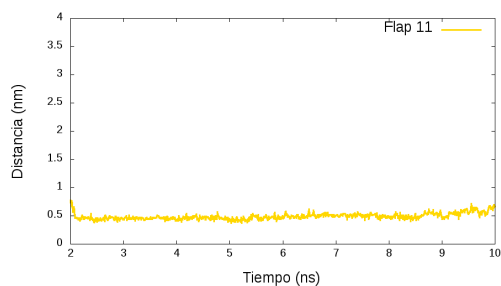
(b)



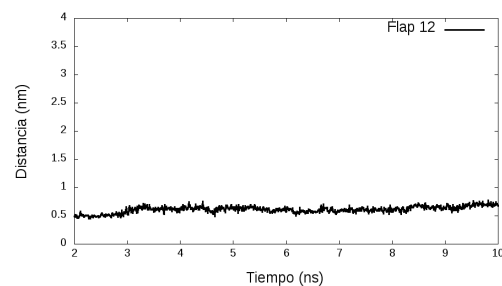
(c)



(d)

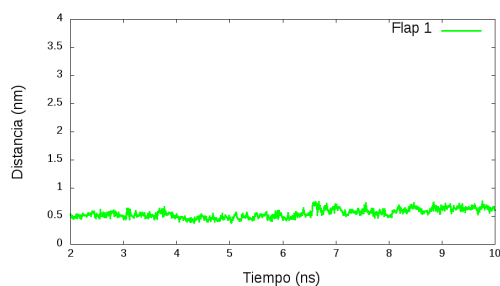


(e)

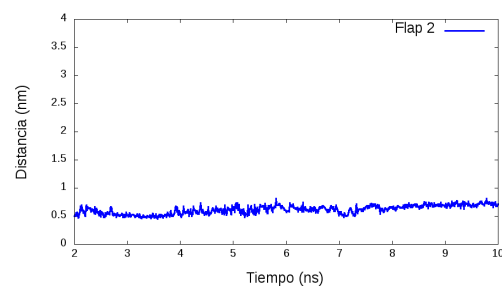


(f)

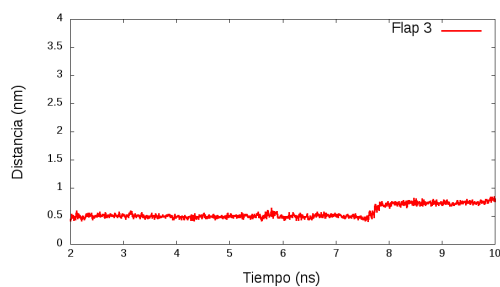
Figure B.4: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 3. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



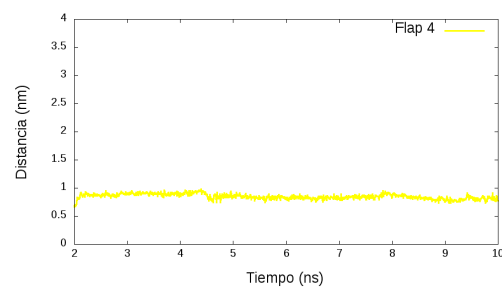
(a)



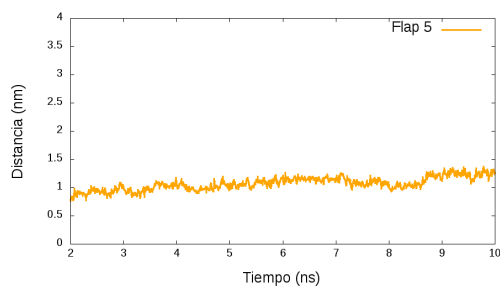
(b)



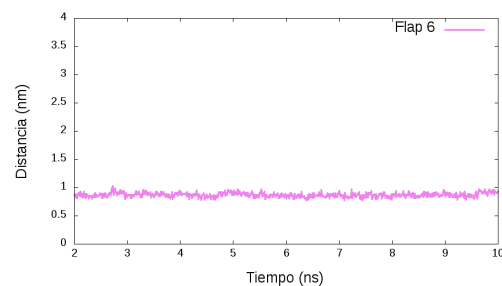
(c)



(d)

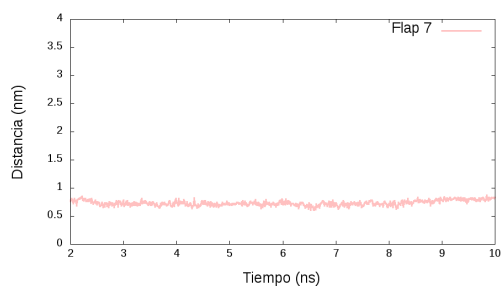


(e)

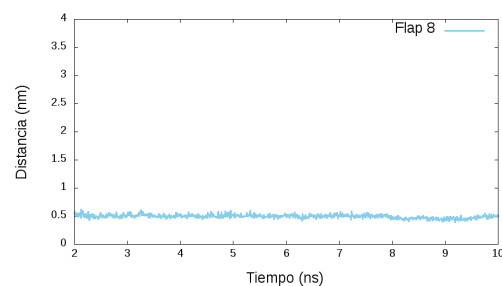


(f)

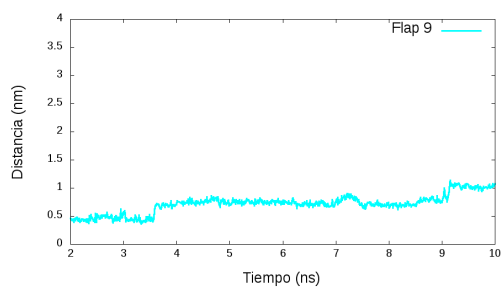
Figure B.5: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 4. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



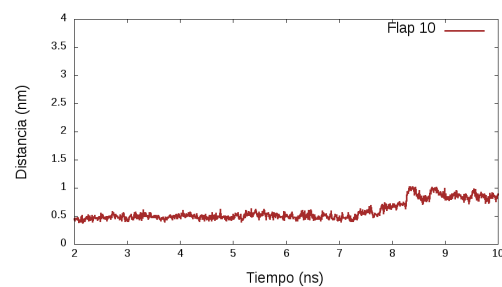
(a)



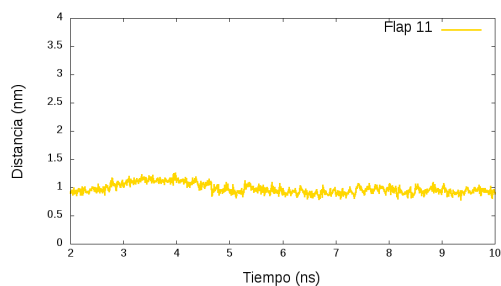
(b)



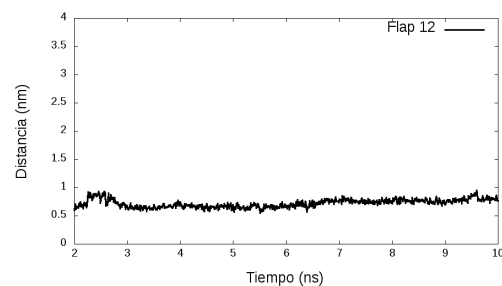
(c)



(d)

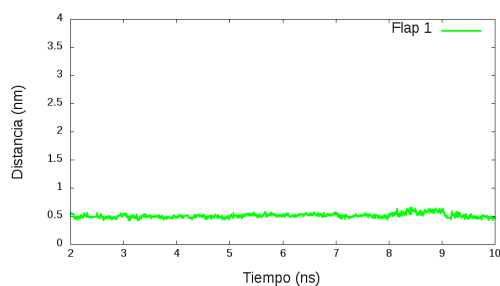


(e)

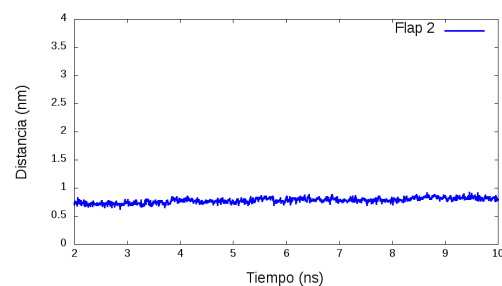


(f)

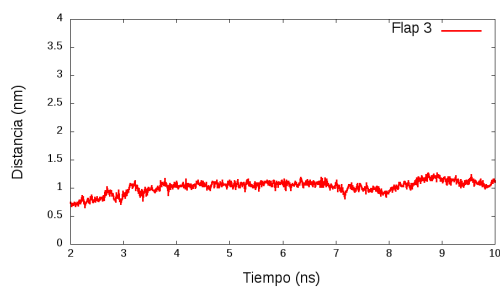
Figure B.6: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 4. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



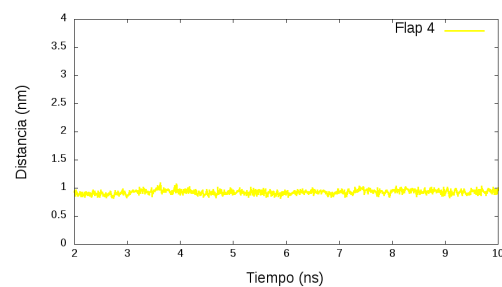
(a)



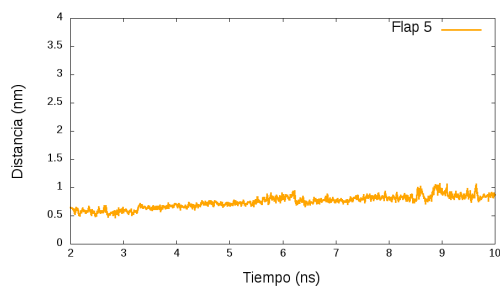
(b)



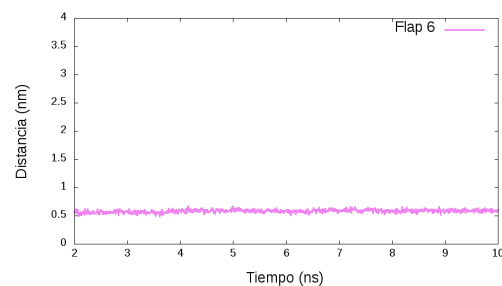
(c)



(d)

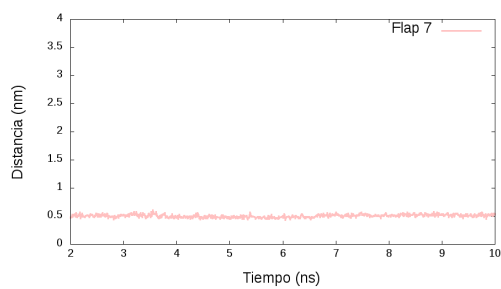


(e)

