REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

**Universidad Católica de Santa María**

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

# *Virtual Screening* de fármacos con afinidad a la lipoproteína F (LprF) de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*.

Tesis presentada por el:

**Bachiller:**

**Reyes Albarracin, Yuvika**

para optar el Título Profesional de:

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

Dr. Gómez Valdez Badhin

***Arequipa – Perú***

***2018***

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

*UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA*
*Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas*
*Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica*

Expediente N°. **16021996**

N° Trámite en Fac. **287-2016**
Fecha Recep. Fac. **23-05-2016**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: ***REYES ALBARRACIN, Yuvika***

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

***"ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES ENTRE DOS FARMACOS A NIVEL DE LA PARED CELULAR CON LA PROTEINA G EN Mycobacteriuym tuberculosis, Mycobacterium bovis Y Mycobacterium caprae"***

**DICTAMINADORES**: *1) Dra. Yenny López Valencia* *2) MVZ Milagro Teran Dianderas*

**DICTAMEN DE PLAN**: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 07/07/2016

ASESOR: ***Dr. Badhin Gómez Valdez***

**DICTAMEN ASESORÍA**:

Habiendo realizado el manuscrito y culminado la investigación, pongo a disposición de los jurados el borrador de tesis DETECCIÓN VIRTUAL DE FÁRMACOS PARA LA LIPOPROTEÍNA F (LPRF) *DE M. BOVIS* Y *M. CAPRAE* EN UN POSIBLE TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS EN ANIMALES; ante su despacho.

FIRMA FECHA 27-03-18

**DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS**:

1) ***Dr. José Villanueva Salas***
2) ***Dra. Yenny lopez Valencia***
3) ***Dra. Milagro Teran Dianderas***

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: *"Virtual screening DE FARMACOS CON AFINIDAD A LA LIPOPROTEINA F (LprF) DE Mycobacterium bovis yY Mycobacterium caprae"* y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 18/05/2018

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA 14/06/18 HORA 19.00 LOCAL SUM C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA 04/06/18

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Dedicatoria

*A mi madre, por ser el principal motor de mi vida. Gracias por siempre impulsarme a querer ser la mejor, por tenerme tanta fe, por darme las palabras de aliento que siempre necesité, por estar siempre orgullosa de mí. Gracias, madre mía, por tus innumerables consejos.*

*A mi padre, por haberme dado este carácter tan característico de ti, que me dio la fuerza y la firmeza para tomar el camino que he elegido. Gracias papá, por siempre ser un ejemplo a seguir, por formarme como una mujer de bien, por tus consejos y paciencia.*

*A Bratzo, mi hermano; por las innumerables risas que me sacas día a día. Por esa paciencia que me tienes. Gracias, por estar para mí siempre, simplemente gracias por ser tú.*

*A mi abuelo José, el ángel que siempre me cuidó en toda circunstancia.*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Agradecimientos

A la Universidad Católica de Santa María, y a cada uno de los profesores que me brindaron sus conocimientos a los largo de los 5 años de formación.

Al Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM), que fue el lugar donde encontré compañeros y amigos que día a día me dieron su apoyo y su amistad.

Al Dr. Badhin Gómez, por ser un mentor, un extraordinario profesor y un gran amigo que me brindó los mejores conocimientos y consejos; los que usaré en todos aspectos de mi vida.

A Haruna Barazorda, por su apoyo y los consejos brindados a lo largo del desarrollo de este proyecto; por enseñarme a ser tan minuciosa y metódica en mis trabajos.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Contenido

**Dedicatoria** 1

**Agradecimientos** 2

**Contenido** I

**Índice de Figuras** IV

**Índice de Tablas** VII

**Glosario** IX

**Resumen** XI

**Abstract** XII

**1. Introducción** 1

**Objetivos** 3

**Hipótesis** 4

**2. Marco Teórico** 5

2.1. Tuberculosis . . . . . 5

2.1.1. Historia y evolución . . . . . 5



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.1.2. Epidemiología . . . . . 6

2.1.3. Clases de Tuberculosis . . . . . 6

2.2. Género *Mycobacterium* . . . . . 10

2.2.1. Etimología y taxonomía . . . . . 10

2.2.2. Características generales . . . . . 11

2.2.3. Aislamiento y condiciones de incubación . . . . . 12

2.3. Pared celular de *Mycobacterium* . . . . . 13

2.3.1. Lipoproteínas . . . . . 14

2.4. Tratamiento . . . . . 18

2.4.1. En humanos . . . . . 18

2.4.2. En animales: Bovinos y Caprinos . . . . . 18

2.4.3. Farmacología . . . . . 19

2.5. Biología y química computacional . . . . . 32

2.5.1. Mecánica cuántica: . . . . . 33

2.5.2. Mecánica molecular: . . . . . 34

**3. Metodología** **43**

3.1. Detalles Computacionales . . . . . 43

3.2. Métodos . . . . . 45

3.2.1. Análisis de las estructuras . . . . . 45

3.2.2. Optimización de la geometría . . . . . 45

3.2.3. Modelamiento estructural . . . . . 46

3.2.4. Simulación de dinámica molecular . . . . . 46

3.2.5. Validación de estructuras moleculares . . . . . 49

3.2.6. *Virtual screening* de las especies lipoproteicas con ligandos . . . . 50

**4. Resultados y Discusión** **52**



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.1. Análisis de las estructuras . . . . . 52

4.2. Optimización de la geometría de los ligandos . . . . . 54

4.3. Simulación de Dinámica Molecular . . . . . 61

4.3.1. Modelamiento estructural de la lipoproteína F (LprF) . . . . . 61

4.3.2. Dinámica Molecular . . . . . 63

4.4. Análisis de *virtual screening*. . . . . 73

4.4.1. Análisis de bolsillos hidrofóbicos . . . . . 73

4.4.2. *Virtual Screening* . . . . . 77

**Conclusiones** **96**

**Recomendaciones** **97**

**Referencias Bibliográficas** **98**

**Anexos** **112**

**A. Virtual Screening** **113**



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Índice de Figuras

2.1. Incidencia y muertes causadas por tuberculosis hasta el año 2015. . . . . 6

2.2. Pared celular de *Mycobacterium* . . . . . 13

2.3. Modificaciones post-traduccionales de lipoproteínas. . . . . 15

2.4. Comparación entre bolsillos hidrofóbicos de LprG, LprX y LprF de *Mycobacterium*. . . . . 16

2.5. Posicionamiento de lipoproteínas en *Mycobacterium*. . . . . 17

2.6. Interacciones enlazantes y no enlazantes. . . . . 35

2.7. Explicación del Diagrama de Ramachandran. . . . . 42

4.1. Potencial electrostático I. . . . . 58

4.2. Potencial electrostático II. . . . . 59

4.3. Potencial electrostático III. . . . . 60

4.4. Potencial electrostático V. . . . . 61

4.5. Estructuras 3D modeladas de LprF de las especies *Mycobaterium*. . . . . 62

4.6. Energía potencial obtenida por especie de *Mycobacterium* después del proceso de minimización . . . . . 64

4.7. Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. tuberculosis*, como resultado de las simulaciones. . . . . 65

4.8. Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. bovis*, como resultado de las simulaciones. . . . . 65



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4.9. Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. caprae*, como resultado de las simulaciones. . . . . 66

4.10. Desviación media cuadrática de lipoproteína F Lpr de las tres especies de *Mycobacterium* estudiadas. . . . . 67

4.11. Radio de giro de las especies de *Mycobacterium* estudiadas . . . . . 68

4.12. Estructuras de los puente de hidrógeno de cada una de las especies proteicas de *Mycobacterium* estudiadas. . . . . 69

4.13. Diagrama Ramachandran de la especie *M. tuberculosis* . . . . . 70

4.14. Diagrama Ramachandran de la especie *M. bovis* . . . . . 71

4.15. Diagrama Ramachandran de la especie *M. caprae* . . . . . 72

4.16. Bolsillo hidrofóbico Nº1 de *M. tuberculosis* . . . . . 73

4.17. Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. bovis* con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos. . . . . 75

4.18. Bolsillos hidrofóbicos de *M. caprae* . . . . . 76

4.19. *Virtual screening* de *M. tuberculosis* . . . . . 78

4.20. Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. bovis* con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos. . . . . 80

4.21. Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. caprae* obtenidos con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos. . . . . 81

4.22. Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. tuberculosis* . . . . . 85

4.23. Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. bovis* . . . . . 87

4.24. Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. caprae*, correspondientes a la tabla 5.13. . . . . 91

4.25. Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en M. caprae, correspondiente a la tabla 4.11. . . . . 92



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

A.1. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. tuberculosis*. . . . . 113

A.2. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. tuberculosis*. . . . . 114

A.3. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*. . . . . 114

A.4. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*. . . . . 115

A.5. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*. . . . . 115

A.6. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*. . . . . 116

A.7. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*. . . . . 117

A.8. Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*. . . . . 118



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Índice de Tablas

2.1. Clasificación taxonómica de *Mycobacterium*. . . . . 11

2.2. Drogas de primera y segunda línea usadas para el tratamiento de la tuberculosis . . . . . 18

4.1. Secuencias Fasta de LprF, reportadas en el NCBI (National Center of Biotechnology Information) . . . . . 53

4.2. Ligandos elegidos, reportados en el PubChem. . . . . 54

4.3. Comparación de la estructura 2D y la optimizada en Gaussian de los ligandos. 55

4.4. Porcentajes de homología reportados para cada especie de *Mycobacterium*. 63

4.5. Aminoácidos conservados en las zonas atípicas en los diagramas Ramachandran . . . . . 72

4.6. Análisis del bolsillo de LPRFs de *Mycobacterium* estudiadas . . . . . 74

4.7. Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. tuberculosis* . . . 77

4.7. Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. tuberculosis* . . . 78

4.8. Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. bovis*. . . . . 79

4.9. Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. caprae*. . . . . 81

4.10. Energías de acoplamiento de ligandos para el bolsillo N° 1 obtenidas del refinamiento. . . . . 82

4.11. Aminoácidos involucrados en el bolsillo hidrofóbico de *M. tuberculosis*. . . 84

4.12. Aminoácidos involucrados en el bolsillo hidrofóbico de *M. bovis* . . . . . 86



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

4.13. Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, I parte. . . . . 89

4.13. Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, I parte. . . . . 90

4.14. Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, II parte. . . . . 94

4.14. Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, II parte. . . . . 95



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Glosario

1. LprF: Lipoproteína F.
2. VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.
3. TBC: Tuberculosis.
4. PPD: Derivado Proteico Purificado (Prueba de tuberculina).
5. PS: Prueba de sensibilidad a la tuberculosis.
6. OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal.
7. SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
8. OMS: Organización Mundial de la Salud.
9. Ara: Arabino.
10. Man: Manosa.
11. Lgt: Lipoproteína diacil transferasa.
12. Lsp: Lipoproteína señal peptidasa.
13. Lnt: Lipoproteína N-acil transferasa.
14. AG: Arabinogalactano.
15. PG: Peptidoglicano
16. ML: Ácidos micólicos.
17. LppX: Lipoproteína X.
18. LprG: Lipoproteína G.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

19. LAM: Lipoarabinomanano.
20. TLR: Receptores tipo Toll.
21. PABA: Ácido para-aminobenzoico.
22. RNAt: Ácido ribonucleico de transferencia.
23. RNAr: Ácido ribonucleico ribosomal.
24. RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.
25. FDA: Food and Drug Administration.
26. ATP: Adenosina Tri-Fosfato.
27. GTP: Guanosin Tri-Fosfato.
28. DNA: Ácido desoxirribonucleico.
29. FASI: Biomolécula encargada de sintetizar ácidos grasos en la pared celular.
30. SIDA: Síndrome de Inmuno Deficiencia Humana Adquirida.
31. QM: Mecánica cuántica.
32. MM: Mecánica Molecular.
33. OPLS: Tipo de campo de fuerza.
34. PDB: Protein Data Bank.
35. $\Delta G$: Energía libre de Gibbs.
36. RMSD: Root mean square deviation.
37. RMSF: Root mean square fluctuation.
38. Rg: Radio de giro.
39. LD50: Dosis letal media.
40. LogP: Coeficiente de partición.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Resumen

La tuberculosis bovina es una infección que causa inmensas pérdidas monetarias en el sector ganadero, por la muerte de los ejemplares o por su prevención; y al no tener tratamiento alguno, se convierte en un problema de gran interés. Es así como se estudió la finidad de fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis humana por la lipoproteína F (LprF) presente en la pared celular de microorganismos causantes de la tuberculosis bovina y caprina. Se obtuvo las estructuras terciarias de lipoproteína F en *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* mediante modelamiento por homología. Se calculó las estructuras en equilibrio de un total de 18 fármacos, optimizadas mediante química cuántica; así como las estructuras proteicas de LprF de las especies bacterianas estudiadas en una simulación de dinámica molecular en solvente explícito; de las cuales se analizó las validaciones requeridas: los diagramas RMSD, RMSF, Radio de giro, Puentes de hidrógeno, Ramachandran. Como resultado del análisis de las energías de acoplamiento se observó que cada lipoproteína por especie estudiada de *Mycobacterium* posee un bolsillo hidrófico altamente drogable en condiciones hidrofílicas, el cual podría llevar a Levofloxacino crear un enlace puente de hidrógeno con LprF de *M. tuberculosis*. Rifampicina e Isoniazida también son buenos candidatos al obtener buenos valores de energías de acoplamiento con LprF de *M. bovis* a pesar de no haber formado un enlace de hidrógeno; y finalmente que *M. caprae* formaría el mismo tipo de enlace con Pirazinamida. Estos últimos resultados nos sugieren que los fármacos mencionados podrían ser transportados por las respectiva LprF en un tratamiento en animales.

**Palabras clave:** Tuberculosis bovina, lipoproteína F, *Mycobacterium*, bioinformática.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Abstract

Bovine tuberculosis is an infection that causes very large monetary losses in the livestock sector, due to the death of species or their prevention; and having no treatment, it became a problem of great interest. This is why we studied the affinity of drugs used in treatment of human tuberculosis with lipoprotein F (LprF) present in cell wall, which is present in bovine and caprine tuberculosis microorganisms. We got the tertiary structures of lipoprotein F of in *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. caprae* using homology modeling. We calculated the equilibrium structures of a total of 18 drugs, optimized by quantum chemistry; as well as the protein structures of LprF of the bacterial species studied in a simulation of molecular dynamic in explicit solvent; of which we analyzed the required validations: the diagrams RMSD, RMSF, turning radius, hydrogen bonds, Ramachandran. As a result of the analysis of coupling energies, it was observed that each lipoprotein per species of *Mycobacterium* has a highly drugable hydrophobic pocket under hydrophilic conditions, which could lead Levofloxacin to create a hydrogen bond with LprF of *M. tuberculosis*. Rifampicin and Isoniazide are also good candidates for obtaining good values of coupling energies with LprF of *M. bovis* despite not having formed a hydrogen bond; and finally that *M. caprae* would form the same type of bond with Pyrazinamide. These last results suggest that the mentioned drugs can be taken by the respective LprF's in an animal treatment.

**Key words:** Bovine tuberculosis, lipoprotein F, *Mycobacterium*, bioinformatic.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Capítulo 1

# Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa producida por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (como *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*) que pueden ocasionar esta infección en animales. Esta puede generar dos grandes problemas en el sector salud y en el sector ganadero. En el primero, al tratarse de una zoonosis puede convertirse en un importante vector de la enfermedad; mientras que en el segundo causa importantes pérdidas monetarias debido a la baja de animales infectados y al costo de las pruebas que por reglamento se deben realizar para evitar que la enfermedad se propague a otro tipo de ganado y se pueda generar resistencias. [1,2]

Mientras que el tratamiento para humanos se encuentra ampliamente estudiado y reproducido, no es el mismo caso para la tuberculosis bovina y caprina, las que generalmente afecta a los animales, pues podría resultar muy costoso. Este panorama genera una gran incertidumbre en el sector, pues los animales están totalmente expuestos ante un brote de la enfermedad sin armas para combatirla. Por otro lado existen animales de gran interés que son sacrificados por causa de esta infección, causando así lamentables pérdidas no sólo monetarias, si no también de ejemplares valiosos para el dueño. Esto se vuelve una amenaza constante para los animales y para poblaciones vulnerables y cercanas, ya que al tratarse de una zoonosis, esta puede pasar de animales a hombres y viceversa. Por este tipo de razones se ha convertido en un importante vector a tratar, pues se busca principalmente poder eliminar este tipo de microorganismos sin la generación de resistencias. [3]

En la última década las herramientas computacionales han cobrado gran importancia en la investigación, hoy en día hay cientos de trabajos *in silico* que nos brindan aproxi-



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

maciones en diversos campos; los cuales muchas veces son difíciles de abordar de manera práctica por las dificultades de material y/o metodología. Una de estas herramientas es el conocido como *Virtual Screening* el cual se ha venido desarrollando desde aproximadamente 30 años y que ha sido de gran ayuda en el desarrollo e investigación de nuevos fármacos. Este nos indica el mejor lugar de interacción entre un receptor y varios ligandos, así como la energía libre de Gibbs entre cada uno de los asistemas interaccionates. Por su gran funcionalidad es que se convierte en una herramienta de gran ayuda para la elucidación y evaluación de los acoplamientos entre un ligando y un banco de posibles fármacos. [4]

Por las razones expuestas, es de interés el estudio de otras posibles vías de ataque a los microorganismos que producen la tuberculosis en animales. Es así, que este estudio tuvo como objetivo principal el estudio de los acoplamientos moleculares entre proteínas transportadoras como la lipoproteína F (LprF), que cual está presente en las tres especies de *Mycobacterium* estudiadas que son responsables de causar la infección en animales; y los fármacos hallados en el tratamiento de la tuberculosis en humanos.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

## Objetivo general

- Evaluar el acoplamiento molecular de lipoproteína F (LprF) de *Mycobacterium bovis* y de *Mycobacterium caprae* mediante *virtual screening*.

## Objetivos específicos

- Obtener de las secuencias de las lipoproteínas F en *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* en la base de datos del NCBI; así como las estructuras de los ligandos en PubChem.
- Optimizar las estructuras los fármacos elegidos como potenciales ligandos de LprF mediante metodologías cuánticas.
- Realizar una simulación de dinámica molecular en solvente explícito para las lipoproteínas F reportadas en *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*.
- Analizar los sitios activos para las lipoproteínas F reportadas en *M. tuberculosis, M. bovis* y *M. caprae*.
- Determinar los mejores fármacos aptos para ser transportados por las LprF's en un ambiente hidrofílico.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Hipótesis

Dado que la tuberculosis en animales es una zoonosis que causa importantes pérdidas monetarias en el sector ganadero y al no poseer tratamiento establecido aún, es posible evaluar la afinidad de fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis humana para la lipoproteína F (LprF) de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* mediante el uso de herramientas computacionales.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Capítulo 2

# Marco Teórico

## 2.1. Tuberculosis

### 2.1.1. Historia y evolución

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que se transmite principalmente vía aérea, mediante gotas de "Flugge" expulsadas por una persona infectada; afectando principalmente las vías respiratorias. Es causada por los microorganismos pertenecientes al complejo bacteriano llamado *Mycobacterium tuberculosis*.[3,5,6]

La tuberculosis es una enfermedad de la que se tiene registros que datan del periodo Neolítico en bovinos y según otras fuentes en porcinos también, esto demostró que los primeros en ser afectados por este grupo de microorganismos fueron los animales, luego la infección sería transmitida al hombre por el contacto hombre-animal de la ganadería. Las primeras evidencias de la tuberculosis encontrados en remanentes humanos datan de un joven del 5000 a.C., descubiertos por Paul Bartels en 1907 cerca de Heidelberg, Alemania. La enfermedad tuvo un periodo de apogeo durante el siglo XVIII en Europa occidental debido a los espacios reducidos con poca ventilación e insalubridad de las colonias de aquella época.[3,6]

La persona infectada suele presentar tos persistente, fiebre leve, fatiga, pérdida de peso considerable, sudoración nocturna. Algunos pacientes pueden no presentar los mismos síntomas, ya que estos dependen mucho del estadío de la infección en la que se encuentre



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

y del estado físico del afectado. [7]

### 2.1.2. Epidemiología

La tuberculosis es una de las enfermedades que ha cobrado más vidas a lo largo de los años, y en la actualidad se encuentra entre las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. En el 2015 la incidencia de tuberculosis fue de 10,4 millones en personas de ambos sexos, y el 10 % del total; es decir 1,0 millón fueron casos reportados en niños. En el mismo año, Perú tuvo un total de 2000 personas fallecidas a causa de esta enfermedad, excluyendo casos de VIH. A pesar que la tendencia de nuevos casos a disminuído con un factor de 1.5 % desde el año 2000, los gobiernos incrementaron los fondos y mejoraron las estrategias para conseguir aumentar esta cifra, ver **figura** 2.1. Es así, que en el 2016 los gobiernos de países con niveles de ingresos bajos y medianos destinaron 6 600 millones de dólares para la prevención y atención de la tuberculosis; lamentablemente, a pesar de contar con donaciones internacionales este financiamiento no es suficiente para la cobertura de las necesidades en cada país. [8,9]

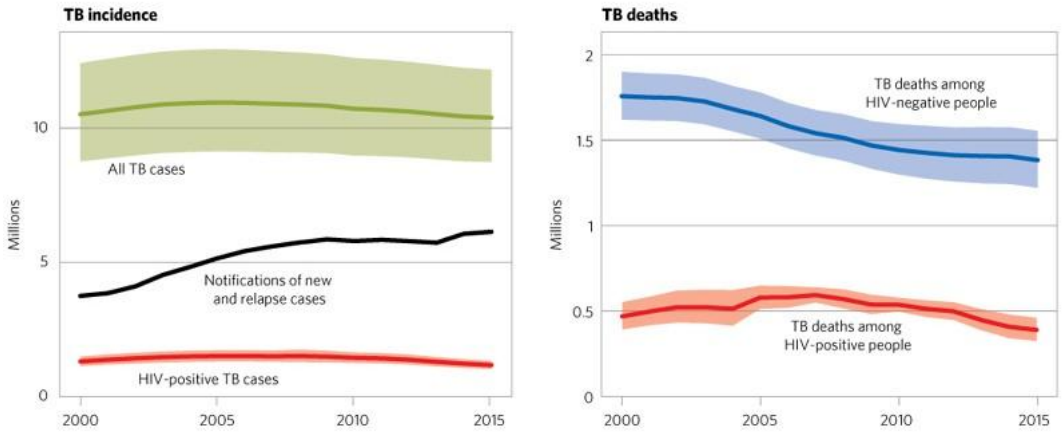



Figura 2.1: Incidencia de diferentes tipos de tuberculosis a lo largo de los años (izquierda) y muertes causadas por las variantes de la infección. [8]

### 2.1.3. Clases de Tuberculosis

Los síntomas producidos por la tuberculosis pueden no ocasionar molestias al paciente hasta después de meses o incluso años. Los animales también sufren de esta infección, por


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

lo que esto los convierte en un vector importante de la enfermedad, ya que es posible el contagio animal – hombre por el consumo de víceras, leche cruda o algún otro derivado lácteo que haya sido elaborado con este tipo de insumo de un animal infectado. Es por esto que la infección es considerada una potente zoonosis.[10]

La transmisión de la tuberculosis sigue la misma vía aérea en ambos casos, es decir, en hombres y en animales. Para poder entender cómo se manifiesta la enfermedad en estos últimos, primero se deberá tener clara la respuesta inmunológica que microorganismos del género *Mycobacterium* despiertan en los huéspedes.

### 2.1.3.1. Tuberculosis humana:

La mayor cantidad de estudios y datos recolectados pertenecen a casos de tuberculosis en hombres, por lo que los más significativos corresponden a este tipo. Existen dos formas de infección; la primaria o primoinfección y la secundaria; también llamada reactivación bacilar. La enfermedad consta básicamente de tres fases luego de la primoinfección tuberculosa. La primera es llamada *pre-exudativa*, en la cual los bacilos empiezan a multiplicarse, hasta que el paciente entra a la fase *exudativa*; donde se forma una lesión tuberculosa o también llamada *granulona tuberculoso*. Finalmente se encuentra la fase de *caseificación;* la que genera la lisis de los macrófagos; los que dan lugar a los llamados "granulomas caseificantes" en la parénquima pulmonar, en el ganglio linfático hiliar y otros órganos delimitados por una pared de colágeno que los separa. A este conjunto se le conoce con el nombre de *"Complejo de Ghon"*.[6,7] Es probable que la infección primaria se prolongue por semanas, así la inmunidad mediada por linfocitos T determinarán una prueba cutánea PPD positiva.

Al no ser superada la primoinfección por la inmunidad del huésped o por la virulencia de la cepa de *Mycobacterium*, se ingresa a la *infección secundaria*. El princial daño ocasionado en esta fase es la lesión tisular, cuando los granulomas formados se ven imposibilitados de contener la expansión de la infección, por lo que las micobacterias son liberadas al exterior cuando los vasos sanguíneos se rompen.[11]

Según la respuesta que el huésped muestra frente a la prueba de sensibilidad para tuberculosis (PS), la enfermedad puede ser clasificada según el grado de resistencia a los principales fármacos usados para el tratamiento de la infección. Esta puede clasificarse co-



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

mo: Tuberculosis sensible, multidrogo resistente o extremadamente resistente a fármacos. Sólo este último tipo requiere la tipificación molecular de la cepa. [12]

### 2.1.3.2. Tuberculosis en animales:

Como se mencionó antes, los animales se han convertido en un vector importante sobre la incidencia de la tuberculosis en el hombre, lo que la convierte en una importante zoonosis. Suelen pasar meses hasta un año antes de tener pruebas evidentes de la infección en el ganado.

La enfermedad puede extenderse a animales de distinta especie como bovino, caprinos, felinos, etc. Los principales agentes etiológicos que afecta a ganado bovino y caprino son *M. bovis* y *M. caprae* respectivamente, aunque no son exclusivos.

- **Tuberculosis Bovina y Caprina:**

  Se designa con este nombre a la enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico causada por dos microorganismos del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*; *M. bovis* y *M. caprae*. Este microorganismo afecta a rumiantes, al ganado bovino y caprino respectivamente; aunque no exclusivamente. Se ha reportado la enfermedad también en una gran variedad de animales domésticos y salvajes. La tuberculosis bovina se encuentra como una enfermedad de declaración obligatoria, clasificándose como una enfermedad tipo B por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). [13] Contradictoriamente, la tuberculosis caprina no se encuentra dentro de esta lista. [14] Países desarrollados como Canadá y Reino Unido han reducido las cifras de esta enfermedad o las han eliminado pero en muchos ejemplares de la fauna salvaje aún está presente, por lo que se convierte en una fuente de reincidencia común.

  Esta zoonosis tiene varias vías de diseminación, a diferencia de la tuberculosis en humanos; ya que en esta última sólo se puede llegar a albergar al patógeno por su aspiración. Sin embargo, en el caso de los animales, la situación varía un poco pues un animal infectado puede contagiar a otros por medio del consumo de leche sin pasteurizar, la ingesta de carne o víceras o de pasto contaminado con heces del animal infectado (aunque existen pocas evidencias de esta hipótesis). Por estas razones, se decidió mantener como vía general de infección, la aerógena. El proceso



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

empieza por la aspiración de microgotas (gotas de Flugge) expulsadas por el animal infectado, las cuales contienen micobacterias activas e ingresan a otro animal por inhalación. Este mecanismo favorece la extensión potente y sigilosa de la infección en animales domésticos y salvajes. [15]

Una vez que las bacterias ingresan al organismo, se activa la primera línea de defensa del cuerpo, que está constituída por los macrófagos; los que son capaces de absorber al patógeno por fagocitosis. Gracias a los receptores que poseen las micobacterias, anulan el fagolisosoma y a los derivados de oxígeno que en condiciones normales se encargarían de la destrucción del patógeno. [16] Esto puede depender de muchos factores inherentes de la misma bacteria como la virulencia, tipo de cepa o hasta el estado inmunológico del huésped. Este tipo de microorganismos pueden multiplicarse en el mismo lugar de la primera implantación antes de diseminarse al resto de órganos y tejidos sanos. En la respuesta inmune del ganado vacuno el linfocito T y todas las subpoblaciones derivadas son consideradas relevantes. [17]

La enfermedad puede seguir su trayecto con la formación de un granuloma llamado "tubérculo". Este puede cicatrizar con la formación de tejido fibroso y agregación de calcificación sin mayores complicaciones. De no producirse una cicatriz, los bacilos podrían diseminarse hacia otros órganos por las linfas. La fusión del órgano de entrada con el ganglio linfático regional, por el cual las micobacterias se diseminan hacia otros vasos linfáticos, contituyen el complejo primario. [18] En algunos casos, los ganglios se inflaman, se abren y pueden llegar a secretar; ocasionando la obstrucción de vasos sanguíneos, del tubo gastrodigestivo o de vías respiratorias; en especial si esto ocurre con los ganglios retrofaríngeos.

La patogenia es básicamente la misma en todos los animales, pero los que han tenido un contacto previo con la micobacteria pueden volver a desarrollar la infección por bacterias provenientes del exterior o por una re-activación de los focos primarios, que pueden contener micobacterias esperando salir del estado de latencia. En el complejo post-primario formado, sólo se podría presentar difusión intracanicular, lo que indica que sólo se desarrollaría tuberculosis en un órgano específico, obstruyendo así las vías mencionadas con anterioridad; como vasos sanguíneos y otros. Cuando el animal se ve en el anterior panorama, la muerte es inminente; contagiando a otros ejemplares del mismo establo o de la misma manada. Por esta razón se



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

deberá realizar controles de tuberculosis anuales o según las normas establecidas por la entidad ganadera reguladora de cada país, como lo es SENASA en territorio nacional. Existen varias pruebas de detección de tuberculosis, pero la principal es la de tuberculina o también llamada Prueba cutánea de PPD (Derivado Proteico Purificado) que tiene carácter cualitativo.[19]

En caso que el animal evaluado presente una reacción positiva a la prueba de la tuberculina, este será retirado de los hatos y sacrificado. Es por esta razón que no se suelen observar los síntomas típicos de la tuberculosis en animales como lo son la pérdida de peso, disminución en la producción de leche en las hembras, tos, mastitis, metritis e infertilidad. [20]

Los animales que no mueren por tuberculosis pero dan una reacción positiva a la prueba de tuberculina son sacrificados, lo que significa una pérdida económica para el ganadero, siendo a veces estos ejemplares valiosos. A nivel mundial aproximadamente hay una disminución del 25 % de ejemplares, un 20 % en la producción lechera y un 5 % en la capacidad reproductiva de los rebaños; además del dinero designado a la evaluación y prevención de la tuberculosis en los animales, lo que traduce en un monto significativo anualmente por región para cada país.[21]

Por este tipo de razones, las entidades internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) implementaron programas contra enfermedades de interés global como lo es la tuberculosis; disponiendo fondos y reglamentación que es administrada por los gobiernos de cada país. Sin el respectivo compromiso político y coordinación de los servicios de salud pública y sanidad animal sería imposible ampliar y solidificar las alianzas de entidades nacionales e internacionales para la lucha contra la infección.[22]

## 2.2. Género *Mycobacterium*

### 2.2.1. Etimología y taxonomía

El género *Mycobacterium* es el único perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae* y encierra a bacterias de relevancia en enfermedades infecto contagiosas como *Mycobacterium*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

*tuberculosis* o *Mycobacterium bovis*, agentes patógenos que pueden causar tuberculosis, lepra y otro tipo de infecciones. Al ser vectores de enfermedades que tienen una importante incidencia en medicina, se les estudia en la sub-rama de microbiología llamada Micobacteriología. La palabra *"Mycobacteria"* viene del latín Myk que significa "hongo" y baktēr-i(o) que es "bastoncillo". [23]

Las bacterias de este y otros géneros poseen una clasificación específica según la segunda edición del Manual de Bacteriología de Bergey's, es así como la clasificación taxonómica de las micobacterias es como se muestra en la **Tabla** 2.1.

Tabla 2.1: Clasificación taxonómica de *Mycobacterium*.

| **Taxonomía** | |
|---|---|
| **Dominio** | *Bacteria* |
| **Phyllum** | *BXIV Actinobacteria* |
| **Clase** | *Actinobacteria* |
| **Subclase** | *Actinobacteridae* |
| **Orden** | *Actinomycetales* |
| **Suborden** | *Corynebacterineae* |
| **Familia** | *Mycobacteriaceae* |
| **Género** | *Mycobacterium* |

## 2.2.2. Características generales

### 2.2.2.1. Características macroscópicas

Los mayoría de microorganismos del género *Mycobacterium* muestran las mismas características macroscópicas o muy parecidas. Existen clasificaciones basadas en las características de las colonias, como lo describe Runyon. Este autor clasifica las micobacterias en dos grandes grupos: según su patogenicidad, donde encontramos bacterias altamente virulentas, potencialmente patógenas y las especies saprófitas; luego se encuentran las bacterias clasificadas según el tiempo de su crecimiento y la cromogenicidad de la cepa, donde se describe el color mostrado por las colonias frente a la luz ambiental. No todas las micobacterias causan tuberculosis; es por esta razón que se buscaron varias metodologías para poder clasificarlas.[23] Las bacterias de este género con importancia e interés clínico tienen por lo general, un crecimiento lento en medios de cultivo convencionales; los medios selectivos son usados una vez aislados un grupo determinado de colonias.[24]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

#### 2.2.2.2. Características microscópicas

Las bacterias que conforman la familia *Mycobacteriaceae* son bacilos gram positivos, aerobios sin movilidad ni esporulación, con un tamaño aproximado de 1 a 10 µ de largo por 0,2 – 0,6 µ de ancho. La composición de su pared es especial por la presencia de ácidos micólicos; por lo que su alto contenido de C+G (55-71 %) es comparable con otras especies como *Gordonia* o *Rhodococcus*. [25,26]

Determinadas muestras tomadas de cultivos enriquecidos suelen formar ramificaciones débiles que se observan en el microscopio. Tienen una composición de pared celular especial, por lo que su tinición gram es irregular. Los bacilos *Mycobacterium* son conocidos como gram positivo débil, además de ser ácido – alcohol resistentes, principalmente debido a la presencia de ácidos grasos que su pared celular posee. Por estas razones en los manuales de procedimientos microbiológicos se encuentran protocolos específicos para estos microorganismos como la coloración de Ziehl-Neelsen.[27] Estudios demostraron la presencia de una cápsula en las especies de *Mycobacterium*, la cual está involucrada en virulencia y en la adhesión hacia el hospedador, pero esta se rompe o pierde protagonismo cuando el cultivo es sometido a un tratamiento químico – molecular. [28]

En lo que respecta a sus requerimientos nutricionales, son bastantes flexibles en cuanto a la utilización de distintas fuentes para cubrir sus necesidades. Pueden usar una gran variedad de carbohidratos de como fuente primaria, lípidos y las cadenas primarias de los aminoácidos de manera inducida o secundaria. Las micobacterias prefieren el uso de algunos aminoácidos como fuente de nitrógeno, especialmente asparagina, glutamato y aspartato; pero se puede inducir se aproveche algunas sales de amonio para el mismo requerimiento. Cada especie y cepa aprovechará de forma distinta las diferentes fuentes de nutrientes a las que son expuestos. [29,30]

### 2.2.3. Aislamiento y condiciones de incubación

Las muestras pueden provenir de distintas fuentes, desde lavados bronquiales, biopsias, heces, sangre, etc; pero estas deben ser procesadas y homogenizadas para realizar el cultivo, el cual no debe ser selectivo ni inhibitorio, comúnmente se usa el medio *Löwestein-Jensen*. En animales, la toma de muestra de ser necesaria, se realiza en las



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

heridas expuestas que estos pueden presentar.

Alrededor de las 7 – 8 semanas de incubación a una temperatura promedio que puede occilar entre los 37 y 42 $^{o}$C se observarán colonias blanquecinas con bordes irregulares, presentando además fotocromogenicidad y las características descritas anteriormente. Adicionalmente, se relizan las pruebas generales para la identificación bacteriana como catalasa, reducción de nitratos, tolerancia al NaCl al 5 %, ureasa entre otras. [31,32]

## 2.3. Pared celular de *Mycobacterium*

La pared celular de las micobacterias tienen una composición y distribución compleja que podría influir en cómo el microorganismo ataca a su hospedador. La membrana celular y otros componentes, conforman el segmento inferior del esqueleto de la bacteria, esta se encuentra unida a una capa de péptidoglicano que es responsable de aportar la rigidez del esqueleto y de aportar estabilidad osmótica; esto en todos los microorganismos. Este último componente está constituído de por cadenas intercaladas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, las cuales conforman una lámina unida de forma covalente a una capa de residuos de arabinosa y galactosa, los que toman el nombre de arabinogalactano, en su forma intercalada, ver **Figura** 2.2.