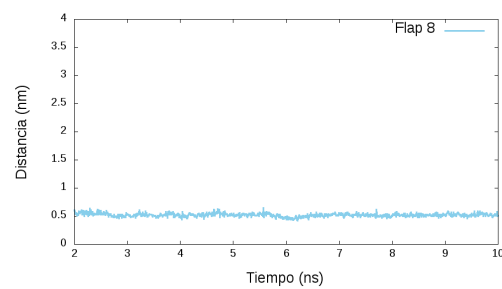


(f)

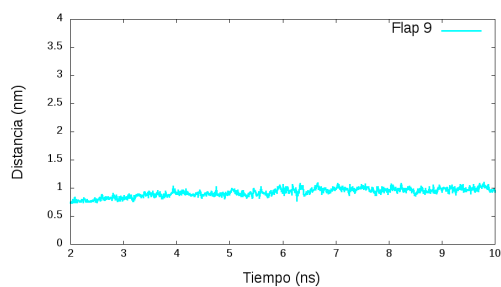
Figure B.7: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 5. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



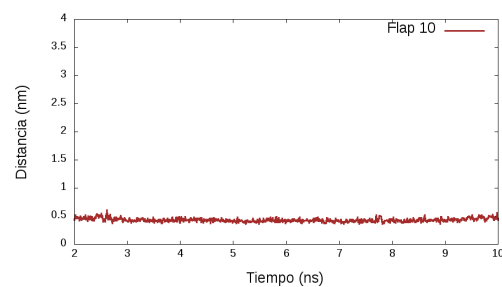
(a)



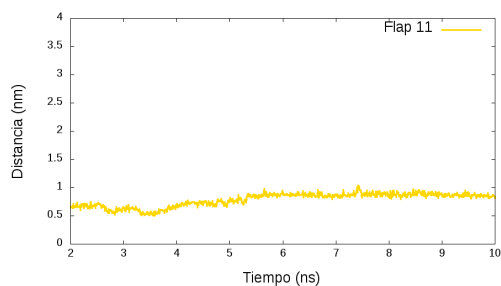
(b)



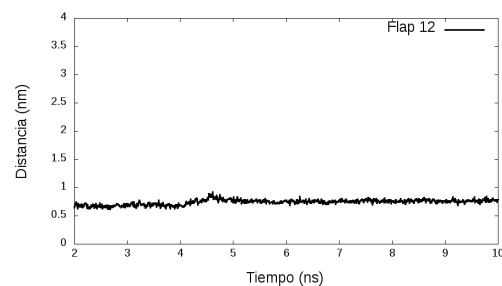
(c)



(d)

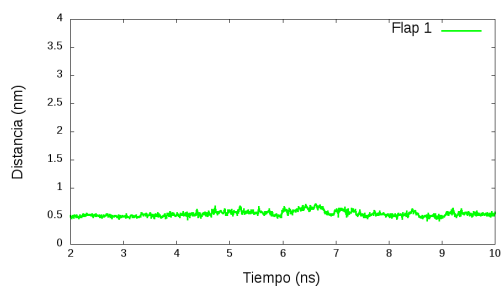


(e)

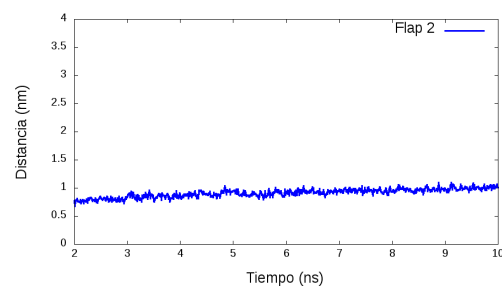


(f)

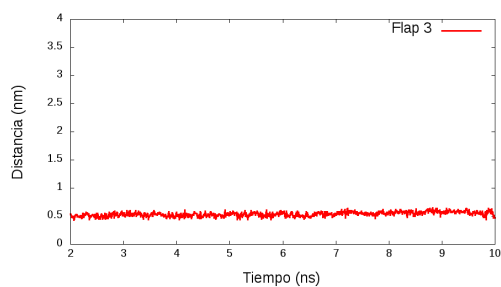
Figure B.8: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 5. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



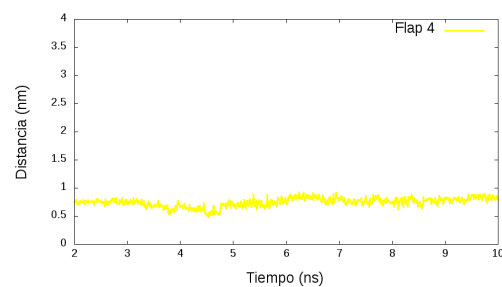
(a)



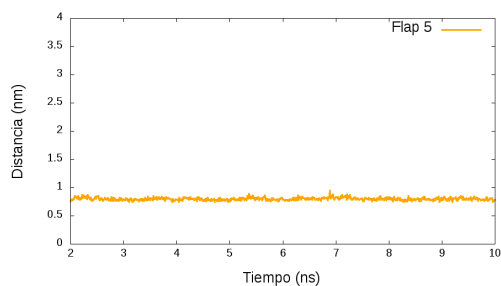
(b)



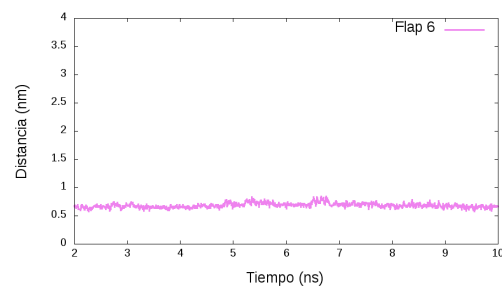
(c)



(d)

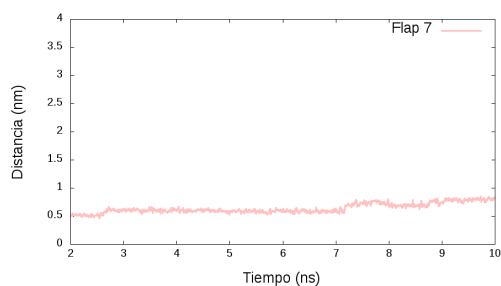


(e)

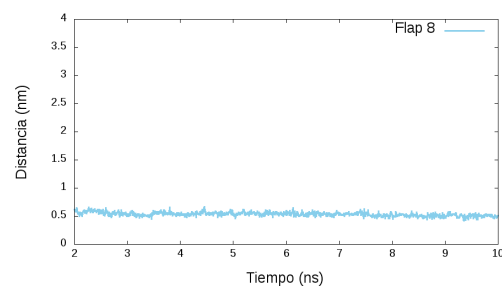


(f)

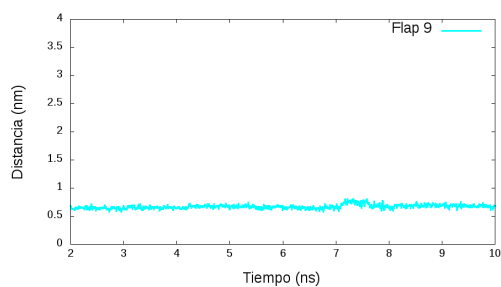
Figure B.9: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 6. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



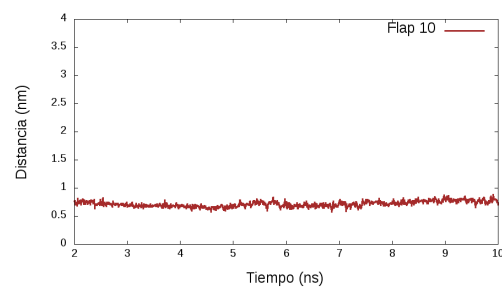
(a)



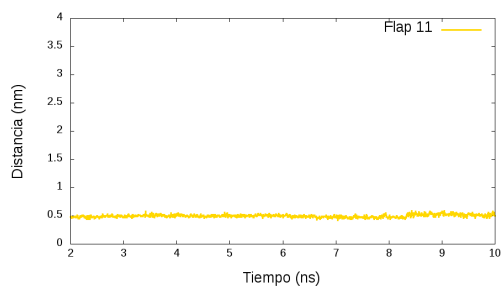
(b)



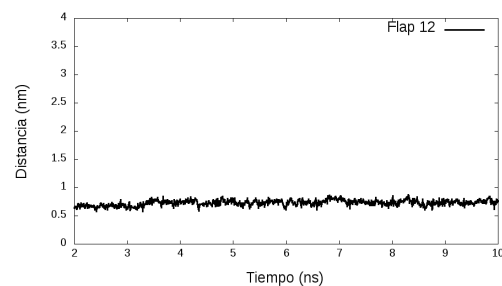
(c)



(d)

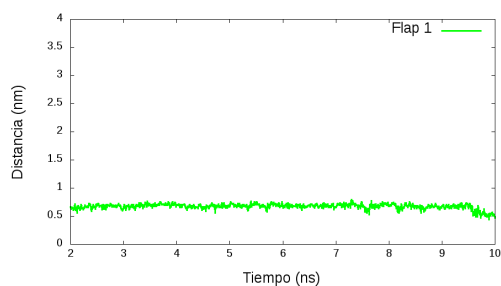


(e)

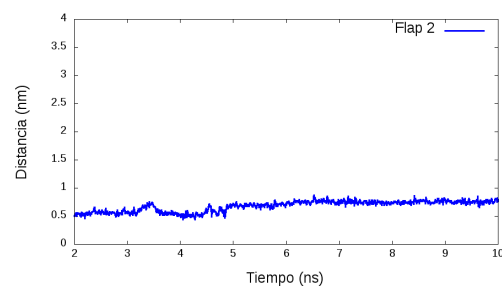


(f)

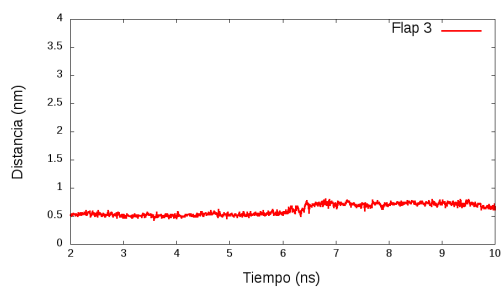
Figure B.10: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 6. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



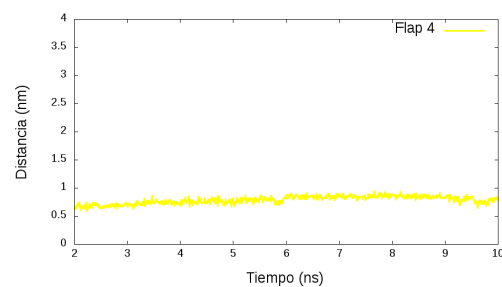
(a)