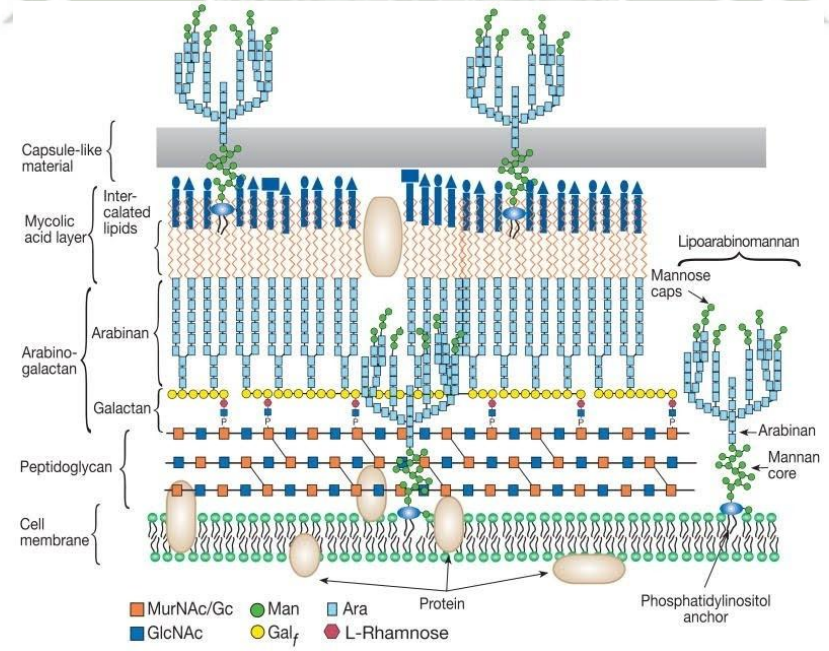



Figura 2.2: Esqueleto de la pared celular de bacterias del género *Mycobacterium*. [33]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Sin embargo, el factor que hace especial la pared celular de *Mycobacterium* es la presencia de una gruesa capa de ácidos micólicos, hidroxilípidos de cadena larga y ramificada, posicionados de forma intercalada y superpuesta. Al formar parte de la pared celular, estos le confieren fluidez y permeabilidad al micoorganismo frente el estrés físico y químico. Este tipo de características se convierten en un punto clave para la virulencia y el desarrollo de resistencias a los antibióticos, es por esta razón es que son tan versátiles y difíciles de exterminar con tratamientos estandarizados.[33,34]

Después de esta capa de lípidos, se encuentra en la zona externa de la estructura del esqueleto de la pared celular, los ácidos grasos superficiales como micósidos, el *factor cord* que ha sido ampliamente estudiado por su potente toxicidad en ratones en dosis muy pequeñas y sulfolípidos que podrían constituir la cápsula presente en las micobacterias. Además, a lo largo del esqueleto de la pared celular se encuentran varias estructuras de glicoplípidos adicionales, como moléculas de lipoarabinomanano distribuidas a lo largo de toda la pared celular, las que están ancladas por una molécula de fosfatidilinositol a un núcleo de arabinano y manano. En la parte superior se hallan las tapas superficiales de manosa. Estas estructuras suelen ser comunes en microorganismos de la especie *Mycobacterium* y tienen un rol de mediadores en la respuesta inmune del hospedador durante la infección.[35–37]

### 2.3.1. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son una amplia clase de proteínas bacterianas con una única adición lipídica en un residuo conservado. La característica principal de este tipo de estructuras es la presencia de un péptido señal que puede oscilar entre 20 y 40 aminoácidos aproximadamente. Dentro de esta señal se encuentra una llamada "caja lipídica" o "lipobox", secuencia de aminoácidos que puede estar formada por los residuos: (LVI)(ASTVI)(GAS). Inmediatamente después se encuentra un único aminoácido de Cisteína altamente conservado, como se esquematiza en la **Figura** 2.3.

Este tipo de lipoproteínas involucradas en el transporte de metabolitos, virulencia, síntesis, adhesión al hospedador, etc; pero la función con más interés en la actualidad es el metabolismo y transporte de drogas al interior de la pared y membrana celular. Alrededor del 3% del total del código genético de las bacterias puede codificar este tipo



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

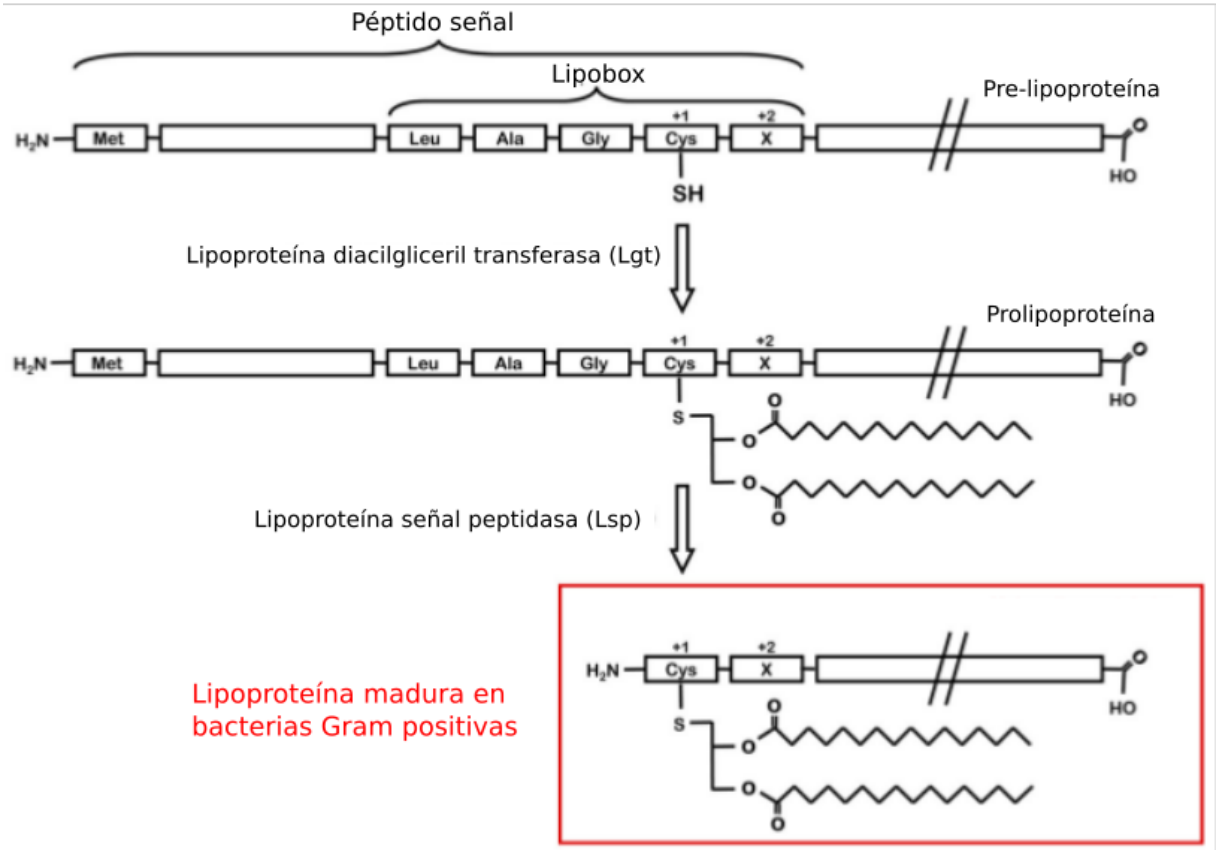



Figura 2.3: Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales en lipoproteínas de bacterias Gram positivas. [39]

de estructuras proteicas, ya que es un grupo grande y variado con diferentes funciones y estructuras. [38]

La modificación post traduccional de una preprolipoproteína es llevada a cabo en bacterias Gram positivas por dos tipos en enzimas y en gram negativas por tres. En la **Figura** 2.3 se muestra el proceso completo, donde la primera enzima, una Lipoproteína diacilgliceril transferasa, por su traducción al inglés (Lgt), es la encargada del reconocimiento del péptido señal y de la unión convalente al grupo tiol del residuo conservado de Cisteína, obteniendo así una prolipoproteína. La segunda enzima, una Lipoproteína Señal peptidasa (Lsp) localizada en el retículo endoplasmático es la responsable de cortar el péptido señal; obteniendo así una nueva terminación amino, la cisteína modificada. Al encontrarse anclado el residuo lipídico en este último residuo, se entiende que este no tiene interacción mayor con el resto de la proteína. La modificación adicional tiene lugar en bacterias Gram negativas como se mencionó anteriormente, y es llevada a cado por una Lipoproteína N-acil transferasa (Lnt) la cual añade otro resto lipídico. Una vez


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

realizada estas modificaciones, nos encontraremos frente a una lipoproteína madura, mas hay estudios recientes en los que se muestra la presencia de una triacilación en algunos tipos de lipoproteínas, como LppX. [38–41]

### 2.3.1.1. Lipoproteína F (LprF):

La lipoproteína F (LprF) es una proteína de membrana de 260 aminoácidos que se encuentra presente en especies virulentas como *M. tuberculosis, M. bovis* y *M. caprae*, mas no en *M. smegmatis*. Esta última especie ha sido la encargada de ser el hospedador de vectores en el proceso de transgénesis, ya que es molecularmente parecida a *M. tuberculosis*. Se piensa que este tipo de proteínas se encuentran ancladas a la capa de ácidos micólicos y de arabinogalactano; por medio de una serie de modificaciones lipídicas en el residuo de Cisteína conservada, esta se encuentra en la posición N°39 en las tres especies de *Mycobacterium* estudiadas, precedida por un péptido señal valina, alanina y glicina. Esta es escindida posteriormente por una enzima peptidasa, quedando así sólo la secuencia proteica funcional de las lipoproteínas, desde el residuo 40 al 260. [39,41]

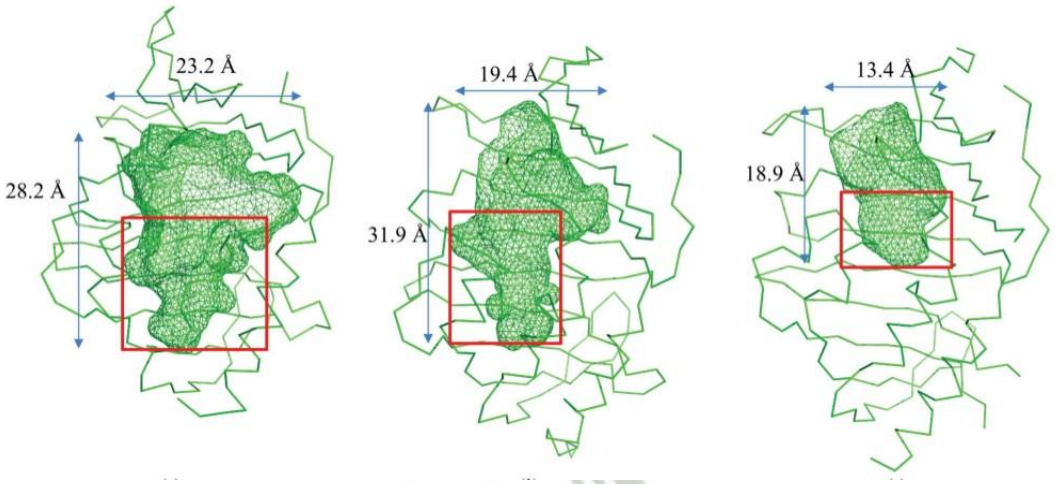



Figura 2.4: Comparación entre los bolsillos hidrofóbicos de LprG (izquierda), LprX (central) y LprF (derecha) en *Mycobacterium*. [42]

La LprF está compuesta por un plegamiento alfa/beta, una lámina de 11 hebras antiparalelas y otras cinco hélices opuestas. La zona hidrófoba de la lámina es responsable de formar uno de los bolsillos con las mismas características al darle cara a las hélices. La estructura general de este bolsillo consta de una entrada hacia el interior de la cavidad, en la cual encontramos residuos de Prolina, Alanina, Valina, Fenilalanina e Isoleucina. La hendidura no presenta una cavidad tan pronunciada como LppX ni como LprG (ver



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**Figura** 2.4), las cuales presentan una estructura similar a LprF tanto en el bolsillo hidrofóbico como en la conformación de láminas alfa y beta. Los bolsillos hidrofóbicos de estas otras lipoproteínas homólogas a LprF difieren entre básicamente por el tamaño del la [39,42]

Estudios realizados sobre la lipoproteína LprG, proteína homóloga a LprF, demostraron que esta sirve somo transportador de residuos triacilados de Fosfatidil-mio-inositol manosidos, de lipomanano o de lipoarabinogalactano. En contraste, LprF con una cavidad más pequeña que la reportada en LprG y LprX, puede albergar glicolípidos diacilados, los cuales pueden ser modificaciones de glicerofosfatos o fosfatidilinositol. Estos son el resultado intermedio de la síntesis de Lipoarabinomanano (LAM), llevados desde la membrana plasmática de glicolípidos triacilados y una vez que estos se encuentran listos para ser traslocados hacia la membrana externa, interaccionan con la cavidad hidrofófica mediante reacciones de la misma naturaleza para poder ser transportados, incrementando así la relación LAM:LM en la pared celular y contribuyendo a la patogenicidad de los microorganismos (ver **Figura** 2.5). [42–44]

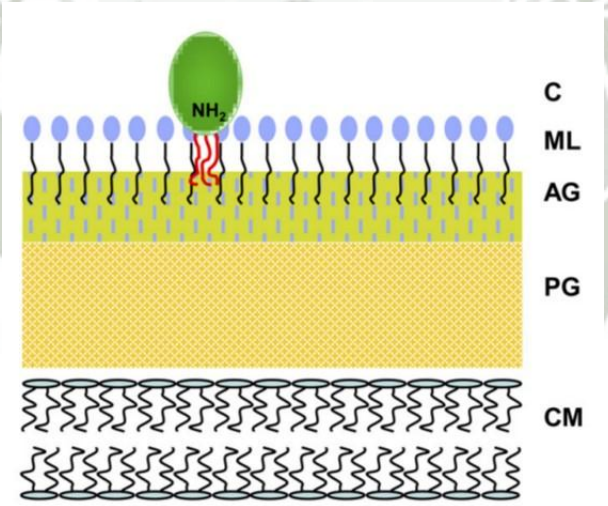



Figura 2.5: Representación esquemática del posible posicionamiento de las lipoproteínas en *Mycobacterium*. Donde, CM: membrana celular; PG: Péptidoglicano; AG: Arabinogalactano; ML: Capa de ácidos micólicos; C: Cápsula. [39]

Pero, ¿por qué LprF está envuelta en la patogenicidad de la micobacteria? Pues esto se resume en el residuo di-acilado que se alberga en la cavidad hidrofófica, que interacciona con diferentes receptores tipo Toll (TLR), específicamente el heterodímero TLR2-TLR6, reconociendo el glicolípido que es transportado y desencadenando así la respuesta inmunológica del hospedero. [39,45]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## 2.4. Tratamiento

### 2.4.1. En humanos

La sintomatología y el tratamiento de la tuberculosis se encuentra ampliamente estudiado; mas no se ha conseguido controlar la taza de contagios por la habilidad de los microorganismos de mutar cada que infectan a un grupo de personas diferentes, lo que conlleva un gran riesgo para la población en general; pues genera bacilos resistentes a determinados fármacos, lo que complica más el tratamiento.

Existen protocolos de tratamientos ya establecidos para evitar la generación de resistencia a drogas para este tipo de microorganismos; evitando así el fenómeno "fall and rise" (caída y elevación); el cual es generado cuando la población bacteriana logra superar el tratamiento luego de su iniciación con sólo un fármaco; lo que produce la invalidación total del medicamento para el paciente tratado.[46] Los fármacos de primera línea son el armamento primario para combatir la infección; luego se encuentran los de segunda línea como se muestra en la **Tabla** 2.2.

Tabla 2.2: Drogas de primera y segunda línea usadas para el tratamiento de la tuberculosis

| Línea | Fármaco | Acción |
|---|---|---|
| ***Primera*** | Isoniazida | Bactericida. |
| ***Primera*** | Rifampicina | Bactericida, esterilizante. |
| ***Primera*** | Pirazinamida | Bactericida, esterilizante. |
| ***Primera*** | Ethambutol | Bacteriostático. |
| ***Primera*** | Estreptomicina | Bactericida. |
| ***Segunda*** | Clofazimina | Bacteriostático, bactericida. |
| ***Segunda*** | Amikacina | Bactericida. |
| ***Segunda*** | Moxifloxacino | Bactericida. |
| ***Segunda*** | Levofloxacino | Bactericida. |

### 2.4.2. En animales: Bovinos y Caprinos

El control de la tuberculosis en animales es más complicado que en seres humanos, pues el tratamiento *per se* es largo; y una de sus principales desventajas es que fácilmente el microorganismo puede desarrollar resistencia a un medicamento, lo que pone en peligro la consigna principal de toda campaña: la erradicación. Esto ya que cada ejemplar



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

infectado es un potencial vector de contagio hacia otros animales y hombres; una prueba contundente de este peligro son las estadísticas obtenidas de la zoonosis, las que indican que la mayor parte de víctimas pertenecen continente africano, donde no hay un control del ganado. [21,22,47]

La resistencia innata de *M. bovis* a la pirazinamida complica el panorama de un supuesto tratamiento en animales, pues al tener uno ya estándar, el cual indica que se debe usar una mixtura de medicamentos de primera línea (Isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomicina, pirazinamida); que reduce el número de posibilidades de tratamiento. Esto crea una facilidad más grande de caer en el fenómeno de Fall and Rise, explicado anteriormente. [48,49]

Otro punto en contra para un posible tratamiento para la tuberculosis en animales es el impacto en la economía que podría causar el tratamiento en animales de 400 – 500 kg, en el caso de bovinos y de 50 – 60 kg, en el caso de caprinos; con el riesgo constante que el animal no responda al tratamiento, generando resistencias a fármacos; además de contemplar el gasto económico en mantener a los animales enfermos en un área especial. [21,50]

En resumen, tramitar un posible tratamiento para animales es difícil por los puntos expuestos en párrafos anteriores, por lo que los ganaderos eligen la solución rápida y eficaz para no tener riesgo que la infección se expanda; ya que puede llegar a contagiar al resto de los animales de la manada y a seres humanos también, como se explicó en otros incisos del Marco Teórico. Por estas razones, semestralmente se realizan controles para prever la infección del ganado frente a enfermedades, una de estas medidas tomadas para contrarrestar la tuberculosis es mediante la prueba de la tuberculina. Por lo que cuando un animal genera un resultado positivo frente a esta prueba, el animal es aislado y beneficiado (sacrificado) para evitar una propagación mayor de la enfermedad. [21,22,51]

### 2.4.3. Farmacología

Como se ha visto, el protocolo de tratamiento para la tuberculosis ha sido vastamente estudiado y estandarizado para vencer la carga bacteriana y evitar la generación de resistencias. En el presente estudio se hizo uso de un banco de drogas que encierra fármacos de primera y segunda generación, por lo que a continuación se explicará el uso de cada



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

uno de ellos en la terapia contra la tuberculosis, su respectivo mecanismo de acción y algunos datos fisicoquímicos adicionales.

### 2.4.3.1. Ácido para-aminosalicílico:

El ácido para-aminosalicílico es un agente anti-tuberculoso de uso sistémico con actividad bacteriostática frente a *M. tuberculosis*, esto quiere decir que evita la reproducción de las bacterias sin la destrucción de las mismas. Al compar su actividad con la de otros agentes anti tuberculosos, se podría decir que es débil. En el protocolo es común que sea usado con otras drogas como isoniazida o estreptomicina para evitar generar resistencia a los mismos.[52,53]

- **Fórmula molecular:**

$$C_7H_7N\,O_3$$

- **Mecanismo de acción:** Esta modificación del ácido salicílico funciona de manera similar a las sulfonamidas ya que es antagonista competitivo del ácido para-aminobenzoico (PABA), el cual es esencial para la síntesis del ácido fólico bacteriano y participa de forma parcial en la inhibición de la enzima dihidroteroato sinteasa. Esta última es responsable de insertar el PABA al precursor del ácido fólico, es decir el ácido dihidroteróico.[53–56]

- **Datos adicionales:** Este compuesto presenta una solubilidad de 1690 mg/L a 23°C. Además presenta un volumen de distribución de 1.001 L/kg y un coeficiente de partición (LogP) de 0.89. Como dosis letal media (LD50) presenta un valor práctico de 1.5761 mol/kg.[54,56]

### 2.4.3.2. Amikacina:

Amikacina es una droga semi sintética clasificada como aminoglucósido de amplio espectro derivada de la kanamicina con una apariencia de polvo casi blanco, muy soluble en agua pero insoluble en etanol y acetona. Se usa para infecciones graves producidas por bacterias gram negativas como *Pseudomona* y *Proteus*; pero también se suele usar como coadyugante en el tratamiento contra *M. avium* y *M. tuberculosis*. Es reno y oto –



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

tóxico, siendo estos sus principales efectos adversos, teniéndose así que administrar con precaución en personas con insuficiencia renal o con daño auditivo. [52,57]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{22}H_{43}N_5O_{13}$$

- **Mecanismo de acción:** La amikacina se une de manera inalterable a la subunidad bacteriana 30S ribosomal, de esta forma el RNAt no se lee correctamente, pues al bloquearlos se une a cuatro nucleótidos del RNAr 16S y a un aminoácido simple de la proteína S12 dentro de la subunidad 30S, siendo este el principal efecto. El nucleótido 1400 en 16S de RNAr de la subunidad 30S no podrá ser decodificado de forma correcta, por la tanto la interacción de este con el anticodón de RNAt nos conducirá a una interferencia con la iniciación de la traducción y a la lectura errónea de RNAm, lo que produce una inserción de los aminoácidos incorrectos generando la síntesis de las proteínas no funcionales o tóxicas. Esto se traduce en un efecto bactericida, conduciendo así a la disrupción de los polisomas. [58–60]

- **Datos adicionales:** Este compuesto clasificado presenta una dosis letal media (LD50) de 1.7506 mol/kg, un coeficiente de partición (LogP) de -7.4. Por otro lado se halló que presenta una solubilidad en agua de 1.85E+005 mg/L a 25°C y un volumen de distribución de 24 L. [58,60]

### 2.4.3.3. Bedaquilina:

La bedaquilina es un fármaco de segunda generación, que fue aceptada en el año 2012 por la agencia de gobierno de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés). Es un sólido de color blanco, insoluble en agua. Es clasificada como una diarilquinolina antimicobacteriana para el tratamiento de tuberculosis pulmonar multi-drogo resistente, la combinan con otras drogas para evitar la generación de resistencias. [61–63]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{32}H_{31}BrN_2O_2$$



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Mecanismo de acción:** Aunque el mecanismo de la bedaquilina no está completamente claro, se tiene una buena idea de cómo es que inicia. Existen hallazgos sobre el mecanismo de esta droga, los que indican que esta se une a la subunidad 50S del ribosoma 70S, inhibiendo así la síntesis de proteica. La subunidad 50S está compuesta por dos proteínas ribosómicas, L7 y L12, las cuales conforman el tallo de esta subunidad, el cual está estrechamente relacionado con la iniciación del proceso de traducción, lo que finaliza en una mala lectura de ARNm; por lo que las proteínas sintetizadas no son funcionales. Además, existe evidencia que muestra la retracción o inhibición de la actividad de la enzima GTPasa (dependiente del factor de elongación G), desencadenando el bloqueo de la síntesis proteíca mediada por ribosomas. Por otro lado, esta droga también se une a determinados constituyentes de la pared bacteriana, de esta forma inhibe la producción de determinados componentes de la misma. [52,64,65]

- **Datos adicionales:** Este fármaco que es considerado insoluble en agua tiene un valor de LogP de 7.13 y un volumen de distribución dde 164 L. Además tiene una dosis letal media de 2.7887 mol/kg. [61,62]

### 2.4.3.4. Capreomicina:

La capreomicina es un aminoglucósido de segunda generación aislada de algunas cepas *Streptomyces capreolus* con un aspecto blanquecino en forma de polvo, es soluble en agua pero prácticamente insoluble en disolventes orgánicos. Esta droga es usada para el tratamiento de tuberculosis en combinación con otros fármacos ya que este compuesto muestra resistencia cruzada con kanamicina y neomicina. [52,66,67]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{50}H_{88}N_{28}O_{15}$$

- **Mecanismo de acción:** Capreomicina tiene un efecto bactericida gracias a la inhibición de la fosforilación oxidativa, proceso por el cual se produce ATP, molécula energética necesaria para realizar todo proceso metabólico. La enzima afectada es la F1F0-ATP sintasa. Este tipo de biomoléculas, poseen dos dominios; F1 con un núcleo catalítico y F0 con un canal de protones hacia la membrana interna, estos



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

se encuentran unidos por dos tallos; uno central y otro periférico, los que forman un canal por el cual los protones podrán pasar desde el exterior al interior de la membrana. La subunidad oligomérica C de la F1F0-ATP sintasa es la molécula *target* o diana de bedaquilina, ya que es esencial para las reacciones metabólicas primarias y alternativas (como lo es la fosforilación a nivel sustrato). Además esta enzima no es capaz de realizar el proceso inverso (hidrólisis de de ATP); por lo tanto sólo se tiene una vía de producción de moléculas energéticas. [63,68,69]

- **Datos adicionales:** Este aminoglucósido se considera soluble en agua en su forma de sal de disulfato. Además, tiene un valor de LogP de -9.609 y la dosis letal media (LD50) calculada de forma experimental fue de 2.5199 mol/kg. [52,67]

### 2.4.3.5. Cicloserina:

La cicloserina es un antibiótico de segunda línea aislado de cepas bacterianas de *Streptomyces orchidaceus* o *S. gayphalus*; pero también puede ser sintetizada a partir de L-Serina. Tiene una presentación de polvo blanco o de color amarillo pálido, muy soluble en agua. Se suele administrar con otro fármacos ya que al administrarla sola, se generan resistencias fácilmente. [70,71]

- **Fórmula molecular:**

$$C_3H_6N_2O_2$$

- **Mecanismo de acción:** La cicloserina interfiere en la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que este compuesto compite con su análogo estructural, el aminoácido D-Alanina. Así, inhibe competitivamente dos procesos mediadiados por enzimas implicadas en la síntesis de la pared: el primer proceso es la conversión de D-alanina a partir de L-alanina por la acción de L-alanina racemasa; mientras que el segundo proceso es la incorporación de D-alanina en el pentapéptido necesario por la intervención de D-alanina sinteasa. De esta forma la cicloserina no permite la formación correcta del péptidoglicano, componente estructural importante en la composición de la pared celular, lo que finaliza en una lisis bacteriana. [52,72,73]

- **Datos adicionales:** Este antibiótico es soluble en agua a 25°C. Tiene un valor de



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

-0.9 como coeficiente de partición (LogP) y la dosis letal media (LD50) hallada de forma experimental reportada es de 1.3414 mol/kg. [52,72]

### 2.4.3.6. Clofazimina:

Clofazimina es una droga de segunda generación, un colorante de fenazida con propiedades bactericidas, muy liposoluble. Es usada generalmente para el tratamiento de tuberculosis, aunque en un inicio fue sintetizada para su administración en personas con lepra. Se usa siempre en combinción con otros fármacos, nunca solo ya que en este caso se desarrollan rápiddamente resistencias. Uno de los principales efectos secundarios es la coloración rojiza o marrón de tejidos y conjuntiva. [74,75]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{27}H_{22}Cl_2N_4$$

- **Mecanismo de acción:** El mecanismo específico de este fármaco se desconoce, pero se han realizado ensayos en los cuales se han obtenido resultados que nos indican que la clofazimina no tiene un mecanismo específico de acción. Hay indicios que indicarían la inhibición de la ARN polimerasa, dañando la replicación del DNA. La otra vía es la estimulación de la enzima fosfolipasa A2, lo que desencadenaría la producción de lisofosfolípidos que bloquean específicamente el transporte de potasio. [52,74,76,77]

- **Datos adicionales:** Se halló de forma práctica que este fármaco es 0.225 mg/L soluble en agua; es decir que es prácticamente insoluble. Presenta un coeficiente de partición (LogP) de 7.66. Así mismo, se halló de manera experimental la dosis letal media (LD50) obteniéndose un valor de 1.7821 mol/kg. [52,76,77]

### 2.4.3.7. Delamanid:

Delamanid es una droga de segunda generación recientemente descubierta. Es un derivado nitro-dihidro-imidazooxazol usado para el tratamiento de la tuberculosis multi-drogo resistente, con la compañía de otros fármacos para evitar la generación de resistencias. En el año 2014 fue aprobada por la Unión Europea, pasando satisfactoriamente las pruebas



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

de la Fase II, luego fue aprobada para las pruebas en fase III en países como el nuestro, Estonia, Latvia, Lituania, Moldova, Filipinas y parte de Sudáfrica. [78,79]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{25}H_{25}F_3N_4O_6$$

- **Mecanismo de acción:** Delamanid actúa específicamente contra las micobacterias por la inhibición sobre la biosíntesis del ácido micólico, lo que no permite la construcción de la pared celular de *Mycobacterium*, lo que facilita su entrada a través de la misma. Esta droga no tiene efecto sobre otras bacterias gram positivas, negativas o presentes en la flora intestinal. [79,80]

- **Datos adicionales:** Este fármaco es prácticamente insoluble, presenta un coeficiente de partición (LogP) 6.14 y un valor de volumen de distribución 2.100 L. [79,80]

### 2.4.3.8. Estreptomicina:

La estreptomicina es un antibiótico de la clase de aminoglucósidos, de primera línea y de amplio espectro que es producida por ciertas cepas de *Streptomyces griseus*. Tiene una apariencia de polvo blanco siendo esta sumamente soluble en agua. [52]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$$

- **Mecanismo de acción:** Esta droga actúa evitando la síntesis de proteínas, ya que se une de manera irreversible a la subunidad 16S de RNAr y a la proteína S12 de la subunidad 30S ribosómica. Algunos pueden llegar a unirse a la subunidad 50S. Así, es como que el antibiótico inhibe la síntesis proteica, pues no permite la interacción entre el RNAr y el ribosoma además de ocasionar una terminación prematura de la lectura traslacional, por interpretación errónea del RNAm. [81,82]

- **Datos adicionales:** Estreptomicina es un antibiótico ampliamente usado en diferentes tipos de infecciones; por lo que la mayoría de valores farmacocinéticos experimentales son hallados fácilmente. La solubilidad en agua es de 12.8 mg/mL,



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

el volumen de distribución toma un valor de 0.26 L/kg y el coeficiente de partición (LogP) de -6.4. Finalmente la dosis letal media (LD50) hallada fue de 1.8409 mol/kg. [81,82]

### 2.4.3.9. Ethambutol:

Ethambutol es un antibiótico de primera línea empleado para el tratamiento de tuberculosis y para la infección de otras micobacterias con características bacteriostáticas y antimibrobianas. Se presenta como un polvo cristalino blanco, soluble en agua y en etanol. Se debe emplear en el tratamiento en combinación con otros ya que puede generar fácilmente resistencias. Una de las principales contraindicaciones es la neuritis retrobulbar, por esta razón se emplea con suma precaución en niños y en pacientes con daño ocular. [52,83,84]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{10}H_{24}N_2O_2$$

- **Mecanismo de acción:** Ethambutol actúa inhibiendo la síntesis de ARN, actuando sobre la enzima arabinosil transferasa, impidiendo la polarización de arabino, molécula que participa en la biosíntesis de arabinogalactano y lipoarabinomanano. Estos últimos forman parte del esqueleto de la pared celular micobacteriana. El proceso concluye con una pared mucho más permeable a agentes quimioterapéuticos, deteniendo el crecimiento bacteriano. [85,86]

- **Datos adicionales:** Los principales datos farmacocinéticos de este antibiótico nos indican que presenta un coeficiente de partición (LogP) de -0.3, un volumen de distribución de 1.6 L/kg y presenta una solubilidad al agua de 7.58 mg/mL a 25°C. Por último se obtuvo que este fármaco tiene un valor de 2.2797 mol/kg como LD50. [52,84]

### 2.4.3.10. Etionamida:

Ethionamida es un antibiótico de senguda generación derivado de la nicotinamida. Esta indicada para el tratamiento de la tuberculosis resistente, especialmente cuando se presenta toxicidad a rifampicina e isoniazida. Siempre se administra en compañía de



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

otros medicamentos para evitar la formación de resistencias. Se presenta como un polvo amarillo brillante, se caracteriza por un moderado aroma a sulfuro, muy poco soluble en agua, cloroformo y éter. [52,87,88]

- **Fórmula molecular:**

$$C_8H_{10}N_2S$$

- **Mecanismo de acción:** La etionamida tiene un mecanismo de acción que aún no está completamente elucidado, pero sí se encontró evidencia que esta droga puede inhibir la síntesis de ácido micólico, por medio de interacción con enoyl-acyl ACP reductasa. Una vez que el fármaco interacciona con esta biomolécula, bloquea la síntesis de este tipo de ácidos grasos; lo cual finalmente concluye en una biosíntesis incompleta de la pared celular bacteriana ocasionando la lisis celular. [88,89]

- **Datos adicionales:** Este fármaco es considerado insoluble, con un volumen de distribución de 93.5; y un coeficiente de partición (LogP) de 0.5. Por otro lado la LD50 hallada de forma experimental de este compuesto es de 2.1316 mol/kg. [52,87]

### 2.4.3.11. Isoniazida:

Esta es la droga de primera línea derivada del ácido nicotínico, usado como la primera opción por excelencia en el tratamiento de la tuberculosis, al ser efectiva de bajo costo. Se presenta en forma de un polvo casi blanco inodoros e incoloros. Es soluble en agua y etanol, mas no en cloroformo y éter. [52,90]

- **Fórmula molecular:**

$$C_6H_7N_3O$$

- **Mecanismo de acción:** Isoniazida ataca a la síntesis de ácido micólico. Este fármaco requiere de una activación previa para volverse funcional, esta activación es llevada a cabo por enzimas multifuncionales, una catalasa-peroxidasa-proxynitritasa y otra NADH oxidasa. Su molécula diana aún no se encuentra elucidada del todo, pues hay estudios que nos indican que Isoniazida no tiene un sólo mecanismo de acción. Puede unirse de forma competitiva o irreversible, en su forma activada, a diferentes moléculas como InhA (reductasa que transporta a enoil-acilo, componente



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

involucrado en la síntesis de ácidos micólicos); además puede tener otros mecanismos dependientes de NAD+ como de NADP+ para interrumpir la síntesis de las moléculas lipídicas. [91,92]

- **Datos adicionales:** Este fármaco de primera línea es soluble en agua a 25 ˚C en una concentración de 1.400 mg/L, mostrando un volumen de distribución de 0.6 L/kg y un coeficiente de partición de -0.7. Por otro lado, datos experimentales reportan que esta droga presenta un dosis letal media (LD50) de 2.0713 mol/kg. [52,90]

### 2.4.3.12. Kanamicina:

Es un complejo de antibióticos aminoglucósidos que son producidos por *Stretomyces Kanamyceticus* aislada sólo de suelo japonés. Se presenta como un polvo blanco, soluble en agua pero insoluble en acetona, acetato de etilo y en benceno. Es una droga de segunda generación que se usa en combinación de otros fámacos para evitar reacciones cruzadas. [52,93]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$$

- **Mecanismo de acción:** La kanamicina ingresa a la bacteria por un transporte activo, actuando de forma igual que todos los aminiglucósidos, como la gentamicina, por ejemplo. Estos se unen de forma irreversible a la subunidad 30S y al 16S de ARNr. Además también interacciona con la proteína S12 ocasionando una lectura errónea del nucleótido 1400 del ARNr en 30S, de esta forma el ARNm inserta los aminoácidos incorrectos en los péptidos. Este proceso finaliza en una síntesis de proteínas no funcionales, por lo que la célula bacteriana termina lisada. [93–95]

- **Datos adicionales:** El coeficiente de partición (LogP) de este fármaco es reportado con un valor de -6.3; mientras que la LD50 obtenida es de 1.5431 mol/kg. [52,93]

### 2.4.3.13. Levofloxacino:

Levofloxacino es un antibiótico de amplio espectro y de tercera generación del grupo de las fluorquinolonas. Es dos veces más activo que su isómero S- (-) del ofloxacino. Además



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

este antibiótico es usado contra una gran variedad de infecciones del tracto respiratorio y urinario. [52,96]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{18}H_{20}FN_3O_4$$

- **Mecanismo de acción:** La forma en que actúa esta fluoroquinolona es simple, pues actúa sobre la enzima ADN girasa (la cual pertenece a la clase de topoisomerasas II bacteriana). Esta biomolécula es indispensable para la transcripción del RNA y para el proceso de replicación del DNA. Este proceso termina en un detenimiento del desarrollo bacteriano. [96,97]

- **Datos adicionales:** Levofloxacino presenta un valor de LogP de 2.1, además es considerado insoluble en agua. El valor experimental de la dosis letal media (LD50) es de 1478 mg/kg. [52,96,97]

### 2.4.3.14. Linezolid:

Linezolid es un agente antibacteriano sintético derivado de la oxazolidinona que es usado como una de los últimos recursos cuando se han generado diversas resistencias cruzadas a otros fármacos, tiene especial acción frente a infecciones causadas por bacterias Gram-positivas. Por esta razón es usada en el tratamiento de la tuberculosis multidrogo-resistente. [52,98]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{16}H_{20}FN_3O_4$$

- **Mecanismo de acción:** La forma en cómo actúa es nueva y diferente en comparación otros fármacos, por lo tanto es difícil generar resistencias cruzadas. Se postuló en distintos estudios que Linezolid inhibe la traducción bacteriana desde la iniciación. Este proceso tiene lugar entre un paso anterior a la elongación y luego de haber cargado la N-formilmetionina la cual es el iniciador de la molécula de RNAt. Esta droga tergiversa el sitio de unión entre iniciador y ARNt, uniéndose específicamente al RNA 23S ribosomal de la subunidad 50S para que de esta forma se evite la conformación del complejo 70S-iniciador. [98,99]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Datos adicionales:** Este antibiótico sintético es soluble en agua a una concentración de 3 mg/mL y a 25°C. Además datos experimentales reportan que este compuesto presenta un volumen de distribución de 50 L y un valor de LogP de 0.9. También se encontró en bases de datos confiables que presenta un valor de 2.4938 mol/Kg como dosis letal media (LD50). [52,98,99]

### 2.4.3.15. Moxifloxaxino:

Moxifloxacino es un antibiótico de cuarta generación la categoría de las fluorquinolonas, empleada para una gran variedad de infecciones, no tiene una probabilidad alta de generar resistencias, gracias al mecanismo de acción natural de las quinolonas. [100,101]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{21}H_{24}FN_3O_4$$

- **Mecanismo de acción:** La forma de inhibir el crecimiento bacteriano de este tipo de droga es típico de las quinolonas, como el ciprofloxacino. Este tipo de antibióticos inhiben la enzima topoisomerasa II, DNA girasa, la cual está involucrada en el "desdoblamiento" del DNA para luego poder ser replicado; además de bloquear la acción de la topoisomerasa IV. Este proceso termina en la muerte celular de las especies bacterianas sometidas a este tratamiento. [52,101,102]

- **Datos adicionales:** Moxifloxacino posee un volumen de distribución de 2.7 L/kg y un coeficiente de partición (LogP) de 2.9. Por otro lado el valor experimental de la Dosis letal media (LD50) se encuentra en 2.3267 mol/kg. [52,100,101]

### 2.4.3.16. Pirazinamida:

La pirazinamida es un agente antimicobacteriano bacteriostático y bactericida sintético derivado de la amida del ácido pirazinoico. Se presenta como un polvo blanco sin olor, muy soluble en agua, pero poco soluble en etanol. Es una droga de primera línea que siempre es acompañado de otros medicamentos para evitar la formación de resistencias, además parece ser sólo activa frente *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que se requiere mayores pruebas para aceptar este postulado. [52,103]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Fórmula molecular:**

$$C_5H_5N_3O$$

- **Mecanismo de acción:** La pirazinamida requiere una activación dentro de la micobacteria, la cual es ejercida por la enzima pirazinamidasa, la cual convierte el fármaco en ácido pirazinoico que tiende a acumularse dentro de la micobacteria en condiciones ácidas. Se sabe que el ácido pirazinoico inhibe la enzima FAS I (biomolécula encargada de sintetizar los ácidos grasos necesarios en la pared celular). Por otra vía se encuentra que la forma activa de la pirazinamida es capaz de desenergizar la membrana y que interfiere en la función de transporte de la membrana al pH ácido. Adicionalmente, se estudió la hipótesis que el ácido pirazinoico interacciona de manera irreversible a la proteína ribosómica S1 (RpsA), inhibiendo la traduc- ción. Esta última hipótesis explicaría la facultad de la pirazinamida de eliminar a las micobacterias incativas. [103–105]