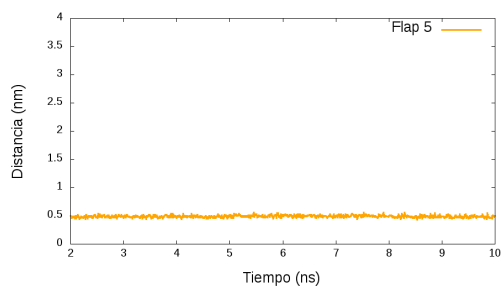
(b)



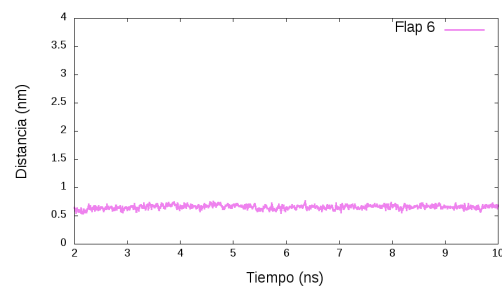
(c)



(d)

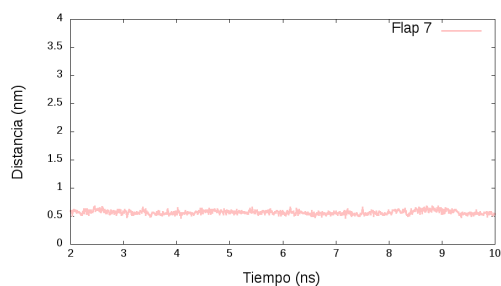


(e)

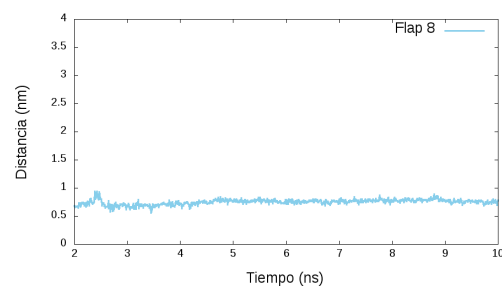


(f)

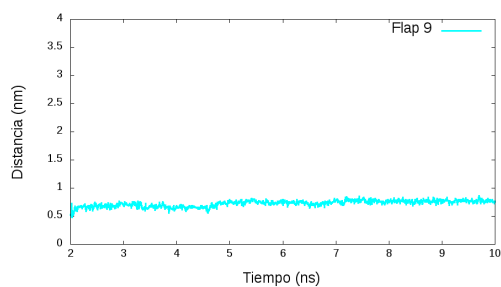
Figure B.11: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 7. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



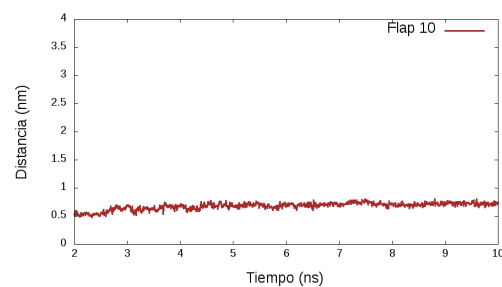
(a)



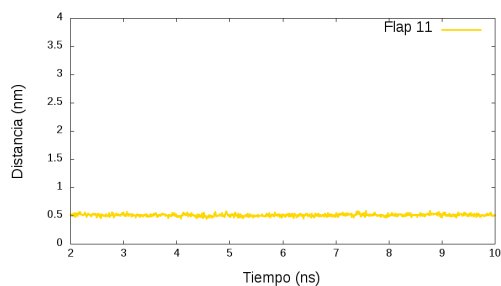
(b)



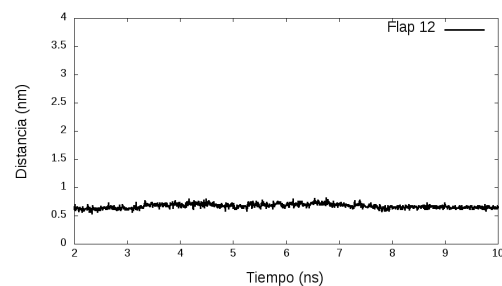
(c)



(d)



(e)

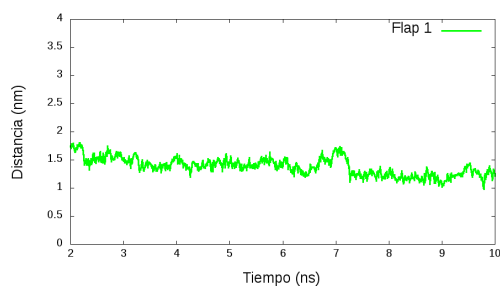


(f)

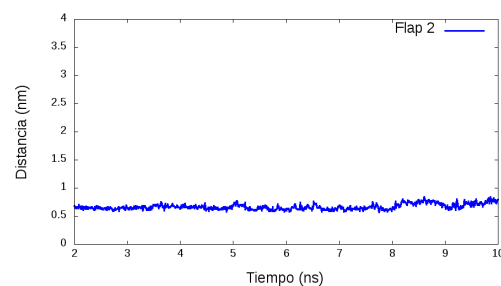
Figure B.12: Distancias críticas de α GLY47 y α HIS322 a pH 7. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.

Anexos C

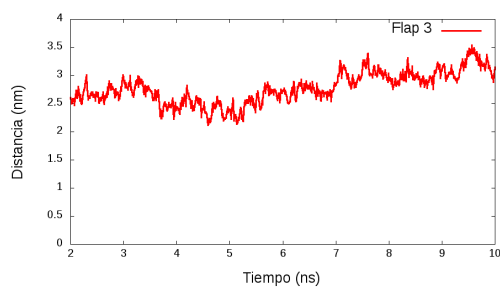
Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330



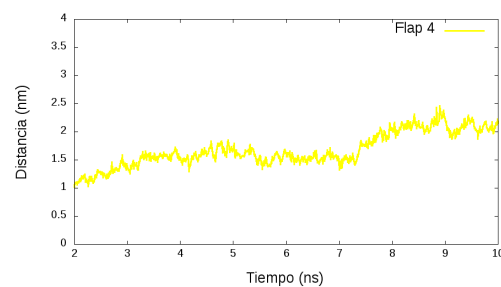
(a)



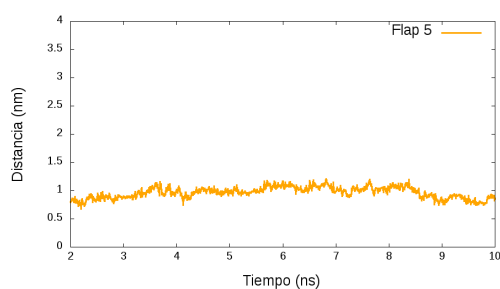
(b)



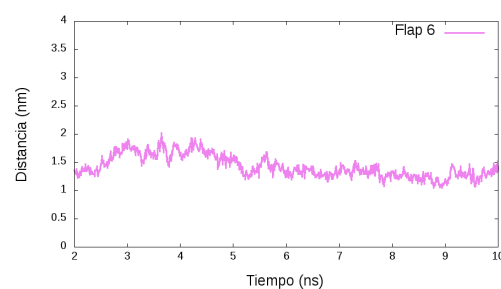
(c)



(d)

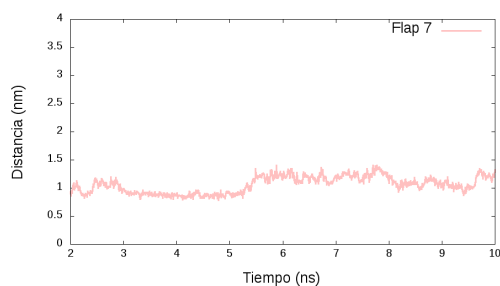


(e)

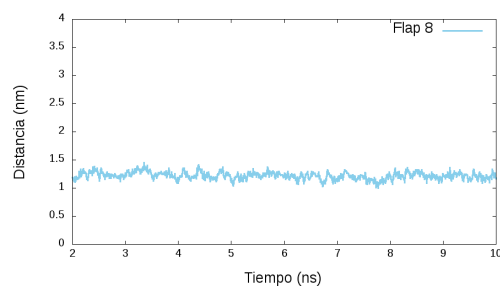


(f)

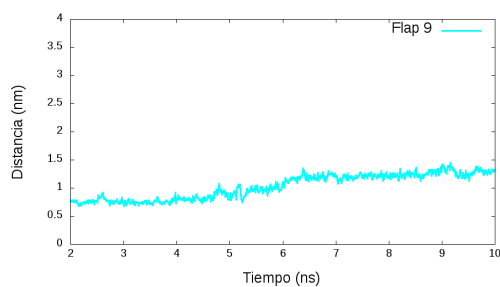
Figure C.1: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 2. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



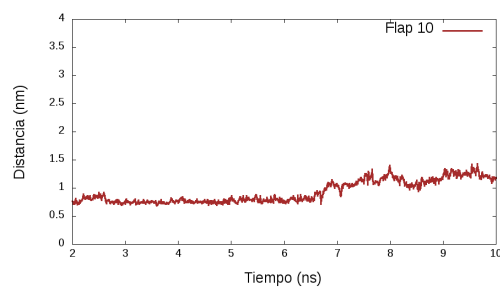
(a)



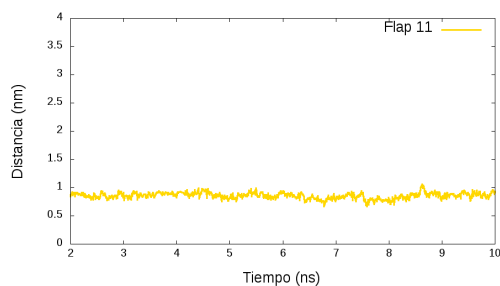
(b)



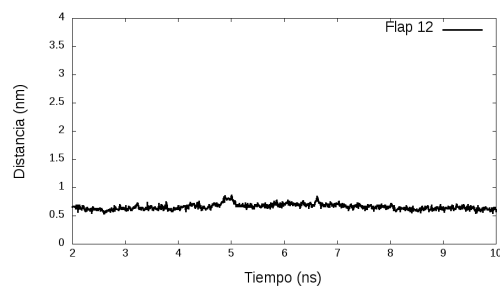
(c)



(d)

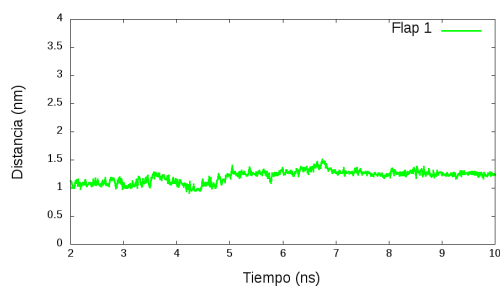


(e)