- **Datos adicionales:** Este fármaco es soluble en agua a una concentración de 1.500 mg/L a una temperatura de 25˚C y un coeficiente de partición (LogP) de -0.6. También se encontró en datos experimentales que la dosis letal media (LD50) es de 1.8145 mol/kg. [52,104,105]

### 2.4.3.17. Rifabutina:

La rifabutina es un antibiótico semisintético de la clase de las rifamicinas. Es usado comúnmente en el tratamiento de infecciones en pacientes con SIDA, pero también tiene actividad contra micobacterias, por lo que se encuentra entre las drogas principales usadas contra la tuberculosis. Se presenta en forma de un polvo rojo-violeta, muy poco soluble en agua pero bastante soluble etanol. [52,106]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{46}H_{62}N_4O_{11}$$

- **Mecanismo de acción:** Este antibiótico tiene una actividad bactericida, actuando sobre la RNA polimerasa dependiente del DNA, inhinbiendo su actividad. Es así como anula la síntesis de RNA. [107,108]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **Datos adicionales:** Este compuesto posee una solubilidad en agua muy disminuida, con tan sólo 0.19 mg/mL. El coeficiente de partición (LogP) es de 4.1, mientras que otros datos experimentales nos indican que la dosis letal media (LD50) es de 2.5143 mol/kg. [52,107]

#### 2.4.3.18. Rifampicina:

La rifampicina es un antibiótico semi sintético derivado de la rifamicina, extraído de *Streptomyces mediterranei*. Es uno de los fármacos de amplio espectro de primera línea que son administrados en el tratamiento de la tuberculosis. Tiene la apariencia de un polvo pardo rojizo, muy poco soluble en agua, etanol y acetona. [109,110]

- **Fórmula molecular:**

$$C_{43}H_{58}N_4O_{12}$$

- **Mecanismo de acción:** La forma de acción de la rifampicina es igual al mecanismo de acción de la ributina. Esta droga interfiere en la sintesis proteica por su bloqueo de la RNA polimerasa (dependiente del DNA). [110–112]

- **Datos adicionales:** Distintos estudios nos brindan datos experimentales de este fármaco; como la dosis letal media (LD50) que es reportada con un valor de 2.6875 mol/kg. Además de otros datos farmacocinéticos como el coeficiente de partición (LogP) con un valor de 2.7, volumen de distribución con 1.6 L/kg. Por último se reporta que rifampicina es soluble en agua en una concentración de 1400 mg/L a 25°C. [110–112]

## 2.5. Biología y química computacional

Desde el nacimiento de las ciencias computacionales, estas se han crecido de forma exponencial convirtiéndose una herramienta fundamental para la ciencia. La fusión de estas ramas con la biología o la química dio como resultado una ola de nuevas metodologías que hicieron posible por ejemplo, el almacenamiento de datos biológicos que antes no podían ser siquiera analizados, hicieron también posible la simulación de reaciones que *in*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

*vivo* se llevan a cabo en porciones de segundos. Es así, como nacieron herramientas para realizar con más eficacia los cálculos de mecánica molecular y de mecánica cuántica, con ayuda de los super computadores o clusters que se caracterizan por realizar en tiempos muy reducidos cálculos en el campo de la física, química y biología que hace años atrás simplemente no se podían realizar. [113]

### 2.5.1. Mecánica cuántica:

La mecánica cuántica (QM) es una de las grandes ramas de la física, esta trata de explicar mediante ecuaciones las leyes que rigen los movimientos de los átomos y de partículas subatómicas. Esta corriente fue provocada inicialmente por dos fenómenos que movieron los cimientos de la física clásica, la catástrofe ultravioleta (Radiación de un cuerpo negro) y el efecto fotoeléctrico. Luego de algunos años de incertidumbre, en 1925 la nueva teoría de la mecánica cuántica fue explicada y desarollada por Erwin Schrödinger y Werner Heisenberg; aunque en un inicio fueron tomadas como explicaciones diferentes, luego de unos años se demostró que eran matemáticamente equivalentes. [114,115]

Al resolver la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo (3.1), se podrá obtener una función de onda que depende del tiempo y de la posición de las partículas en el plano cartesiano, estas características nos describen el estado de un sistema estudiado. [114,116]

$$H\psi = ih\frac{\partial}{\partial t}\psi \qquad (2.1)$$

Donde:

- H, se denomina Hamiltoniano, es un operador que nos brinda información de los electrones y del núcleo del sistema.
- *ih*, Variables físicas que toman la forma de operadores al resolver la ecuación de onda.
- $\psi$, función electrónica de onda.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

#### 2.5.1.1. Optimización geométrica:

La optimización geométrica de una molécula o partícula se refiere a hallar la estructura en la cual esta se encuentra con una energía mínima y en su posición más estable.

Esto se inicia de las cordenadas cartesianas que contituyen la geometría inicial de la molécula a analizar, una vez obtenida la energía inicial o energía cero, los parámetros que caracterizan al sistema estudiado sufren pequeños incrementos, de tal forma que la energía total del sistema alcanza un mínimo, llamado "mínimo global", basándose en las derivadas de la energía con respecto a todos los grados de libertad. Es deseable poder hallar este valor energético en el menor tiempo posible.[112]

La forma más básica para el cálculo de la geometría optimizada de un compuesto, se llama "Steepest decent", donde se miden las variaciones energéticas del sistema relacionadas a las perturbaciones; siguiendo esta metodología hasta hallar que estos cambios en la energía es menor al tope definido. El procedimiento se repetiá las veces necesarias hasta hallar un mínimo global no estrecho. Existen otros procedimientos más refinados y con un mayor coste computacional, pero sólo son requeridos en casos específicos, como por ejemplo para la optimización geométrica de una estructura que se encuentra cerca a su mínima energía.[117]

### 2.5.2. Mecánica molecular:

A diferencia de la mecánica cuántica, la cual tiene el número de átomos como principal restricción, la teoría de la mecánica molecular (MM) o de campos de fuerza puede trabajar con sistemas grandes con un número grande de átomos como el DNA, enzimas de interés, etc; esta hace uso de la aproximación de Born-Oppenheimer que desdobla la ecuación de Schrödinger en dos; una que tiene en cuenta los electrones y otra que no. En MM usamos la segunda aproximación, la cual indica que debemos ignorar tajantemente el movimiento de los electrones pues estos podrían re acomodarse en base a la disposición final de los núcleos atómicos del sistema (ver **Figura** 2.6).[118,119]

Este método de campos de fuerza, explica la energía potencial del sistema en base a la resistencia entre los factores determinantes: la vibración de los enlaces y ángulos, los potenciales de torsión, y las fuerzas no enlazantes como las interacciones electrostáticas



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

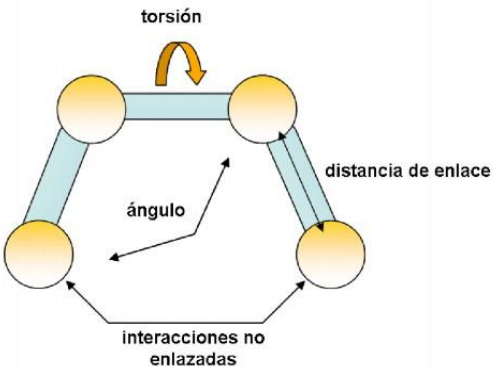



Figura 2.6: Representación gráfica de las interacciones enlazantes y no enlazantes dentro de un campo de fuerza. [117]

y de Van der Waals. Teóricamente cada átomo puede considerarse un campo de fuerza individual, pero una de las características de la Mecánica Molecular es que puede ser transferible; esto quiere decir que con las ecuaciones que toman en cuenta las características mencionadas del átomo; se pueden realizar cálculos en otros sistemas (en moléculas o conjuntos de estas). [117,118]

Todo campo de fuerza esta conformado por una base de datos donde constan los .Atom types.º tipos de átomos, los cuales caracterizan al átomo según parámetros como hibridación o carga, estos son diferentes en cada tipo de campo (OPLS, GROMOS, CHARMM, AMBER). También en esta base de datos encontraremos una serie de datos recompilados a partir de cálculos de mecánica cuántica o de forma experimental. Finalmente también consta la ecuación de energía potencial con la cual se calcula todas las fuerzas a partir de los parámetros guardados en el archivo llamado "Force Field" (Campo de fuerza). [117,120] La ecuación 3.2 engloba a los términos enlazantes y no enlazantes explicados anteriormente:

$$E(R) = \sum_{uniones} \frac{ki}{2}(d_i - d_{i,0})^2 + \sum_{angulos} \frac{ki}{2}(\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{torsiones} \frac{Vn}{2}(1 - cos(\eta\omega - \gamma))^2 \quad (2.2)$$

Donde:

- E(R) se refiere a la energía de no unión. Se describe como la adición del potencial electrostático y de Lennar-Jones.
- Los términos de uniones y ángulos se refiere a la energía de estiramiento y dobla-



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

miento de los enlaces.

- El término de Torsiones, como su nombre lo dice, se refiere a las torsiones de los átomos.

#### 2.5.2.1. Modelamiento proteico:

Las macromoléculas que están presentes en todos los procesos biológicos son proteínas, son largas cadenas de péptidos y están conformadas por aminoácidos. Estas son moléculas orgánicas que tienen un extremo amino (-NH2) y otro carboxilo (-COOH), se encuentran unidos entre sí por medio de un enlace amida, este tipo de interacciones covalentes se repiten las veces que sean necesarias hasta formar una larga cadena de aminoácidos denominada polipéptido.

El primer paso, antes de seguir cualquier tipo de metodología, es buscar de forma correcta la secuencia de la proteína que nos interesa, para esto existen bases de datos primarias (como Swiss-Prot, PIR, MIPS, entre otras); secundarias (PROSITE, Profiles, BLOCKS, entre otras); y de estructuras (la más conocida Protein Data Bank PDB). [121]

Las proteínas tienen varios grados de estructuración: primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria; donde la conformación estructural o tridimensional está dada por las estructuras secundarias y terciarias. Per, ¿qué sucede cuando no hallamos un tipo de proteína en la base de datos porque aún no ha sido trabajada en forma de cristal? Para este tipo de problemática la solución es realizar un modelamiento proteico, el cual lo podemos definir como el conjunto de técnicas computacionales que nos permite la predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas a través de una estimación espacial de todos los átomos que conforman la secuencia de aminoácidos que dan lugar a la proteína en estudio. [122,123]

Existen diferentes metodologías para la predicción de estructuras funcionales de las proteínas, una de ellas es el modelado comparativo. Esta metodología observa la conformación similar de las proteínas con relaciones evolutivas cercanas, y nos presentan la teoría que estas deberán ser homólogas en la mayor parte de la secuencia modelada. Este procedimiento es muy usado ya que reproduce modelos proteicos confiables. Pero se debe considerar ciertos detalles, pues se debe saber elegir muy bien la secuencia molde, ya que



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

esta debe tener más de un 25 % de similitud a la secuencia problema (en algunos casos puntuales este requerimiento no es necesario), pero aún más importante es realizar un buen alineamiento entre las secuencias pues aunque el número de residuos conservados sea alto es probable que estos no ocupen la misma posición referente en la estructura de la proteína. [117,123,124]

Otra metodología usa el perfil físico-químico (número de aminoácidos hidrofóbicos, perfil de accesibilidad, hidrofobicidad, índices de estabilidad, promedio de hidropatía), de cada aminoácido para predecir la probabilidad por ejemplo que tienen de ocupar un lugar en el plano espacial, en hélice alfa o lámina beta; en una región hidrofóbica o hidrofílica. [125,126]

Pero, ¿qué ocurre cuando nuestra proteína problema no tiene otra proteína homóloga o similar? Este es un problema mínimo en la metodología Ab initio (de novo). Esta toma la estructura proteica como el supuesto estado native con el mínimo de energía global libre, toman como punto de partida pequeñas secuencias de aminoácidos con energía libre baja para construir un modelo tridimensional de la secuencia en cuestión. [127,128]

### 2.5.2.2. Minimización de energía:

Para poder iniciar una simulación de mecánica molecular es necesario contar con una molécula que se encuentre en el nivel mínimo de energía global. Pero, ¿qué ocurre cuando no es este el caso? La respuesta es casi obvia: Minimización de energía, la cual es necesaria para evitar solapamientos atómicos a causa de tensiones en los átomos o para corregir distorsiones de enlaces o ángulos.

Este es uno de los principales pasos requeridos en la metodología y es simple de comprender. Como ya se explicó en puntos anteriores, la energía potencial de una molécula viene dada por la suma de sus fuerzas enlazantes y no enlazantes. Lo que realiza un paquete computacional de mecánica molecular, como por ejemplo Gromacs, son pequeños cambios conformacionales en los átomos de toda la molécula; luego realiza un cálculo de energía potencial y la compara con la inicial. En caso que la nueva energía calculada no sea menor a esta, el átomo volverá a su posición inicial. En un ciclo o en un step, cada átomo se mueve sólo una vez, por lo que a veces son necesarios cientos de steps para llegar a la convergecia de la molécula. [129]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

### 2.5.2.3. Dinámica molecular:

La dinámica molecular es el paso que le sigue a una minimización de energía para poder obtener una molécula estabilizada. Este paso nos permitirá analizar a profundidad cómo es que la molécula en estudio y los átomos que la conforman evolucionan a través del tiempo de simulación. Para llegar a esto, las ecuaciones de la ley del movimiento de Newton (ec. 3.3) debe ser integrada, obteniendo como resultado final un archivo donde consten las trayectorias, velocidades y posiciones finales de los átomos y su respectiva variación en el tiempo.

$$\frac{\partial^2 \mathrm{F}}{\partial^2 \mathrm{m}} = \frac{\partial^2 \mathrm{x}}{\partial^2 \mathrm{t}} \tag{2.3}$$

Donde:

- *F* es la segunda derivada de la fuerza calculada de interacciones inter atómicas sobre la segunda derivada de la masa.
- *x* es la segunda derivada de la velocidad respecto a la segunda derivada del tiempo.

  La resolución diferencial de esta ecuación nos dará como resultado las posiciones y velocidades de todos los átomos del sistema en estudio.

Existen básicamente dos tipos de algoritmos para calcular las velocidades y posiciones nuevas del sistema por cada pico o nano segundo transcurrido de la simulación, uno de los más conocidos, el integrador de Verlet calcula las posiciones actules de cada átomo *R(t + dt)* basándose en las posiciones y aceleraciones de un tiempo t y de un paso anterior al tiempo t tomado *R(t – dt)*, usando la ecuación 3.4:[130]

$$\mathrm{R(t + dt)} = 2\mathrm{R(t)} - \mathrm{R(t - dt)} + \mathrm{dt^2 A(t)} \tag{2.4}$$

Al momento de realizar la dinámica molecular de una molécula se podrá elegir básicamente entre dos tipos de solvatación, la simulación en solvente implícito y explícito. Esta última añade de forma detallada las moléculas de agua que se desean en el sistema mientras que en una simulación con solvente implícito, añaden el efecto del solvente sin que este se encuentre en la simulación.[117,120]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Como resultado de una simulación de dinámica molecular podremos obtener los efectos de los ensambles elegidos para la dinámica molecular, los cuales están encargados de mantener constantes valores como de temperatura o presión, así como la metodología de solvatación que se usó y las interacciones que tendrá la molécula diana con este y con los diferentes componentes del sistema, así como la topología final del objeto de estudio, fuerzas finales y demás datos recolectables.

### 2.5.2.4. Acoplamiento y energía libre de Gibbs:

En el campo de las ciencias biológicas e híbridas como lo es la biotecnología, es de suma importancia contar con herramientas que nos faciliten el entendimiento de algunas reacciones que nos brinden la posibilidad de realizar aproximaciones para obtener un punto de partida en una investigación. Es así como el día de hoy contamos con paquetes de biología y química computacional para poder analizar cómo es que un ligando se une a determinado receptor, dónde lo hace y por supuesto; si es que esta unión es espontánea.

El acoplamiento o también llamado "Docking" es una metodología que puede buscar e identificar posibles uniones y/o conformaciones entre un ligando y un receptor en un lugar o lugares específico(s) de unión; aunque también puede darse entre sólo un receptor y muchos ligandos, en tal caso se le llama "virtual screening". Este es simplemente una pequeña adaptación del acoplamiento convencional, esta herramienta es muy útil en el diseño de fármacos ya que permite observar el tipo de interacción de los átomos del ligando con los aminoácidos más cercanos al sitio activo donde se encuentra el bolsillo o "pocket", además de analizar el puntaje que se obtiene para cada ligando. Existen tres tipos de interacciones, lo que nos permite elegir el tipo de acoplamiento según nuestra necesidad: [131,132]

- Acoplamiento de cuerpo rígido: receptor y ligando no están sujetos a modificaciones. Esta es la metodología usada en el presente trabajo.
- Acoplamiento de ligando flexible: Sólo el ligando o los ligandos están sujetos a modificaciones conformacionales.
- Acoplamiento flexible: Ambas moléculas, ligando y receptor, pueden estar sujetas o no a modificaciones estructurales.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La energía libre (ΔG) nos indica cuán espontánea puede ser una reacción, es decir si esta puede tener lugar en la naturaleza sin la acción de un catalizador. Mientras más negativa sea esta, es más probable que el proceso ocurra. Esta será calculada en la ecuación 3.5 por la suma de varios términos:

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{solvente} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{\frac{t}{r}} + \Delta G_{vib} \qquad (2.5)$$

Donde:

- ΔG *solvente*, la energía libre del solvente es la que se despliega de las interacciones de la macromolécula, el o los ligandos y el complejo con el solvente.
- ΔG *conf*, la energía de los cambios conformacionales que el receptor y el ligando pueden haber tenido.
- ΔG *int*, la energía libre de las interacciones ligando – receptor.
- ΔG *rot*, la energía libre de rotación perdida por cada prueba o rotación del ligando.
- ΔG *t/r*, la energía libre perdida por las traslaciones y rotaciones.
- ΔG *vib* es sobre la energía libre de los cambios vibracionales. [133]

### 2.5.2.5. Validaciones:

Al obtener las secuencias de las moléculas estabilizadas luego de una minimización de energía y de una simulación de dinámica molecula, es necesario realizar algunos cálculos adicionales para poder validar y evaluar la fiabilidad de los modelos estructurales obtenidos por medio de herramientas que nos ayuden a contrastar nuestros resultados con otros.

***Desviación cuadrática media (RSMD):***

Esta es la media de la distancia media entre la estructura inicial con respecto a la estructura final; se usan los átomos del esqueleto principal; analizando el cambio de posición de los átomos con respecto al tiempo de simulación. Deberíamos obtener una diferencia en promedio de 0 a 0.2 nm para que el equilibrio de la estructura sea aceptado y validado. [117,134]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(r_{i,sim} - r_{i,expr})^2}{N}} \quad (2.6)$$

La ecuación 2.6 plasma cómo es que la desviación media cuadrática (Root Mean Square Desviation) es calculada, siendo ”N“ el número de átomos de la macromolécula y ”r“ las posiciones de las estructuras en el eje cartesiano.

***Desviación cuadrática media de la fluctuación de los residuos (RMSF):***

Esta mide la desviación estándar por residuo luego de haberse ajustado a una referencia, esta desviación o diferencia es medida a partir de los carbonos alfa de la cadena y de cómo fluctuan en cada paso. [117,134] Esta es calculada por la ecuación 2.7.

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T}\sum_{t=1}^{T}(r_{i,sim} - r_{i,expt})^2} \quad (2.7)$$

***Radio de giro:***

Es una herramienta que analiza de forma cuantitativa las propiedades de distribución de masas en los ejes x, y, z, del plano cartesiano con respecto al tiempo de simulación. Usaremos esta herramienta para tener medida aproximada de la capacidad de una proteína de compactarse. [134] Gromacs lo calcula según la ecuación 2.8.

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.8)$$

Donde:

- Donde *mi* es la masa y *ri* el radio de un átomo *i* con respecto al centro de masa de la molécula.

***Diagrama de Ramachandran:***

Fue creado por el bioquímico hindú Gopalasamudram Narayana Ramachandran en asociación con Viswanathan Sasisekharan. Este diagrama 2D es de ayuda para la validación de nuestra estructura, el cual plotea la torsión de los ángulos diédricos *psi* versus *phi* de la cadena principal de la proteína, los que son responsables de la flexibilidad y de que la proteína adope determinado pliegue (ver **Figura** 2.7).

Existen combinaciones de ángulos típicos en las estructuras de α- hélice y lamina β,



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

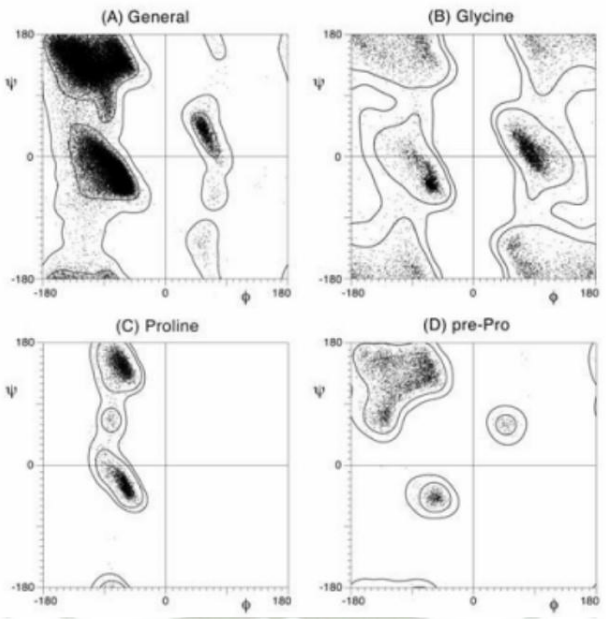



Figura 2.7: Explicación del Diagrama de Ramachandran, en un recuadro general, de glicina, Prolina y de Pre-prolina [75].

generando una vista simple de la conformación estructural, además de proporcionar las regiones excluidas donde se encuentran las posibles rotaciones que no están permitidas debido al efecto estérico, es decir las colisiones entre los átomos de la proteína. El diagrama está compuesto por tres cuadrantes; el primero muestra las combinaciones de la hélice α del lado izquierdo, mientras que el tercero muestra los de la derecha con los giros o bucles; y por ultimo el segundo cuadrante nos brinda las combinaciones de la hoja β. [135–137]

Con esto se concluye el Marco Teórico, ahora se da paso a la explicación de la Metodología usada en este trabajo, donde se encontrarán todos los paquetes computacionales, servidores usados y los pasos seguidos para luego dar paso al análisis de resultados y a la discusión de los mismos.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Capítulo 3

# Metodología

## 3.1. Detalles Computacionales

**HARDWARE:**

- Workstation con 64 GB de memoria RAM y 3 discos duros de 1, 4 y 6 TB; 2 Tarjetas Gráficas NVIDIA GeForce GTX 1080.

**SOFTWARE:**

- **GROMACS 2016.3.** Este es un paquete computacional de alto rendimiento, un software de código abierto, que permite al usuario realizar simulaciones de dinámica molecular. Se basa en el cálculo de las ecuaciones de energía potencial para obtener la energía total del sistema. [138]
- **UCSF CHIMERA-1.11.2.** Es una herramienta para el análisis y la visualización de biomoléculas y de datos relacionados con estas. [139]
- **VMD**. Es otra herramienta diseñada para la visualización, modificación y análisis de sistemas biológicos como estructuras proteicas. [140]
- **MOLDEN 5.7.** Es una herramienta de la metodología *ab initio* para mostrar la densidad molecular y visualización de moléculas de los paquetes computacionales como GAUSSIAN y otro similares. [141]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- **LIGPLOT V.4.5.3.** Este es un visualizador que ayuda al análisis de las interacciones proteína-ligando, realizando un acercamiento entre aminoácidos y átomos. [142]

- **Modeller 9.19.** Es un paquete computacional que realiza un alineamiento de secuencias similares en base a un target modelo, predice la estructura terciaria de otras secuencias gracias al modelamiento por homología. [124]

- **Gaussian 09.** Este es un paquete computacional de mecánica cuántica que resuelve la ecuación de Schrödinger en base a la teoría de orbitales moleculares. [143]

- **Gaussview 6.** Es la versión gráfica de Gaussian, en la cual se pueden construir y modelar las estructuras atómicas, antes de realizar los cálculos. [144]

- **iGemdock v2.1.** Este es un programa para realizar procesos de *virtual screening*, es decir una serie de docking entre un receptor biológico y varios ligandos. Además, ayuda en el análisis y entendimiento de los complejos por medio de una función de puntuaciones. [145]

- **Avogadro 1.90.0.** Es un editor y visualizador de moléculas, usado generalmente en técnicas computacionales como modelado molecular, bioinformática, ciencias de materiales y otras que están estrechamente relacionadas en el uso de herramientas virtuales. [?]

**SERVIDORES:**

- **RAMPAGE.** Es un servidor en el cual se puede submitir la secuencia PDB estabilizada y como resultado, obtendremos los gráficos Ramachandran de las estructuras, donde se habrá hecho un cálculo de los ángulos de la misma. [146]

- **Protein Data Bank (PDB).** Base de datos en la que se submiten todas las estructuras 3D biológicas como ácidos nucleicos y proteínas encontradas en todos los organismos. [147]

- **PockDrug (Pocket Druggability Prediction).** Es un servidor que predice la formación de bolsillos hidrofóbicos comparando modelos estadísticos, basándose en el análisis selectivo lineal de descriptores de diferentes métodos de estimación de bolsillo. [148]



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Análisis de las estructuras

1. Se realizó la búsqueda de las secuencias de lipoproteínas bacterianas presentes en tres especies de *Mycobacterium* en las bases de datos confiables como NCBI (National Center for Biotechnology Information), PDB (Protein Data Bank), PROSITE y Swiss-Prot.

2. Se buscó el tratamiento indicado para la tuberculosis, seleccionando los fármacos de primera y segunda línea en las bases de datos NCBI, PubChem y DrugBank.

### 3.2.2. Optimización de la geometría

1. Se contruyó las estructuras tomadas de la base de datos PubChem en Gaussview y se revisó la correcta conformación estructural en coordenadas *.xyz* para su posterior uso, guardándolo en una extensión *.gjf*.

2. Se realizó una optimización de la geometría (reacomodamiento óptimo de los átomos) de cada estructura obtenida del paso anterior, usando el paquete computacional de mecánica cuántica Gaussian. El archivo de entrada deberá tener una cabecera, la que debe indicar el número de procesadores involucrados en el cálculo, seguida de la memoria. Mediante el comando %chk = Nombre − archivo.chk se le dió la orden al programa de crear un archivo de respaldo llamado CHECKPOINT. Se indicó la funcional híbrida y la base: CAM-B3LYP/TZVP, con una carga neta de 0 y multiplicidad 1, mediante el comando:

   g09 input.gif >output.log

3. Luego se calcularon las cargas de Hirshfeld de manera similar. Sólo se agregó el comando *Pop=Hirshfeld* en la cabecera para que estas sean obtnenidas en el archivo *.log*.

4. Las coordenadas obtenidas por el programa fueron dispuestas en un archivo aparte para poder guardarlas en la extensión *.gjf*, luego se realizó la conversión a la extensión *.pdb* por medio de Gaussview.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

5. Se determinó el potencia electrostático de los fármacos optimizados mediante el programa Avogadro, creando la superficie coloreada con el archivo en extensión *.pdb*.

### 3.2.3. Modelamiento estructural

1. Se modeló la estructura secundaria de las secuencias de lipoproteínas halladas en las bases de datos mencionadas en el paso anterior por la metodología de modela- miento por homología con el paquete computacional Modeller. Para esto, se buscó y descargó la secuencia de una proteína perteneciente a una especie igual o similar en la base de datos Protein Data Bank para usarla como *template*. Luego, se reali- zó un alineamiento o BLAST de las estructuras primarias en base a la estructura template y se observó el porcentaje de homología que mostró cada una de las se- cuencias diana. Luego de este paso, se realizó el modelamiento en base a la teoría de homología de cada estructura elegida.

### 3.2.4. Simulación de dinámica molecular

1. Las tres secuencias de las lipoproteínas obtenidas del proceso de homologación fueron sometidos a una dinámica molecular. Para esto fue necesario realizar una neutralización, una minimización de las energías y finalmente la dinámica molecular en el paquete computacional GROMACS.

2. La simulación consta de dos pasos: Neutralización en fase gas y dinámica en el equilibrio. El orden y las varientes de los comandos pueden diferir entre las diferentes moléculas y los parámetros deseados. El orden en que se usó los comandos será explicado a continuación:

   **Neutralización en fase gas**

   La secuencia de los comandos fue simple: editconf, solvate, pdb2gmx, grompp. Hasta este punto se obtuvo una primera topología y su refinamiento. Genion, pdb2gmx, grompp, mdrun; para poder a escribir la nueva topología de nuestro sistema con los iones de Cl añadidos. La cantidad de estos iones difiere entre especie de proteína a otra, ya que son sistemas diferentes.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**Dinámica en el equilibrio**

En esta parte del cálculo, los comandos fueron: editconf, pdb2gmx, grompp, mdrun; en esta parte se realizó una minimización de las energías. Luego se pasó a la dinámica molecular con pdb2gmx, grompp, mdrun, se volvió a escribir la topología de las ultimas coordenadas resultantes del proceso de minimización y se finalizó con la dinámica final en un tiempo de 100 nanosegundos en el caso de las proteínas.

3. A continuación se dará una breve explicación de los comandos usados:

**gmx editconf**

Este comando nos permite tomar el archivo de entrada para llevarlo al formato nativo *.gro* e incluirlo en una caja de un tamaño apropiado para cada una de las moléculas. En el caso de todas las nuestras se trató de una caja cúbica (*-bt cubic*). Además, la proteína se centró (*-c*), la distancia fue calculada desde la medida más larga de la proteína (*-d 1*) y además se realizó una re enumeración de los aminoácidos. Todo comando tiene un archivo de salida, siempre llamándolo con (*-o*).

gmx editconf -f archivo.gro -bt cubic -d 1 -c -resnr 1

**gmx solvate**

Este comando se encarga de la solvatación de nuestro sistema. Es decir, aquí el programa da a elegir el tipo de solvente o las moléculas de agua con las que queremos que la caja de nuestro sistema se llene. Se especifica el soluto (archivo generado en el paso anterior) con el comando (*-cp*), el solvente (*-cs spc216.gro*) y llamando el archivo de salida. También se puede trabajar sin solvente, tomando el nombre de solvente implícito.

gmx solvate -cp archivo.gro -cs spc216.gro -o archivo-01.gro

**gmx pdb2gmx**

Lo que pdb2gmx realiza es leer un archivo en formato (-f .gro), y crear la topología según el campo de fuerza deseado. En nuestro caso se seleccionó el OPLS-AA (*-ff oplsaa*) y brinda como resultado un archivo donde encontraremos el archivo (*-p .top*) de nuestra molécula, donde se describe las interacciones existentes entre los



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

átomos. Además, genera otros archivos de salida como (*-i .itp*) que es necesario para la generación del archivo de topología y finalmente el archivo general de salida (*-o .gro*).

gmx pdb2gmx -nice 0 -f archivo-01.gro -p archivo-01.top -o archivo-02.gro -i archivo-01.itp -chainsep interactive

**gmx grompp**

Grompp es la abreviación de GROMACS PREPROCESSOR. Este realiza una inspección de los archivos generados en pdb2gmx, especialmente la topología y expande este archivo de una descripción molecular a una atómica y genera el siguiente archivo necesario para un paso subsiguiente (*-o .tpr*). Lee al archivo de entrada (*-c .gro*), .mdp (mínima o nvt), los que contienen toda la información de la simulación así como los parámetros deseados.

gmx grompp -f minima.mdp -c archivo-02.gro -p archivo-01.top -o archivo-01.tpr -po archivo-01.mdp

**gmx genion**

Genion reemplaza las moléculas de solvente con iones monoatómicos en las posiciones con potenciales electrostáticos más favorables, en nuestro caso fueron átomos de *Cl*. Esto se realiza para poder obtner una carga neta del sistema en cero (*-neutral*), leyendo el archivo *.tpr* y generando el típico archivo de salida. En nuestro caso se realizó inmediatamente después de este paso, nuevamente un pdb2gmx para generar una topología actualizada de nuestro sistema con los iones añadidos; así como un grompp para que el programa pueda inspeccionar la nueva topología generada.

gmx genion -s archivo-01.tpr -o archivo-03.gro -neutral

**gmx mdrun**

Este es el comando primordial de la dinámica molecular. mdrun deberá leer el archivo de entrada generado en grompp (*-s .tpr*), generando uno donde consten las trajectorias de cada uno de los átomos en una versión extendida (*-o .trr*) y en su



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

versión comprimida (*-x .xtc*); además un archivo donde se podrán encontrar los detalles de las energías generadas y usadas (*-e .edr*), uno donde se hallarán las coordenadas de la estructura en el último paso de la simulación (*-c .gro*). Adicionalmente se pueden agregar otras opciones para recuperar datos de cada uno de los cálculos en caso esta se detenga (*-cpi archivo.cpt*) y los gpu usados, en nuestro caso fue 1.

```
gmx mdrun -nice 0 -v -s archivo-01.tpr -o nuev.trr -x nuev.xtc -c archivo-final.gro
-e archivo.edr -cpi archivo.cpt -gpu_id 1
```

### 3.2.5. Validación de estructuras moleculares

1. Una vez que las estructuras proteicas fueron obtenidas de la simulación de dinámica molecular, fue necesario someterlas a análisis estructurales. Parte de las herramientas que se usó para los análisis están incluídas en GROMACS:

**Desviación Media Cuadrática de la Estructura Cristalina o Root-mean-square deviation (RMSD)**

Este es un comando de GROMACS para calcular la desviación media de los cuadrados, la cual se ejecutó en la última carpeta de Dinámica en el equilibrio. Se observó el ploteo y cómo ha evolucionado la estructura en el tiempo de simulación. Se ejecutó con el siguiente comando:

```
gmx rms -s archivo.tpr -f archivo.trr -o RMSD.xvg
```

**Desviación Media Cuadrática de la fluctuación de los residuos o Root-mean-square fluctuation (RMSF)**

Herramienta usada para validaciones, viene implementada en GROMACS, acá se observará la fluctuación que existe por residuo, brindando la facilidad de ubicar y analizar el residuo que tuvo muchas vibraciones a lo largo de la simulación. Se obtiene digitando el siguiente comando:

```
gmx rmsf -s archivo.tpr -f archivo.trr -o RMSF.xvg -b 50000 -res
```



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**Radio de giro (GYRATE)**

Nos brinda una medida aproximada de la capacidad de nuestra proteína de compactarse. Calcúlese desde la zona de convergencia de la proteína de la siguiente forma:

gmx rmsf -s archivo.tpr -f archivo.trr -o GYRATE.xvg -b 50000

2. Se realizó el cálculo de las estructuras promedio con la ayuda de la extensión de GROMACS, gmx covar. La cual calcula la estructura más estable desde el tiempo en el que la proteína convergió. Se halló por medio del siguiente comando:

gmx covar -s archivo.tpr -f archivo.xtc -b 50000 -av Archivo-final.pdb -tu ps

3. La última herramienta usada para la validación de las estructuras proteicas es el diagrama de Ramachandran, pero esta se realizó por medio del servidor RAMPAGE. Sólo se subió la última estructura obtenida promedio calculada por GROMACS a este servidor y analizar los diagramas obtenidos.

### 3.2.6. *Virtual screening* de las especies lipoproteicas con ligandos

1. Se realizó la predicción de los sitios activos de las tres estructuras proteicas tratadas, por medio del servidor PockDrug. En este servidor se sube en formato PDB la estructura, sin iones ni ningún tipo de molécula extra en la opción de *Druggability Prediction using protein*. Este servidor nos brindó los resultados con esperar tan sólo unos segundos.

2. Mediante el programa iGemdocK v2.1 se realizó los ensambles entre cada una de las lipoproteínas y los ligandos ya optimizados. Este programa tiene una inferfaz gráfica muy amigable con el usuario ya que al entrar al programa se observó dos pestañas: Prepare binding site, donde se añadió la proteína el receptor; y luego en Prepare compounds, donde se submitió toda la carpeta de ligandos elegidos. Seguidamente, en la pestaña Set output path se dio una ruta donde le indicamos al programa la carpeta de obtención de archivos de salida. Se le indicó al programa que



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

nos brindara 3 soluciones por ligando, en la pestaña de "preferencias". Finalmente se usó la opción de Drug screening en la opción Default setting.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Capítulo 4

# Resultados y Discusión

## 4.1. Análisis de las estructuras

En el NCBI se encontró un total de 5075, 357 y 134 modelos secuenciales de lipoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* respectivamente. Mientras que la lipoproteína F (LprF) se encontró en menor cantidad: 46, 32 y 1 para *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae* respectivamente.

Se conoce que la lipoproteína F es una proteína transmembrana presente en las especies de *Mycobacterium* mencionadas anteriormente implicada en el transporte de biomoléculas necesarias para la biosíntesis de lipoarabinomanano y lipomanano en la pared celular de estos microorganismos, por lo que requiere de una modificación post traduccional previamente para incorporarse y poder ser anclada a la parte externa de la membrana lipídica.