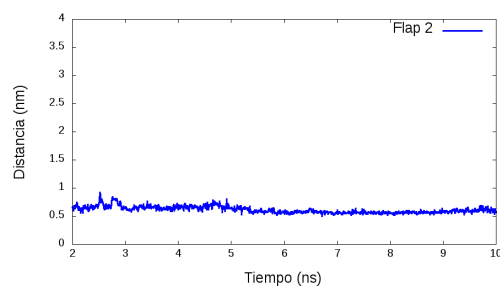


(f)

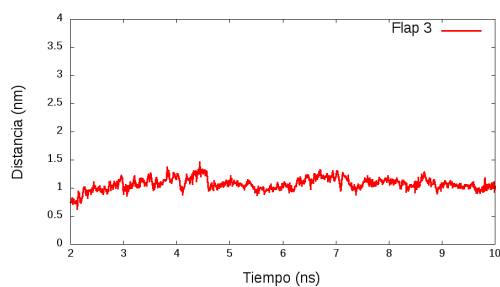
Figure C.2: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 2. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



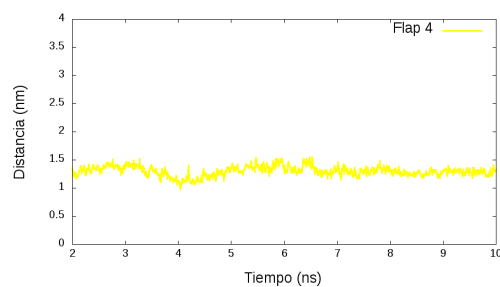
(a)



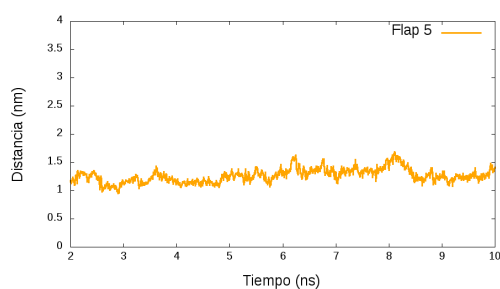
(b)



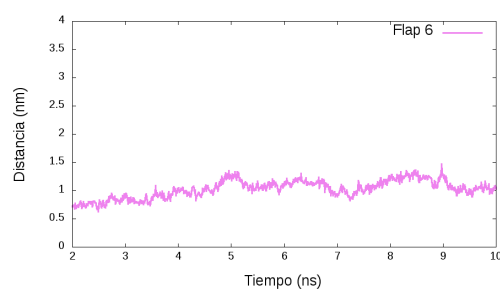
(c)



(d)

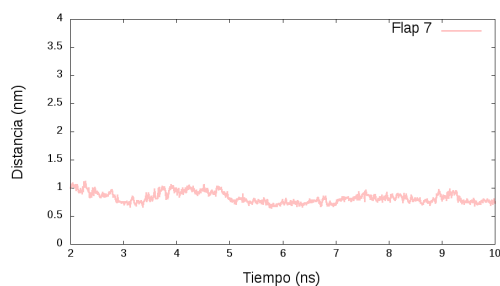


(e)

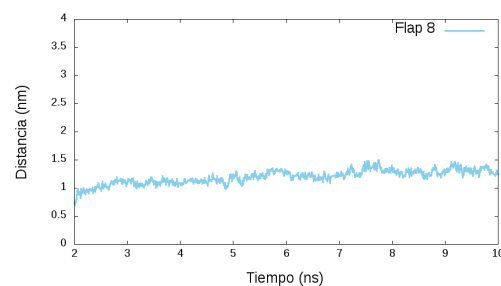


(f)

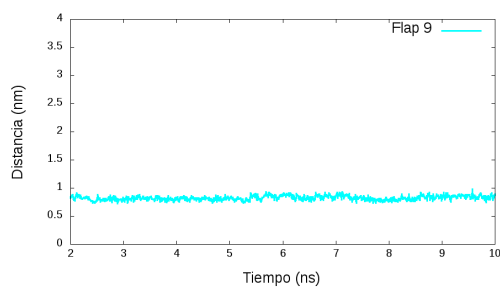
Figure C.3: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 3. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



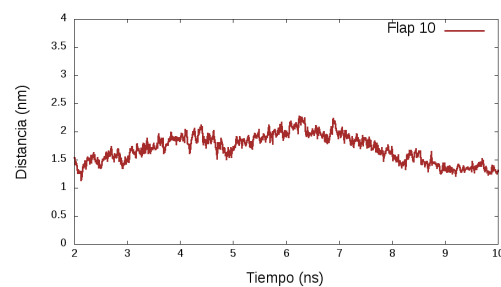
(a)



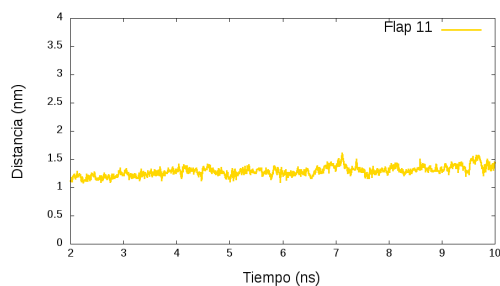
(b)



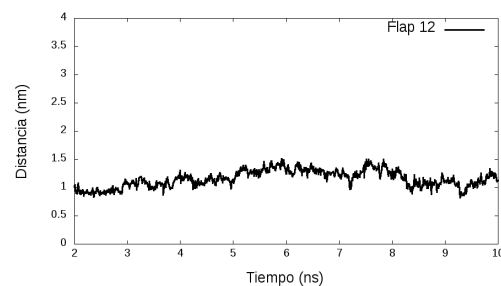
(c)



(d)

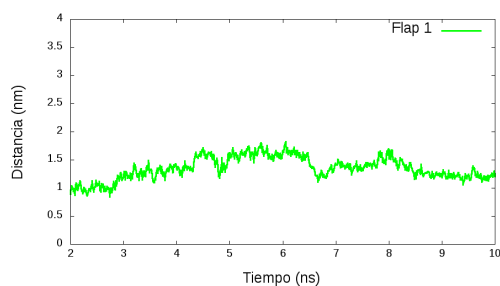


(e)

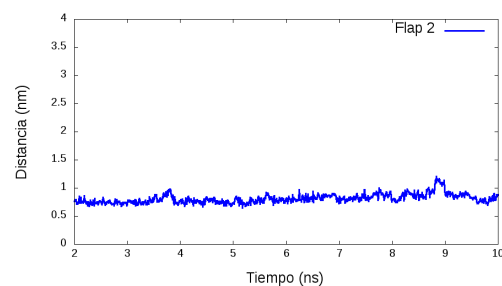


(f)

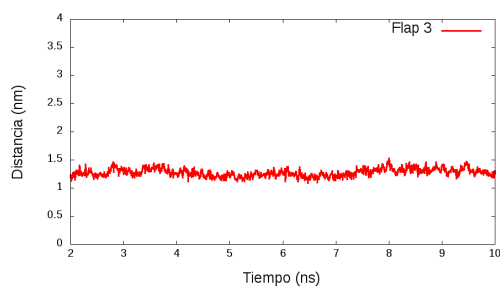
Figure C.4: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 3. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



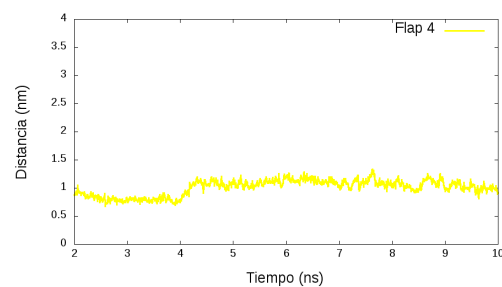
(a)



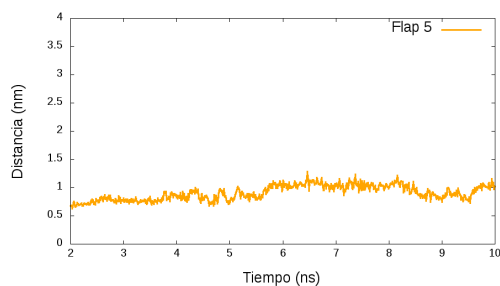
(b)



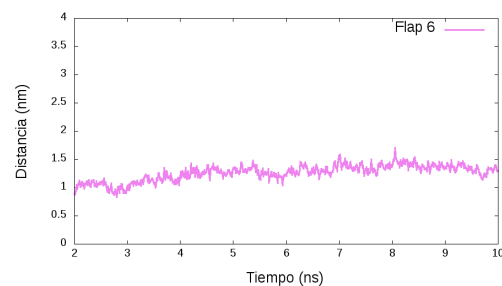
(c)



(d)

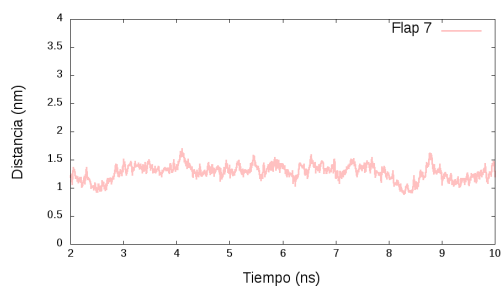


(e)

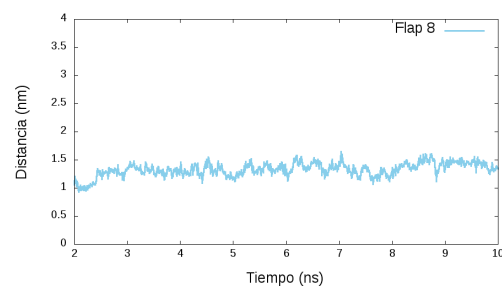


(f)

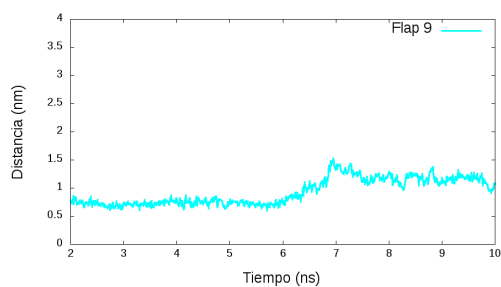
Figure C.5: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 4. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



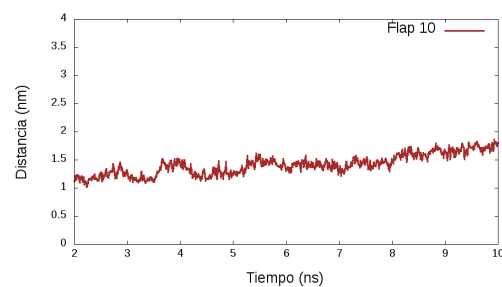
(a)



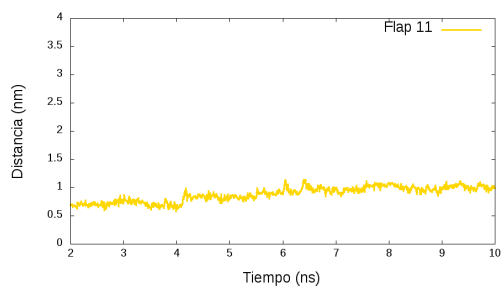
(b)



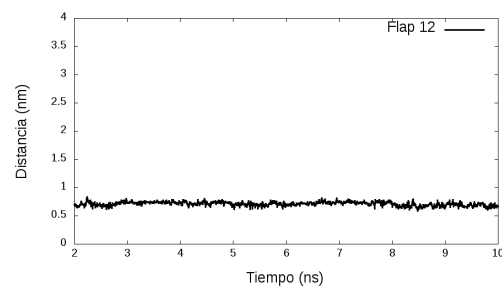
(c)



(d)

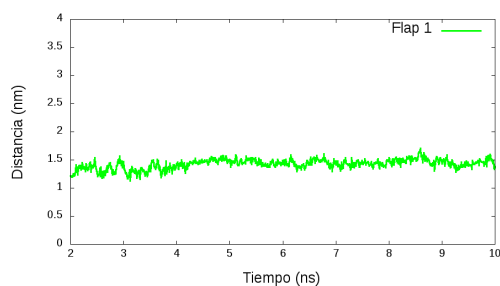


(e)

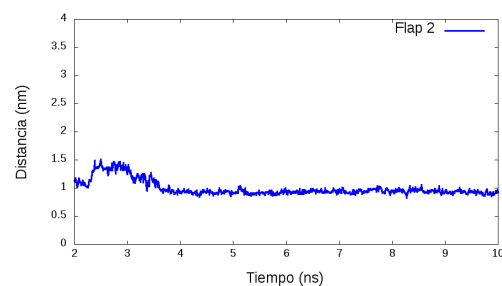


(f)

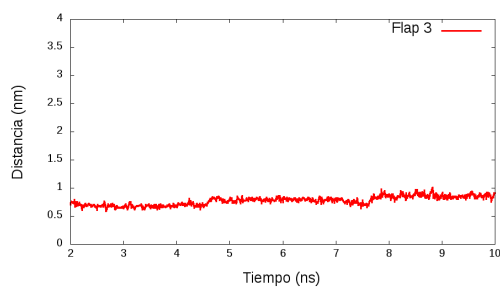
Figure C.6: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 4. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



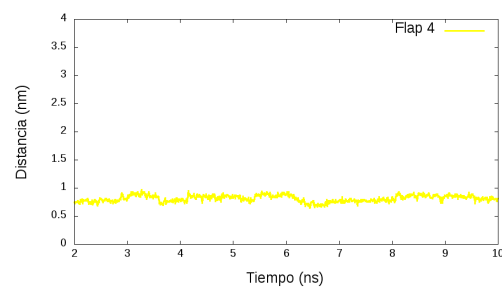
(a)



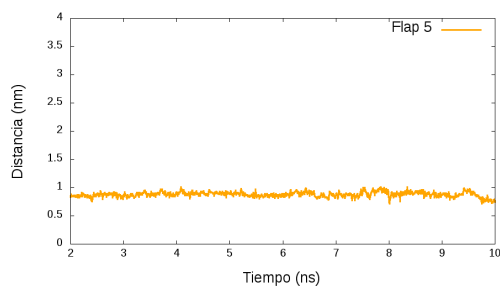
(b)



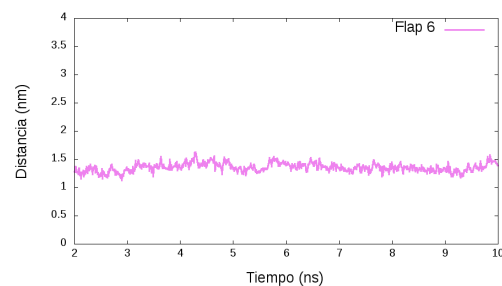
(c)



(d)

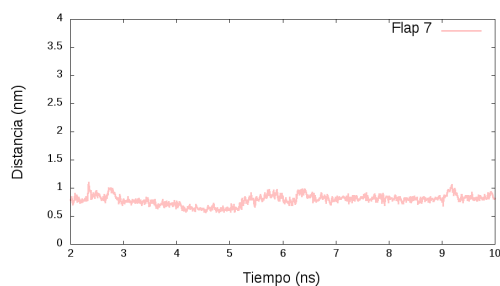


(e)

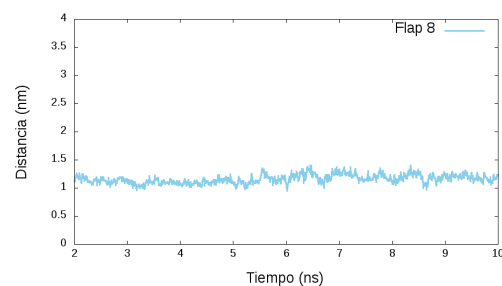


(f)

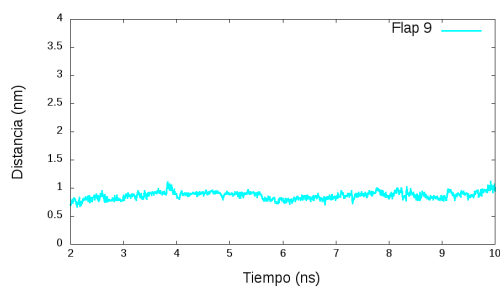
Figure C.7: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 5. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



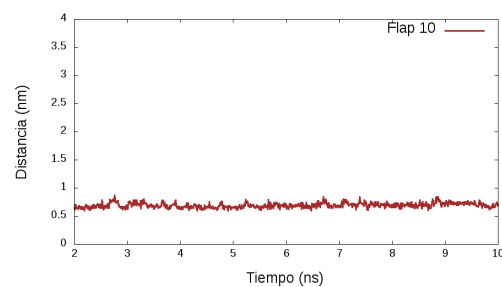
(a)



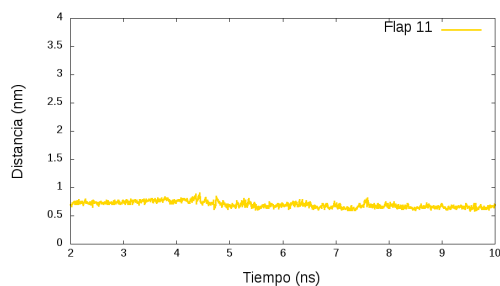
(b)



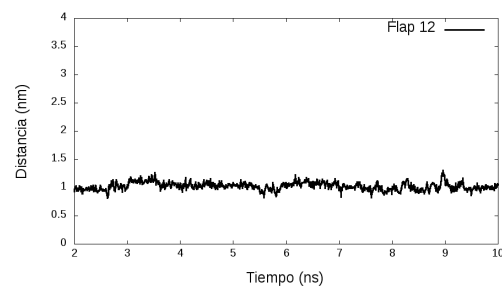
(c)



(d)

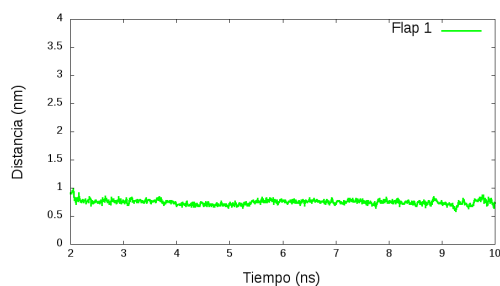


(e)

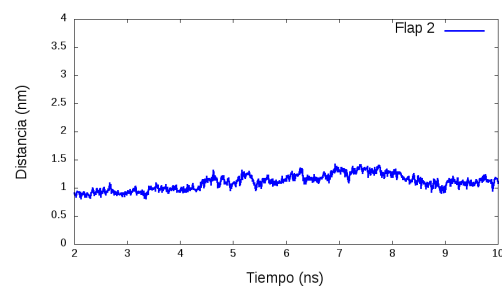


(f)

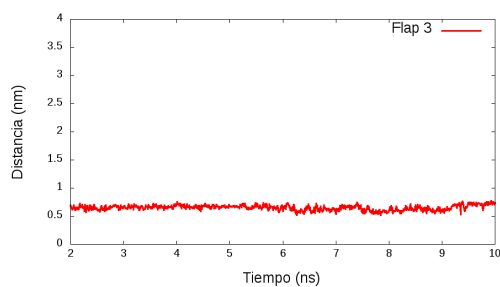
Figure C.8: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 5. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



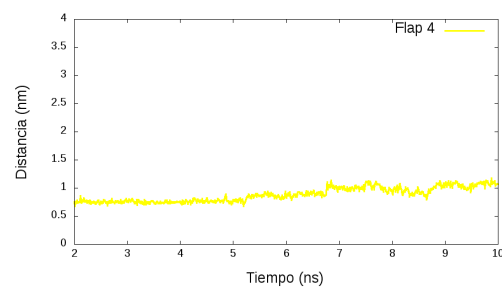
(a)



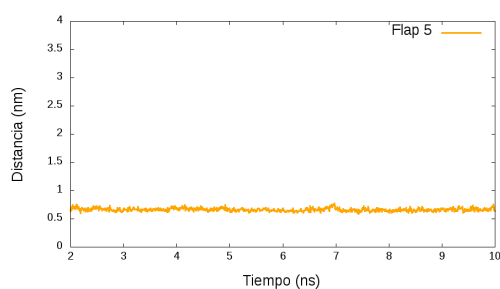
(b)



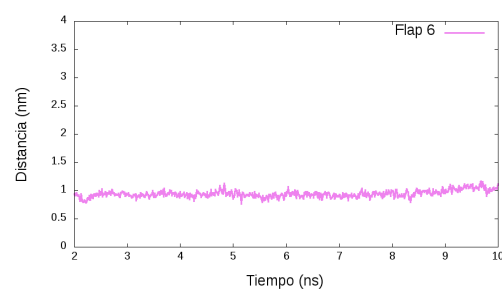
(c)



(d)

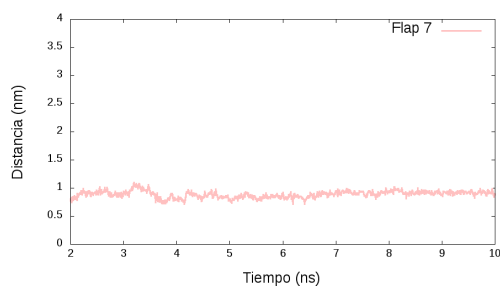


(e)