Así mismo se identificó que la lipoproteína F (LprF) presentó 261 aminoácidos, diferenciándose entre sí sólo por un residuo. En la **Tabla** 4.1 se presenta información de la secuencia bajo el contexto *.fasta*, en el cual se aprecia el código de acceso despúes del " > ", de igual forma notamos que las tres presentan el residuo de inicio (Metionina), lo cual se da porque estas secuencias provienen de un cDNA, para el caso de estudio estos residuos iniciales fueron eliminados; así como los aminoácidos que brindan la secuencia del péptido señal.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.1: Secuencias Fasta de LprF, reportadas en el NCBI (National Center of Biotechnology Information)

| Nº | Microorganismo | Secuencia (fasta) |
|---|---|---|
| 1 | *M. tuberculosis* | >ANZ82043.1 LprF [Mycobacterium tuberculosis]<br>MNGLISQACGSHRPRRPSSLGAVAILIAATLFATVVAGCGKK<br>PTTASSPSPGSPSPEAQQILQDSSKATKGLHSVHVVVTVNN<br>LSTLPFESVDADVTNQPQGNGQAVGNAKVRMKPNTPVVATE<br>FLVTNKTMYTKRGGDYVSVGPAEKIYDPGIILDKDRGLGAV<br>VGQVQNPTIQGRDAIDGLATVKVSGTIDAAVIDPIVPQLGK<br>GGGRLPITLWIVDTNASTPAPAANLVRMVIDKDQGNVDITL<br>SNWGAPVTIPNPVG |
| 2 | *M. bovis* | >ALA77846.1 Lipoprotein LprF [Mycobacterium bovis BCG]<br>MNGLISQACGSHRPRRPSSLGAVAILIAATLFATVVAGCGKKPT<br>TASSPSPGSPSPEAQQILQDSSKATKGLHSVHVVVTVNNLSTL<br>PFESVDADVTNQPQGNGQAVGNAKVRMKPNTPVVATEFLV<br>TNKTMYTKRGGDYVSVGPAEKIYDPGIILDKDRGLGAVVGQ<br>VQNPTIQGRDAIDGLATVKVSGTIDAAVIDPIVPQLGKGGGRLP<br>ITLWIVDTNASTPAPAANLVRMVIDKDQGNVDITLSNWGAPV<br>TIPNPAG |
| 3 | *M. caprae* | >CEJ52603.1 Putative lipoprotein LprF [Mycobacterium caprae]<br>MNGLISQACGSHRPRRPSSLGAVAILIAATLFATVVAGCGK<br>KPTTASSPSPGSPSPEAQQILQDSSKATKGLHSVHVVVTVNNL<br>STLPFESVDADVTNQPQGNGQAVGNAKVRMKPNTPVVATEF<br>LVTNKTMYTKRGGDYVSVGPAEKIYDPGIILDKDRGLGAVVG<br>QVQNPTIQGRDAIDGLATVKVSGTIDAAVIDPIVPQLGKGGGRL<br>PITLWIVDTNASTPAPAANLVRMVIDKDQGNVDITLSNWGAPV<br>TIPNPAG |

De igual forma, se revisó los tratamientos reportados para la tuberculosis en humanos y posibles tratamientos paliativos en animales. Se recolectó fármacos de primera y segunda generación, todos usados en combinación entre ellos para sinergizar el efecto bactericida, además de evitar la generación de resistencias en el tratamiento de humanos.

No se discriminaron por el mecanismo de acción de cada uno de ellos, ya que como se ha mencionado en párrafos anteriores, el tratamiento en humanos usa la combinación de varios fármacos para evitar la generación de resistencias, por lo que el microorganismo es atacado por más de una vía. Los fármacos seleccionados se muestran en la **Tabla** 4.2. Por otro lado, no se halló reporte alguno sobre tratamientos paliativos en animales para este estudio.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.2: Ligandos elegidos, reportados en el PubChem. CID: Número de identificación del compuesto.

| Nº | Fármaco | Peso Molecular (g/mol) | Código CID |
|---|---|---|---|
| **1** | Ac. P-aminosalicílico | 153.137 | 4649 |
| **2** | Amikacina | 585.608 | 37768 |
| **3** | Bedaquilina | 555.516 | 5388906 |
| **4** | Capreomicina | 1321.435 | 3032401 |
| **5** | Cicloserina | 102.093 | 6234 |
| **6** | Clofazimina | 473.401 | 2794 |
| **7** | Delamanid | 534.492 | 6480466 |
| **8** | Estreptomicina | 581.580 | 19649 |
| **9** | Ethambutol | 204.314 | 14054 |
| **10** | Etionamida | 166.242 | 2761171 |
| **11** | Isoniazida | 137.142 | 3767 |
| **12** | Kanamicina | 484.503 | 6032 |
| **13** | Levofloxacino | 361.373 | 149096 |
| **14** | Linezolid | 337.351 | 441401 |
| **15** | Moxifloxacino | 401.438 | 152946 |
| **16** | Pirazinamida | 123.115 | 1046 |
| **17** | Rifabutina | 847.019 | 6323490 |
| **18** | Rifampicina | 822.953 | 5381226 |

## 4.2. Optimización de la geometría de los ligandos

La optimización de la geometría por medio de mecánica cuántica (QM) realizada a los fármacos obtenidos nos brindó como resultado un total de 18 ligandos. Estos presentaron una carga total de cero luego de realizar la sumatoria de las cargas de cada átomo por medio de las cargas de Hirshfeld obtenidas del segundo proceso para la preparación de los ligandos.

Es así como la optimización geométrica y el cálculo de las cargas fundamentales de Hirshfeld se realizaron con el fin de determinar la posición de los átomos en su estado fundamental de un mínimo global, de cada una de las estructuras obtenidas de la búsqueda realizada en las principles bases de datos como PubChem. Dichas estructuras pueden ser observadas en la **Tabla** 4.3, donde se podrá encontrar la comparación entre las estructuras en formato 2D y las obtenidas del proceso de optimización.

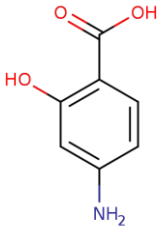
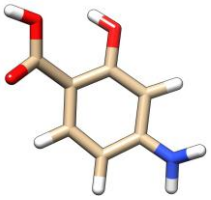
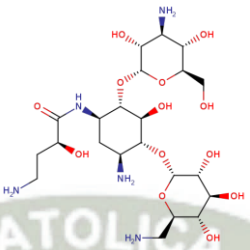
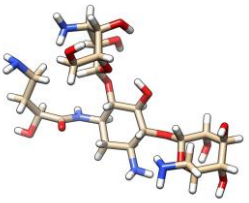
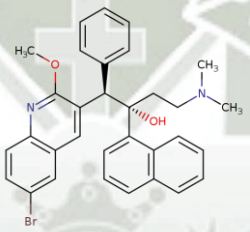
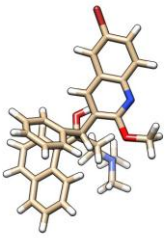
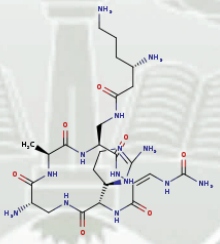
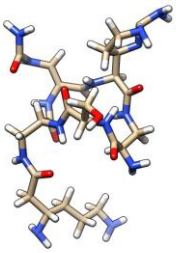
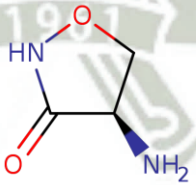
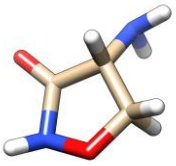
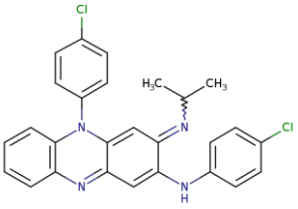
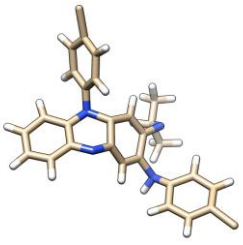


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.3: Comparación de la estructura 2D y la optimizada en Gaussian de los ligandos.

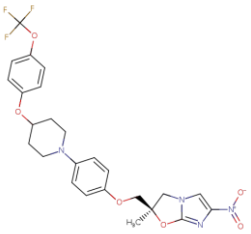
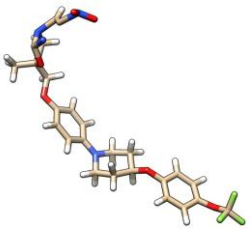
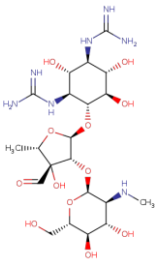
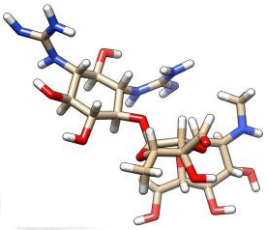
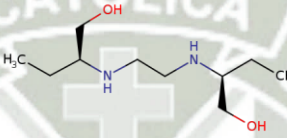
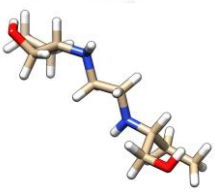
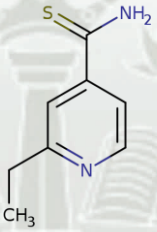
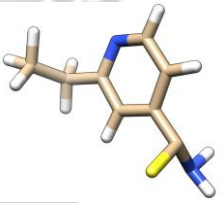
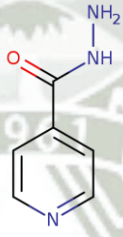
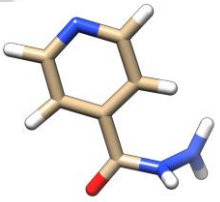
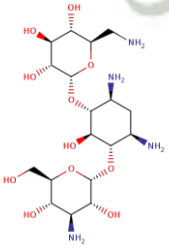
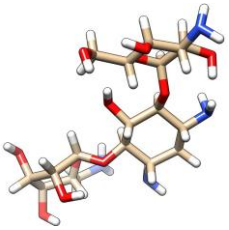
| Nº | Fármaco | Estructura 2D | Estructura Opt. |
|---|---|---|---|
| 1 | Ac. P-aminosalicílico |  |  |
| 2 | Amikacina |  |  |
| 3 | Bedaquilina |  |  |
| 4 | Capreomicina |  |  |
| 5 | Cicloserina |  |  |
| 6 | Clofazimina |  |  |



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

| | | | |
|---|---|---|---|
| **7** | Delamanid |  |  |
| **8** | Estreptomicina |  |  |
| **9** | Ethambutol |  |  |
| **10** | Etionamida |  |  |
| **11** | Isoniazida |  |  |
| **12** | Kanamicina |  |  |

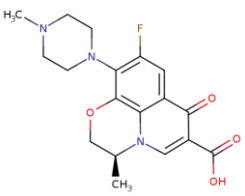


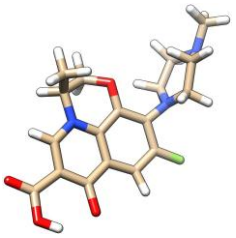
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

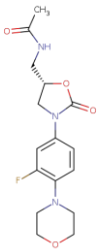
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

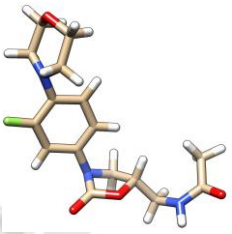
**13** Levofloxacino



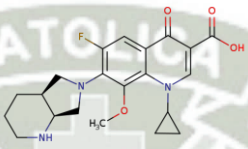


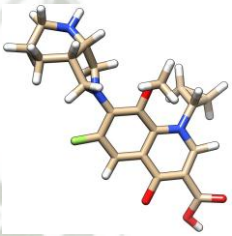
**14** Linezolid



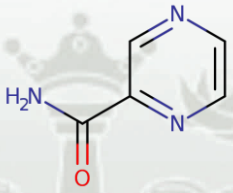


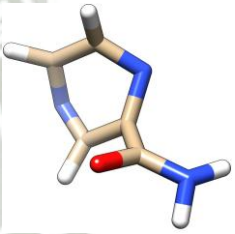
**15** Moxifloxacino



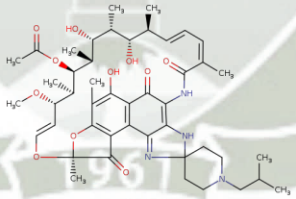


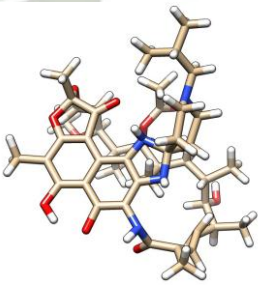
**16** Pirazinamida



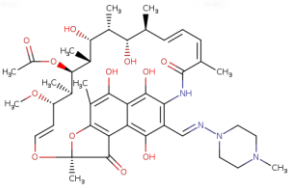


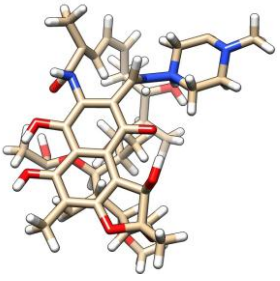
**17** Rifabutina





**18** Rifampicina





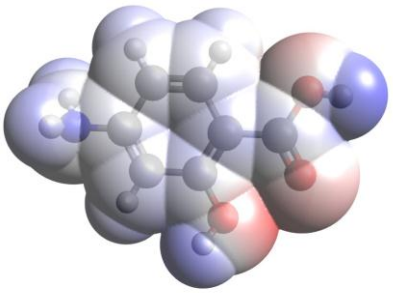


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

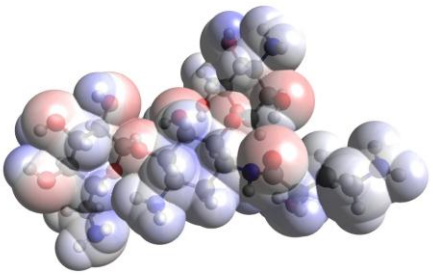
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

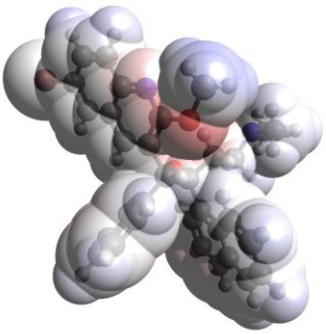
Seguidamente se determinó el potencial electrostático de los 18 fármacos; el cual nos indica las zonas cargadas positiva o negativamente de cada una de las moléculas. Las coloreadas de color rojo son las zonas cargadas negativamente (electrofílicos). Esto indica que tienen pares de electrones libres, lo que las hace susceptibles a ataques nucleofílicos. Por otro lado, las que presentan una coloración azul se encuentran cargadas positivamente (nucleofílicos), lo que las hace propensas a ataques electrofílicos. Sin embargo, las moléculas que a pesar de estar coloreadas pero de forma muy tenue son consideradas como moléculas hidrofóbicas y buenas opciones para interactuar en ambientes de la misma naturaleza, ya que al no presentar cargas significativas es menos probable que tengan afinidad por solventes polares, como lo es el agua.



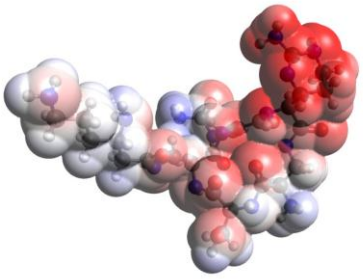
(a) Ácido P-aminosalicílico



(b) Amikacina



(c) Bedaquilina



(d) Capreomicina

Figura 4.1: Potencial electrostático I.

Como se puede observar en la **Figura** 4.1, las moléculas presentadas en los incisos **"a"**, **"b"** y **"c"** (ácido P-aminosalicílico, Amikacina y Bedaquilina; respectivamente) podrían mostrar el comportamiento hidrofóbico explicado anteriormente; pues se observa las coloraciones roja y azul muy tenuemente. De forma opuesta, en el caso de Capreomicina

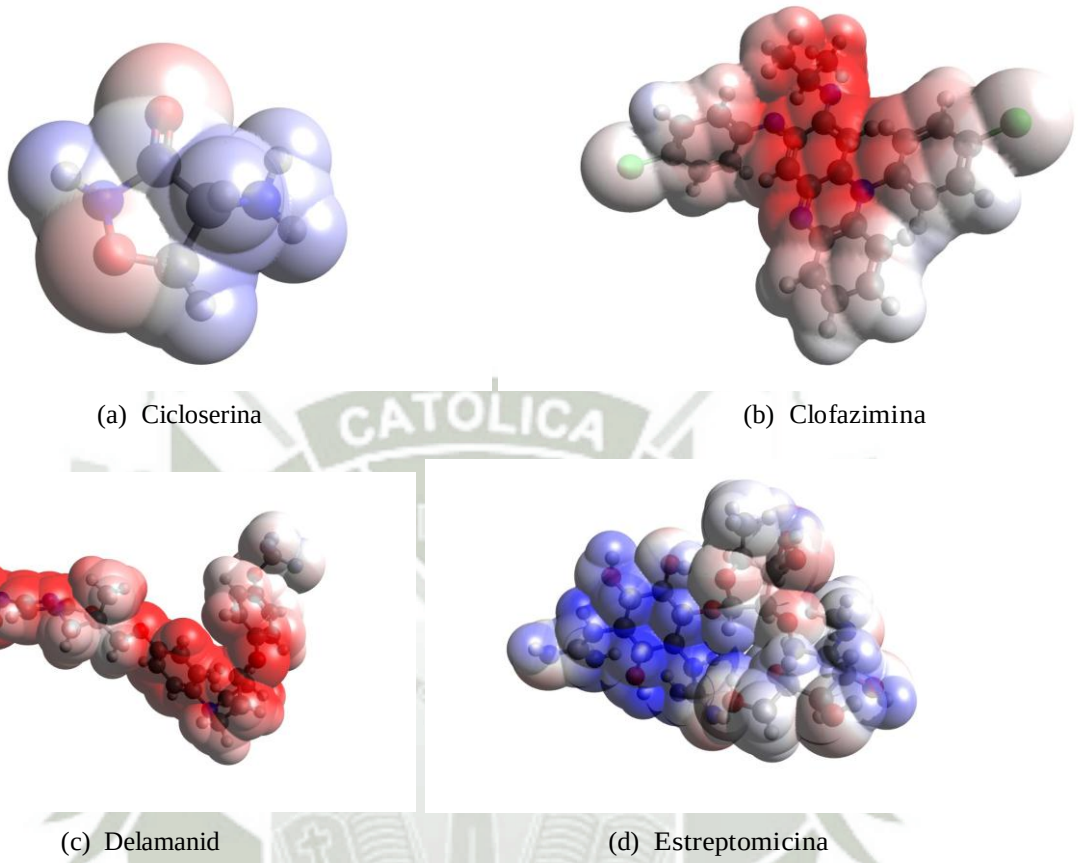


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

(inciso **"d"**), muestra una zona altamente electrofílica en la cadena lateral derecha, esto debido a la presencia de nitrógenos. Esta característica la hace reactiva en ambientes hidrofílicos.



(a) Cicloserina (b) Clofazimina

(c) Delamanid (d) Estreptomicina

Figura 4.2: Potencial electrostático II.