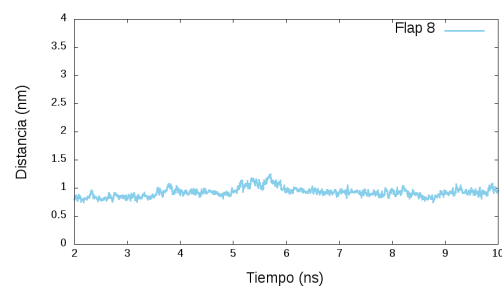


(f)

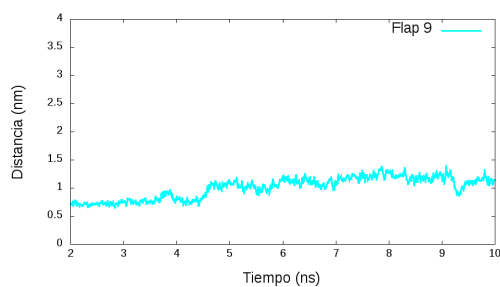
Figure C.9: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 6. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



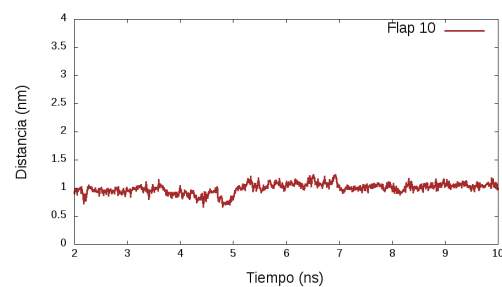
(a)



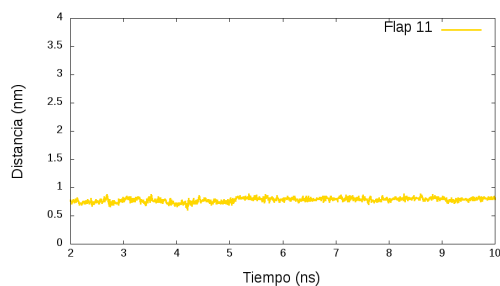
(b)



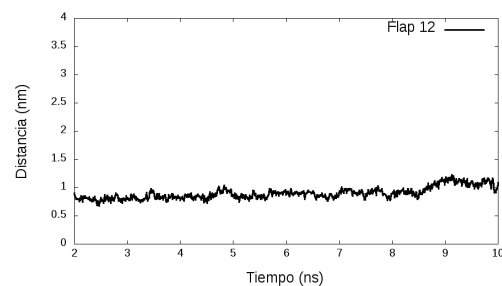
(c)



(d)

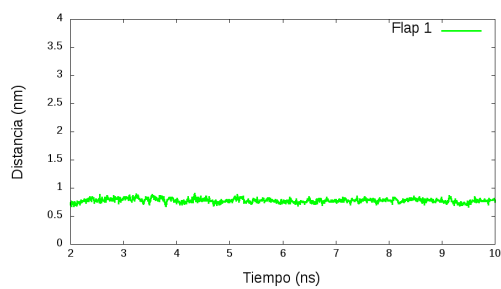


(e)

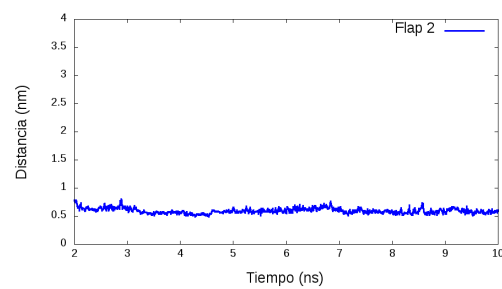


(f)

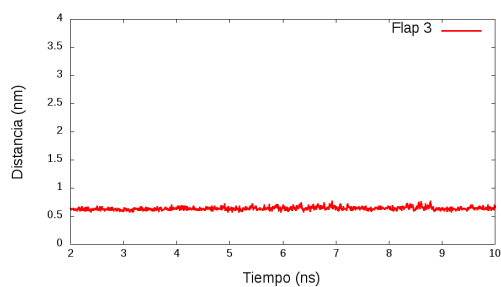
Figure C.10: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 6. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.



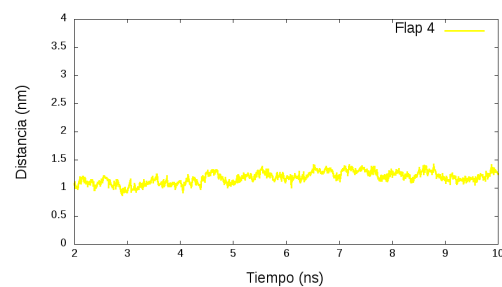
(a)



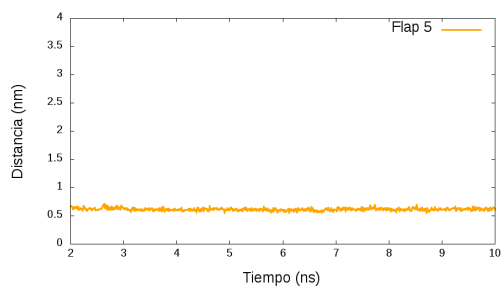
(b)



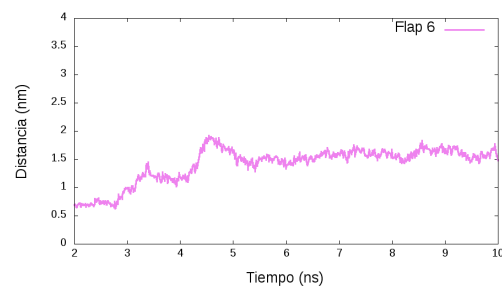
(c)



(d)

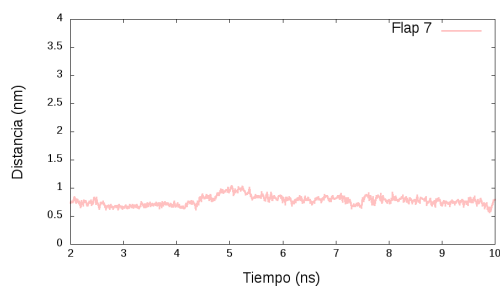


(e)

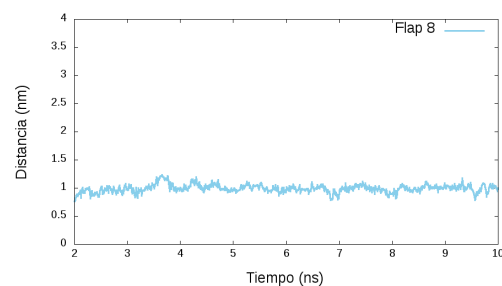


(f)

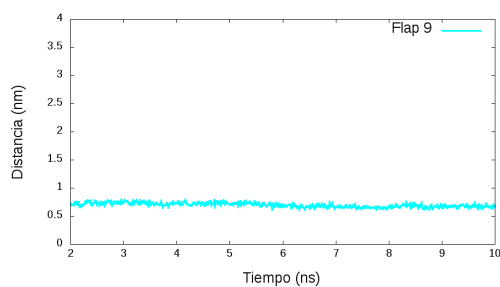
Figure C.11: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 7. (a) Flap 1. (b) Flap 2. (c) Flap 3. (d) Flap 4. (e) Flap 5. (f) Flap 6.



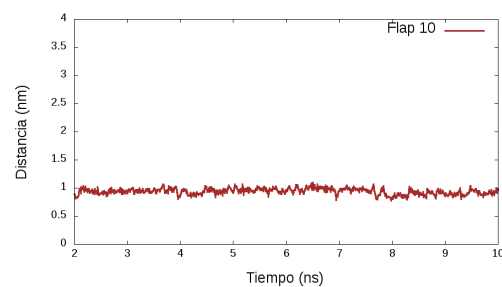
(a)



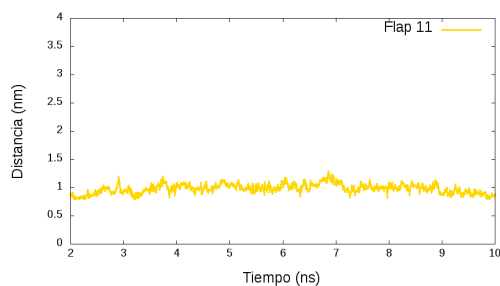
(b)



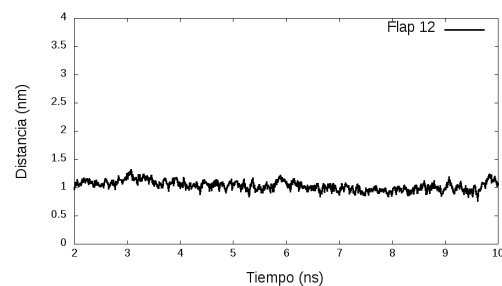
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure C.12: Distancias críticas de β ALA173 con α GLU330 a pH 7. (a) Flap 7. (b) Flap 8. (c) Flap 9. (d) Flap 10. (e) Flap 11. (f) Flap 12.

Anexos D

Predicción de acoplamiento en PatchDock

Tabla D.1: Predicción de acoplamiento dímero α/β con úrea.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1258	-1.14	128.6	-29.34	-2.41	1.14	2.54	128.19	129.77	86.00
2	1252	-1.25	144	-4.56	1.46	0.83	1.60	126.34	132.67	88.27
3	1240	-1.15	129.9	-28.21	-0.73	-0.56	-0.61	128.56	129.86	86.07
4	1236	-1.14	127.5	-34.61	-0.41	0.26	-2.67	128.07	129.56	85.70
5	1234	-0.76	131	-23.97	1.64	1.37	2.15	127.88	129.98	86.38
6	1226	-0.85	130.9	-31.5	-2.96	0.15	0.32	127.92	129.86	85.85
7	1222	-1.01	141.9	-5.13	1.92	-0.04	-0.14	126.78	131.91	88.03
8	1222	-1.23	126.4	-27.13	1.46	-0.95	-0.97	128.61	129.86	86.03
9	1208	-0.82	129.9	-27.9	-0.77	0.21	0.38	127.74	129.88	86.20
10	1206	-1.21	141.8	1.34	2.82	0.39	2.93	126.56	132.84	88.07
11	1196	-0.99	139.7	-8.18	-1.98	0.21	-2.22	126.87	131.84	88.00
12	1194	-1.21	141.4	1.68	-1.62	0.48	0.69	127.03	132.48	88.01
13	1190	-1.92	147.3	1.01	-2.07	0.11	1.25	126.04	133.91	88.49
14	1188	-1.12	145.5	-3.37	0.62	-0.62	0.60	126.34	133.03	87.48
15	1178	-0.96	126.2	-30.16	-2.60	-0.17	2.71	127.16	129.89	85.95
16	1160	-1.58	141.6	-8.6	-0.79	-0.44	-1.86	125.62	132.99	88.08
17	1156	-1.37	139.2	-3.97	3.06	-0.69	-0.61	126.11	133.19	88.05
18	1152	-1.28	121.7	-25.63	2.38	-0.11	0.68	127.27	129.97	87.03
19	1150	-1.32	127.4	-39.46	-0.91	-1.06	2.60	127.84	130.05	84.88
20	1144	-1.11	125	-21.36	-1.17	-0.34	-1.11	127.13	129.99	86.45
21	1138	-0.9	140	-9.48	-2.94	-0.67	0.94	125.96	133.17	86.92
22	1128	-1.3	140.1	-0.07	0.65	0.45	-0.74	126.89	133.17	87.45
23	1118	-1.47	117.2	-27.27	0.80	0.21	3.03	126.65	129.68	86.72
24	1116	-1.2	124.4	-7.13	-1.49	0.76	2.29	141.16	124.84	73.84
25	1112	-1.19	120.5	-11.78	0.72	0.61	-2.39	128.17	130.66	87.02
26	1112	-1.1	116.8	-26.38	-0.53	-0.23	0.65	138.63	120.89	68.99
27	1110	-1.28	132	-11.24	0.37	1.30	3.05	125.25	132.98	87.01
28	1110	-0.95	131.2	-5.4	-2.47	0.02	-0.73	127.01	132.57	87.12
29	1110	-1.15	118.9	-8.32	-2.56	-0.92	-2.13	141.50	124.87	73.65
30	1108	-1.25	133.4	-10.75	0.70	-0.41	-1.75	125.81	132.96	86.98

Tabla D.2: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ácido acetohidroxámico.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1540	-1.01	165.9	-10.37	3.02	-0.47	1.30	128.29	131.52	87.01
2	1528	-1.06	172.1	-23.82	0.43	-0.03	-2.23	127.39	130.49	85.97
3	1520	-1.28	167.3	-22.17	-1.28	0.59	-0.78	127.55	130.64	85.93
4	1490	-1.53	163.4	-15.07	2.90	0.92	0.51	127.14	130.47	87.04
5	1450	-1.38	171.9	-3.74	1.14	0.59	-2.63	127.34	131.22	87.25
6	1398	-1.15	149.2	-8.34	2.84	-0.61	0.50	139.06	121.58	70.14
7	1368	-1.19	138.6	-20.31	-2.89	-0.88	2.93	110.53	100.01	89.83
8	1366	-1	138.5	-27.75	-0.83	-0.44	-2.68	137.97	121.32	67.72
9	1364	-1.27	142.5	-27.44	2.72	0.91	1.50	138.24	120.55	69.55
10	1350	-0.8	158.8	-20.67	-1.14	-1.00	0.51	126.37	131.37	85.99
11	1350	-1.5	139.3	-21.62	1.13	-1.26	-1.47	138.39	120.38	68.89
12	1348	-1.07	138.4	9.76	2.28	0.84	1.58	114.75	109.38	67.88
13	1336	-1.32	149.2	-20.03	2.32	0.60	1.41	117.70	114.02	70.33
14	1328	-1	138.7	-16.34	-0.17	0.95	-1.89	137.80	120.20	68.70
15	1326	-1.08	143.8	-0.11	0.36	0.95	-2.14	141.23	125.23	73.80
16	1320	-1.24	138.9	-9.75	1.18	0.23	2.55	138.23	121.42	70.59
17	1320	-1.74	150.4	-21.32	0.02	-0.25	2.41	138.01	120.72	69.17
18	1318	-1.31	139.7	-21.79	-0.56	-1.33	-2.87	139.14	121.73	68.37
19	1304	-1.31	142.2	-17.83	-2.66	-0.05	-0.82	137.83	121.21	69.34
20	1304	-1.29	145.9	-19.22	1.19	-0.05	-2.51	117.99	113.74	70.05
21	1304	-1.67	142	-34.88	0.42	0.87	-0.42	111.77	100.20	90.31
22	1302	-0.81	141.9	-14.6	-0.50	-0.30	-1.06	138.29	121.70	68.98
23	1298	-1.17	137.6	-29.06	0.61	1.04	-2.97	134.69	117.35	69.77
24	1294	-1.02	151.4	-15.73	1.69	0.34	-1.68	127.12	131.66	86.18
25	1292	-1.35	141.7	-36.61	-2.29	0.47	0.55	139.33	123.57	67.15
26	1290	-1.54	148.6	-34.27	2.46	-1.39	-1.20	127.02	130.31	85.10
27	1290	-1.79	147.3	-1.56	2.20	0.12	0.70	138.07	122.27	70.39
28	1288	-1.28	136.1	-0.65	0.58	0.23	-2.11	106.56	107.02	77.22
29	1286	-1.18	132.4	-14.7	0.79	0.12	-3.12	136.85	119.40	68.84
30	1278	-1.29	129.2	-13.18	-2.75	0.48	-1.95	111.29	99.65	90.19

Tabla D.3: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC01611325.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	2176	-1.26	236.4	-10.86	0.59	-0.48	-1.15	125.86	130.80	86.54
2	2138	-1.34	243	-17.84	0.42	0.85	2.39	127.81	132.25	86.67
3	2074	-1.94	243.2	-18.17	-2.15	0.62	1.91	126.26	131.22	88.30
4	2024	-1.92	247	-7.58	1.19	0.43	1.84	127.33	132.71	85.92
5	1958	-1.47	228.7	-6.3	1.71	-0.36	-0.60	127.01	132.58	85.80
6	1890	-1.38	215.9	-30.7	-0.31	1.52	-2.74	127.58	133.04	85.63
7	1886	-1.48	207.5	-62.69	1.44	-0.11	2.18	121.41	95.56	72.66
8	1874	-1.34	209.4	-30.38	2.64	0.08	-0.91	127.59	131.72	85.26
9	1814	-1.58	198.1	2.62	0.13	0.44	1.80	141.97	127.20	74.31
10	1788	-1.22	188.2	-17.8	1.21	0.69	0.84	139.62	121.64	69.08
11	1760	-1.99	211.6	-49.16	2.33	-1.01	0.99	126.97	131.57	84.00
12	1728	-0.94	183.3	-37.33	1.08	-0.52	-2.13	134.06	117.90	68.07
13	1684	-1.45	186.3	-42.39	1.87	0.75	0.67	135.12	118.13	68.70
14	1648	-2.61	212.2	7.58	1.07	0.42	1.55	127.67	133.68	87.14
15	1614	-2.37	208.8	-29.58	-0.02	0.81	-2.25	126.32	131.46	86.48
16	1608	-2.38	204	-16.68	1.31	0.00	-1.85	127.92	131.69	85.57
17	1606	-1.99	195.1	-6.43	1.11	0.74	2.05	125.89	134.11	86.63
18	1604	-1.9	188.9	-45.38	0.71	-1.17	0.88	127.37	129.87	84.00
19	1594	-1.34	170.8	-36.23	2.87	-0.28	0.38	133.73	118.03	68.10
20	1554	-1.23	177.2	9.16	1.16	-0.42	-2.22	140.06	125.86	72.27
21	1546	-2.32	199.9	-30.88	2.56	0.90	0.99	127.85	131.88	85.89
22	1528	-1.27	166	-41.05	2.75	-0.04	1.62	120.02	94.40	73.31
23	1524	-2.38	201.6	-20.34	2.54	-0.33	1.15	126.16	132.54	85.69
24	1514	-2.56	179.5	-31.61	1.62	0.87	2.21	134.05	119.21	69.57
25	1514	-1.99	188.8	-18.87	0.74	-0.17	0.38	142.73	124.95	72.86
26	1506	-1.85	167.1	-11.75	2.02	0.42	2.78	140.60	127.66	73.46
27	1484	-0.97	163.2	-45.01	2.93	0.17	0.09	132.92	118.49	68.88
28	1484	-1.87	170.4	-5	1.08	0.28	0.71	141.39	123.63	70.45
29	1468	-1.25	156.6	-22.33	-1.76	-0.38	-0.47	114.79	98.06	81.13
30	1462	-1.23	153.2	-31.66	1.77	0.44	1.29	133.04	118.11	67.98

Tabla D.4: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC04701037.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1726	-1.33	189.8	-10.57	-0.06	0.54	1.45	128.78	131.36	87.52
2	1716	-0.76	197	-20.45	0.55	-0.53	-1.53	125.64	131.37	86.20
3	1688	-1.28	192.8	-38.89	-1.32	-0.93	1.28	128.68	132.15	86.55
4	1660	-1.26	175.2	-14.89	-2.75	0.56	2.99	127.33	130.23	87.40
5	1622	-1.35	173.8	-35.34	-3.01	0.31	2.36	125.62	129.71	86.52
6	1620	-1.18	188	-6.59	0.89	-0.31	-0.67	126.20	131.57	86.37
7	1616	-1.35	178.6	-26.27	-1.40	-0.77	-1.53	127.84	129.62	87.01
8	1614	-1.7	196.7	-43.01	3.01	-0.31	1.65	126.23	131.91	85.12
9	1600	-1.7	188.6	-3.8	-2.34	-0.57	-0.84	127.82	131.99	88.57
10	1598	-1.05	174.9	-34.63	-2.48	0.33	-1.20	129.00	131.81	86.35
11	1560	-1.78	171.8	-35.74	0.07	-1.07	-0.83	125.95	129.26	86.36
12	1552	-1.28	166.9	-15.04	-1.87	-0.52	0.25	119.20	113.86	70.39
13	1542	-1.74	176.2	-33.38	2.84	0.71	-2.05	129.17	130.00	85.68
14	1532	-1.51	161.6	-25.4	0.84	-0.06	-2.74	116.99	114.06	69.02
15	1528	-1.09	178.7	-33.52	2.57	-0.09	-1.01	127.64	131.76	84.87
16	1522	-2.32	170.9	-46.28	1.99	0.08	3.04	126.47	129.61	84.37
17	1504	-1.48	169	-63.46	-1.11	0.38	2.15	122.58	95.22	74.35
18	1492	-1.02	159.9	-44.55	-2.24	0.17	1.68	117.59	115.25	71.35
19	1490	-1.17	171.8	-26.66	-2.09	0.06	2.99	126.41	131.65	86.94
20	1488	-1.44	166	-66.24	1.07	-0.90	2.24	120.28	97.27	72.12
21	1484	-1.43	160.9	-18.88	-1.93	0.62	-2.89	119.05	112.94	70.94
22	1480	-1.38	170.3	-53.42	-0.35	-0.54	1.28	128.48	131.61	84.19
23	1458	-1.07	155.6	-47.29	1.04	0.30	0.38	134.45	115.99	67.82
24	1452	-1.75	162.1	-53.01	1.43	0.81	1.82	122.62	94.59	71.71
25	1446	-1.17	161.7	-61.98	2.33	0.23	-0.81	121.55	96.47	73.20
26	1444	-1.42	155.5	-56.8	-2.62	-0.86	-0.85	123.71	94.05	73.51
27	1444	-1.16	157.5	-31.86	-2.18	0.49	1.41	116.85	113.63	71.32
28	1432	-1.89	170.9	-51.59	-0.95	-1.21	-0.36	123.67	92.33	72.01
29	1430	-0.95	155.5	-60.47	2.84	-0.24	-0.70	122.71	95.37	73.68
30	1430	-1.28	149.4	-11.03	1.52	-1.08	2.21	120.74	94.95	78.72

Tabla D.5: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC05298729.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1944	-1.26	213.6	-9.33	-0.61	-0.55	-2.25	125.27	133.10	89.94
2	1918	-1.43	203.1	-28.42	2.44	0.66	3.02	127.41	128.00	83.94
3	1880	-1.3	228.5	-13.92	1.17	-0.66	1.63	128.61	128.56	85.39
4	1836	-1.76	208.7	-35.83	0.71	0.51	0.37	127.32	128.15	83.62
5	1786	-1.41	195.8	-32.7	3.04	0.49	-0.78	128.56	134.82	84.92
6	1748	-1.2	202.9	-17.91	-1.11	-0.62	2.90	126.79	132.66	89.67
7	1716	-1.55	196.4	-21.04	-1.31	-0.58	-1.22	127.05	130.17	90.05
8	1706	-1.55	190.5	-32.77	1.73	-0.12	2.99	129.08	130.49	83.31
9	1688	-1.17	197.2	-42.61	1.01	0.76	1.71	128.64	132.97	81.66
10	1636	-1.79	188.5	-51.06	1.81	0.53	-0.30	127.79	130.91	81.26
11	1634	-1.57	203.8	-15.23	-0.30	0.86	1.55	129.47	129.96	86.72
12	1632	-2.07	200.8	-2.92	2.24	-0.34	2.87	128.36	130.17	85.68
13	1632	-1.74	178.6	-36.78	-0.48	0.64	1.98	130.55	129.97	85.84
14	1630	-1.98	207.4	-37.11	1.61	0.22	1.92	127.81	130.17	81.82
15	1610	-2.35	203.2	-41.4	-0.46	-0.16	-0.04	125.11	127.72	87.52
16	1590	-2.4	184.7	-49.18	0.26	0.12	-0.42	124.31	128.09	84.36
17	1588	-0.94	170	-43.34	-0.99	0.06	3.05	135.47	118.03	71.51
18	1582	-1.39	184.9	-14.45	-0.46	-0.26	1.16	128.98	129.70	88.00
19	1574	-1.72	185.9	-26.54	-1.63	-0.63	-1.59	128.44	131.10	89.04
20	1570	-1.92	192.3	-26.01	1.45	-1.40	0.64	125.44	128.43	87.38
21	1544	-1.87	166.5	-64	0.70	-0.30	0.83	145.34	124.57	70.46
22	1538	-1.85	188.7	-34.54	0.13	-0.01	0.80	128.06	128.90	84.67
23	1528	-1.06	164.4	-26.9	-0.82	0.22	-2.94	137.25	120.70	71.24
24	1524	-1.38	180.8	-30.43	0.13	0.55	1.32	128.68	130.20	84.81
25	1492	-1.94	158.8	-6.81	1.25	-0.04	1.31	107.34	105.11	74.07
26	1486	-1.5	160.9	-41.17	2.28	-0.65	-2.29	138.99	118.73	69.09
27	1482	-2.01	203.5	-20.75	2.44	1.05	-0.39	127.90	134.78	84.58
28	1482	-1.21	167.8	-57.19	-0.09	1.09	1.65	128.93	131.52	81.40
29	1452	-0.87	156.8	-12.29	-1.15	0.82	-2.80	140.00	122.75	69.76
30	1442	-1.92	161.4	0.41	-0.29	-0.11	-1.22	136.84	129.98	75.68

Tabla D.6: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC08034818.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1380	-1	153.9	-23.2	1.49	0.02	0.20	128.51	131.68	84.77
2	1320	-1.01	141.4	-16.62	-0.56	1.08	-2.34	116.42	114.08	70.57
3	1276	-1.06	131.3	-23.67	-2.07	0.82	-1.43	137.62	121.24	70.55
4	1266	-1.15	148.8	-37.7	1.73	0.27	0.66	127.55	132.62	83.48
5	1254	-0.86	146	-7.51	-0.39	-0.07	-2.60	125.15	133.27	86.23
6	1248	-1.13	132.8	-6.21	2.40	0.50	0.04	142.15	127.33	73.99
7	1242	-1.6	138.4	-14.27	0.82	-0.12	-0.69	137.94	120.35	68.14
8	1240	-0.87	140.6	-27.47	-0.80	-0.91	-1.56	126.23	130.12	85.29
9	1230	-0.95	132	-18.53	2.39	-0.71	2.62	116.51	111.70	69.21
10	1224	-1.24	128.7	-30.89	2.30	-0.88	2.61	132.23	114.56	67.35
11	1216	-0.71	143.2	-18.92	-0.94	-0.22	2.91	127.30	133.22	86.68
12	1208	-1.38	136.8	-2.1	2.44	0.22	-0.38	140.33	123.88	71.08
13	1204	-1.18	127.5	-13.46	-1.78	0.75	-1.13	135.13	118.70	70.67
14	1204	-0.77	126.5	-17.43	2.73	-0.51	0.00	138.31	121.91	69.02
15	1202	-0.94	129.6	-19.07	2.11	-0.85	-0.44	136.27	119.80	68.54
16	1198	-0.63	126.9	-36	1.78	0.56	0.90	122.06	95.65	72.75
17	1196	-1.05	128.9	-2.15	1.81	0.55	-2.45	140.28	127.46	73.80
18	1186	-1.09	123	-21.16	2.07	-0.21	3.08	137.64	119.18	67.97
19	1184	-1.2	119.6	8.42	0.22	0.38	1.27	141.29	130.28	73.73
20	1180	-0.8	122.6	-40.7	-1.42	-0.34	2.92	121.23	95.60	74.81
21	1178	-1.21	130.5	-18.05	2.69	0.26	0.71	137.54	122.75	69.89
22	1176	-1.07	118.8	-0.09	-2.25	-0.87	-2.72	138.52	128.02	75.26
23	1176	-1.5	125.5	3.95	-2.28	-0.78	1.63	139.95	129.75	75.61
24	1174	-1.36	123.6	-27.64	1.56	-0.12	-1.34	135.52	117.92	68.82
25	1174	-0.98	125.9	-28.61	0.06	0.01	1.46	136.56	117.94	68.26
26	1172	-1.36	120.5	-28.61	0.48	-1.51	1.53	135.80	116.08	68.95
27	1170	-1.48	126.2	-14.66	2.85	0.04	3.00	134.91	116.63	69.61
28	1170	-1.08	124.9	-9.9	0.01	0.39	-1.10	140.72	124.39	73.43
29	1164	-1.93	135.9	-5.56	3.13	-0.76	3.02	139.66	123.73	73.91
30	1158	-1.52	125.1	-35.91	-2.48	1.40	-0.35	133.39	117.72	70.22

Tabla D.7: Predicción de acoplamiento dímero α/β con ZINC39245715.

#	score	pen.	Area	ACE	Ligand Transformation					
1	1944	-1.18	208.6	-25.65	0.51	-0.32	0.06	127.03	131.53	87.28
2	1944	-0.96	218.9	-24.78	2.94	-0.84	-2.16	126.85	131.84	87.41
3	1862	-1.57	216.2	-9.27	0.55	0.06	-0.55	126.19	132.43	87.39
4	1830	-1.36	202.2	-24.75	-0.72	0.23	-0.53	126.88	131.92	85.41
5	1750	-1.55	210.4	-35.9	0.80	-0.48	0.54	126.38	131.74	86.20
6	1720	-1.7	193.5	-31.8	1.15	-0.54	-0.34	127.24	130.64	86.96
7	1710	-1.43	192.6	-25.6	-1.30	0.65	2.88	127.73	130.63	85.07
8	1696	-1.83	183.8	-28.75	0.04	-0.19	-1.10	127.73	131.57	86.69
9	1666	-1.53	195.9	-6.19	-1.53	-0.81	-1.14	125.87	133.42	87.27
10	1660	-1.67	182.2	-23.93	1.60	0.65	-0.43	126.14	131.12	86.71
11	1644	-1.57	192.4	-17.12	0.24	-0.65	2.80	127.05	131.21	87.56
12	1636	-1.91	190.6	-38.87	-1.99	0.14	3.08	128.30	130.08	84.94
13	1590	-0.96	184.2	-45.26	-2.77	0.99	-2.17	126.16	131.77	83.81
14	1550	-1.89	179.3	-11.89	0.27	0.96	1.97	126.84	130.28	86.42
15	1534	-1.25	158	-0.94	0.75	-0.95	0.57	106.60	108.04	77.91
16	1528	-2.31	180.5	-33.23	0.00	0.66	-2.12	127.16	131.52	85.98
17	1526	-1.28	177.9	-27.7	2.86	0.59	-1.38	125.69	133.11	84.92
18	1524	-1.82	185.5	-29	-1.85	0.68	-1.50	128.07	131.65	84.18
19	1508	-1.76	162	8.28	-0.21	0.37	-0.63	139.88	130.20	74.09
20	1494	-0.7	161.1	-29.86	2.63	0.94	-0.20	134.75	117.82	68.67
21	1486	-1.51	171.5	-52.72	2.16	-0.15	-1.34	125.72	132.81	83.86
22	1484	-1.55	177.7	-40.71	-1.08	0.21	-1.13	127.27	132.50	83.72
23	1466	-1.27	156.7	-46.99	0.43	0.90	0.74	132.23	116.20	68.02
24	1460	-1.25	155.1	-27.25	-0.27	-0.09	-1.38	135.61	119.89	69.98
25	1458	-1.37	151.2	-17.7	2.51	1.20	1.69	112.00	98.83	88.56
26	1454	-1.62	157.4	-8.16	-0.93	0.46	-2.09	106.94	108.07	77.04
27	1450	-1.74	159.2	-27.46	-1.72	-0.74	2.65	111.64	99.45	90.11
28	1450	-2.16	162.7	-24.9	-2.93	0.16	-1.46	111.29	100.13	90.32
29	1420	-1.85	154.5	-5.48	2.21	0.03	-0.83	105.67	108.21	78.29
30	1418	-2.21	170.5	13.32	-0.31	-0.10	-1.89	141.66	126.27	73.82