De manera similar, se puede observar en la **Figura** 4.2, dos fármacos electrofílicos, debido a la coloración roja explicada. El primero se muestra en el inciso **"b"** (Clofazimina), la cual muestra en el centro de su estructura una zona susceptible a ataques nucleofílicos. De manera similar en el inciso **"c"** perteneciente a Delamanid pues muestra la misma característica sobre la cadena principal de la molécula, distienguiéndola por la coloración. Por otro lado se observa en la misma ilustración el caso de Estreptomicina (inciso **"d"**), pues este fármaco muestra un comportamiento nucleofílico debido al tono azul que se observa en la zona central de la molécula. De forma opuesta el único que presentaría un comportamiento hidrofóbico es el fármaco Cicloserina, mostrado en el inciso **"a"**, guiándonos del color que presenta el potencial electrostático calculado; pues la



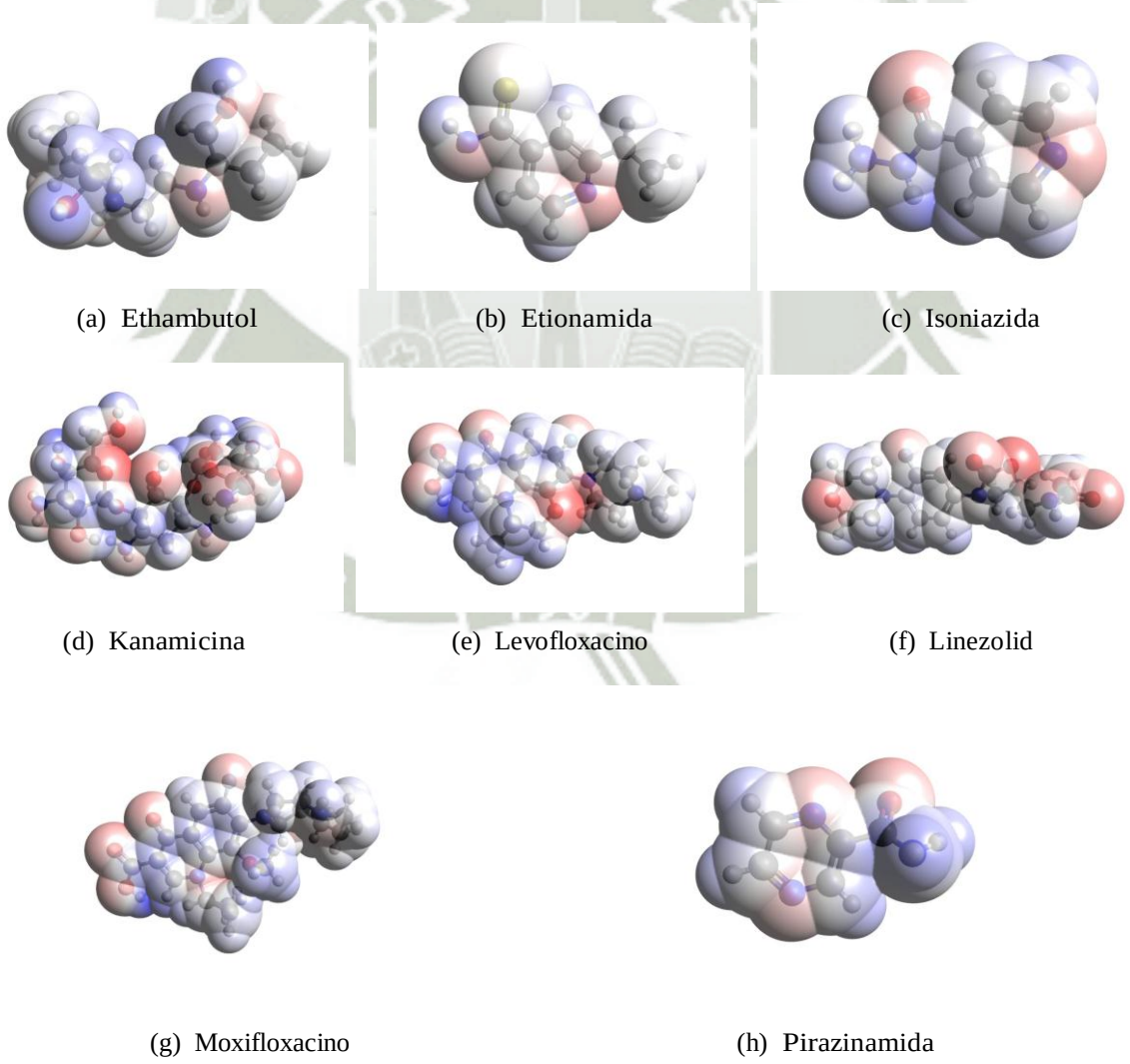
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

coloración que este presenta es bastante tenue, debido a que todos los electrones que este posee se encuentran apareados o compartidos con el átomo más cercano; lo que nos da a entender que esta molécula se encuentra neutra.

Por otro lado, los fármacos mostrados en la **Figura** 4.3 mostrarían el mismo comportamiento de interacción en ambientes hidrofóbicos, debido a que son considerados neutros por la tenue coloración del potencial electrostático calculado en cada una de las moléculas; con leves diferencias entre ellas. Por ejemplo, Kanamicina que se encuentra en el inciso **"d"** posee coloraciones rojas ligeramente más intensas a diferencia de las otras estructuras; mas no por este detalle se le considera electrofílico. De manera similar, el caso de Ethambutol (inciso **"a"**); pues este posee zonas levemente nucleofílicas, pero no se le considera un compuesto de esta naturaleza.



(a) Ethambutol (b) Etionamida (c) Isoniazida

(d) Kanamicina (e) Levofloxacino (f) Linezolid

(g) Moxifloxacino (h) Pirazinamida

Figura 4.3: Potencial electrostático III.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Finalmente, los últimos dos fármacos usados para esta simulación se encuentran en la **Figura** 4.4. En el inciso **"a"** observamos que el potencial electrostático de Rifabutina calculado muestra una zona electrofílica debido a la presencia de oxígenos en la zona de coloración roja, los que se encuentran en la cadena central de la estructura.

Por otro lado, el potencial correspondiente a Rifampicina, que se encuentra en el inciso **"b"**, muestra una zona altamente nucleofílica correspondiente a los ciclos que presentan átomos de nitrógeno en la cadena lateral de la estructura, es por esto que se presentó una coloración azul, lo que nos indica que la zona coloreada muestra una carga positiva; en comparación con el potencial de Rifabutina, la que muestra claramente una carga negativa.

(a) Rifabutina (b) Rifampicina

Figura 4.4: Potencial electrostático V.

## 4.3. Simulación de Dinámica Molecular

### 4.3.1. Modelamiento estructural de la lipoproteína F (LprF)

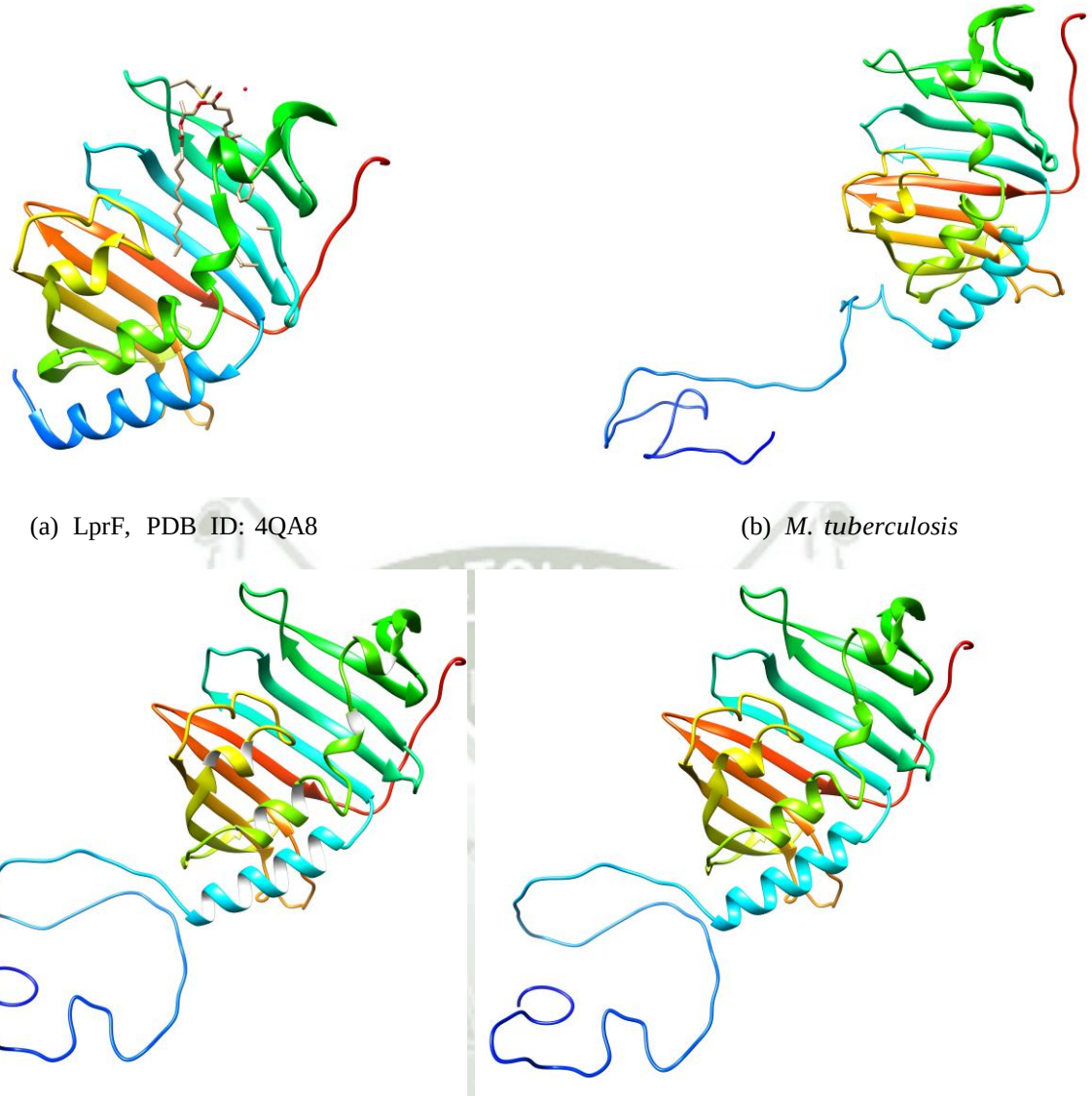
Para el modelamiento se usó única plantilla disponible en el PDB, la cual corresponde a una lipoproteína de *M. bovis* bajo el código de entrada 4QA8 (ver **Figura** 4.5(a)).



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) LprF, PDB ID: 4QA8

(b) *M. tuberculosis*

(c) *M. bovis*

(d) *M. caprae*

Figura 4.5: Estructuras 3D modeladas de LprF de las especies *Mycobaterium.*

Esta se encuentra en el gen LPRF MB1403, fue expresada en *Escherichia coli* y está clasificada como un transportador lipídico. Además, la estructura fue determinada por cristalografía de rayos X y en una resolución de 1.1 Å. Esta cuenta con 261 aminoácidos, mas en la plantilla usada sólo consideran la secuencia comprendida entre los aminoácidos 40-261 ya que no tomaron en cuenta el péptido señal relacionado al anclaje de la proteína. En esta estructura también se encontró una la molécula de un glicolípido diacilado (nombre IUPAC: (2R)-2-(dodecanoyloxy)propyl (4E,6E,8E,10E,12E)-pentadeca-4,6,8,10,12-pentaenoate), proveniente del transporte de estos metabolitos para la síntesis de algunas porciones de la pared celular; este interacciona en usus extremos con el interior



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

del principal bolsillo con los aminoácidos situados en el tope; como Val77, Val79, Val96, Ala106, Tyr150, Pro152, Ile155, Leu162 e Ile245, principalmente.

Además, la estructura cristalizada fue hallada con moléculas de agua, las cuales fueron retiradas para el proceso de modelamiento, debido a que podrían causar problemas al momento de realizar el proceso de modelamiento proteico y de simulación de dinámica molecular. Así mismo se consideró la secuencia de aminoácidos completa de las estructuras en estudio para su alineación y el posterior modelado. Una vez concluido el proceso de modelamiento se obtuvieron 03 estructuras, como se muestra en la **Figura** 4.5; donde se muestra primero la plantilla obtenida del PDB, seguida de las proteínas modeladas.

Así mismo, recolectó los porcentajes de homología para cada especie, los que se presentan en la **Tabla** 4.4 En esta podemos ver que ambas secuencias muestran una alta homología entre ellas, manteniendo sitios conservados a lo largo del tiempo. La secuencia que mostró el 100 % es el caso de *M. bovis*, debido que actualmente solo se encuentra reportada una plantilla de estructura cristal de LprF de la especie *M. bovis*.

Tabla 4.4: Porcentajes de homología reportados para cada especie de *Mycobacterium*.

| **Nº** | **Especie** | **% de homología** |
|---|---|---|
| **1** | *M. tuberculosis* | 99.728 |
| **2** | *M. bovis* | 100.000 |
| **3** | *M. caprae* | 99.983 |

### 4.3.2. Dinámica Molecular

De acuerdo al artículo reportado Jin-Sik Kim en su artículo sobre la lipoproteína F (LprF) en el año 2014[42] (puede ver **Figura** 2.3), donde se trabajó omitiendo la secuencia que codifica el pétido señal comprendido entre los aminoácidos 01-39, nos indica que en esta sección se encuentra el un residuo de cisteína para el anclaje de la proteína a la membrana de las micobacterias la que está sujeta a las modificaciones post-traduccionales que fueron mencionadas en el marco teórico. Por esta razón se vio por conveniente eliminar la región que codifica a este péptido señal ya que no es una zona de nuestro interés; pues se busca comprender la actividad de la región expuesta a un ambiente hidrofílico, para ver el efecto de los ligandos en estudio.

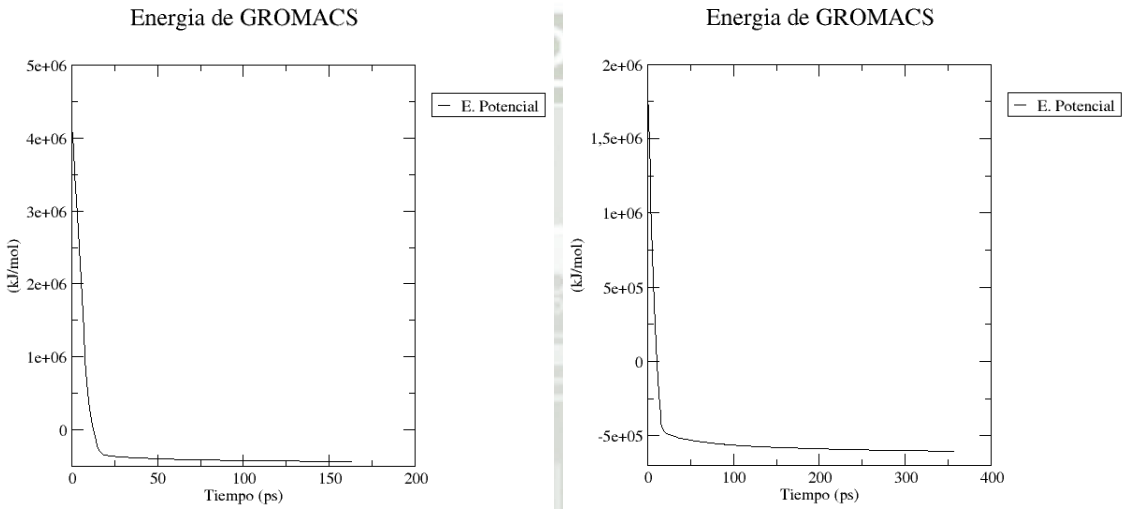


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

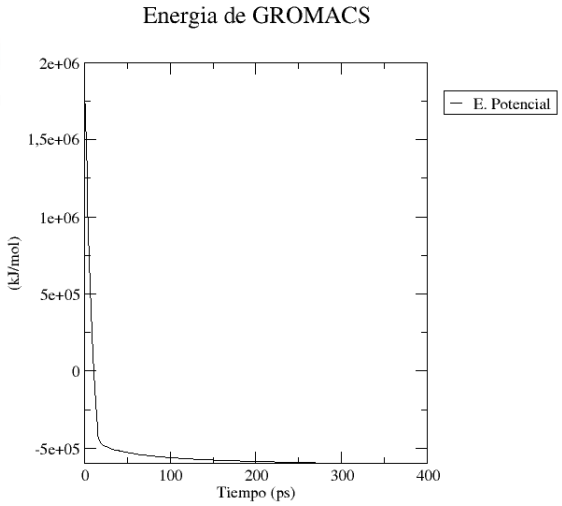
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

La energía potencial determinada luego de haber finalizado el proceso de minimización de energías se muestran en la **Figura** 4.6, donde observamos una tendencia a caer a su mínimo de energía luego de 5ps (picosegundos) para los tres análisis de las especies de LprF estudiadas, indicándonos de esta manera que los sistemas se encuentran relajados. Posterior a la minimización, se continuó con la simulación de dinámica molecular, proceso del cual se obtuvo las 3 estructuras que se encontraron en su mínimo de energía y en su mejor estado conformacional, las cuales mostraron algunas diferencias entre las secciones que antes formaban láminas beta y alfa, esto se debe a que los aminoácidos tuvieron cambios de posición.




(a) *M. tuberculosis* (b) *M. bovis*




(c) *M. caprae*

Figura 4.6: Energía potencial obtenida por especie de *Mycobacterium* después del proceso de minimización

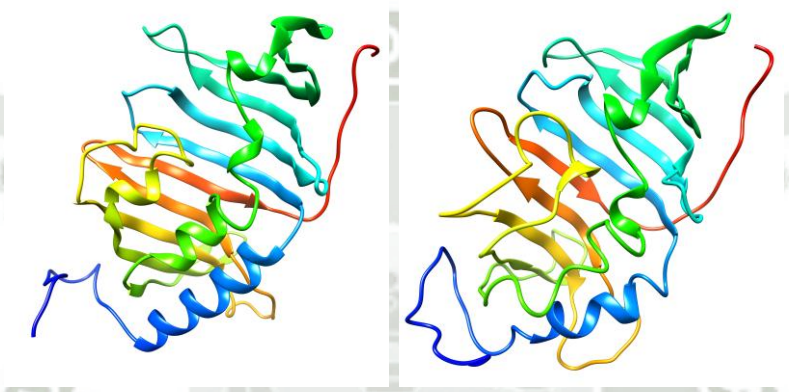


Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

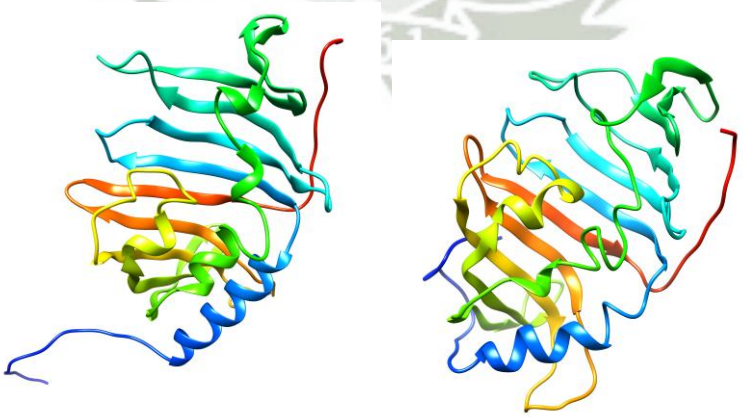
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En la **Figura** 4.7, 4.8 y 4.9 se muestra la comparación de estructuras nativas con la que se inició el trabajo de simulación de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. caprae*; respectivamente, en los incisos **(a)**. Seguidamente se observa las estructuras obtenidas (mostradas en el inciso **(b)**), luego de finalizado la simulación y de haber obtenido las estructuras promedio. Es así, como se logra visualizar que las 3 las estructuras secundarias de LprF en determinadas secciones cambiaron de conformaciones. El caso más notorio se reporta en la proteína final de *M. caprae*, donde la alfa hélice ubicada en la parte final de la secuencia (sección azul), finalizó en giros beta sin rastros de las alfa hélices iniciales.



(a) *M. tuberculosis* modelada (b) *M. tuberculosis* final

Figura 4.7: Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. tubrculosis*, como resultado de las simulaciones.



(a) *M. bovis* modelada (b) *M. bovis* final

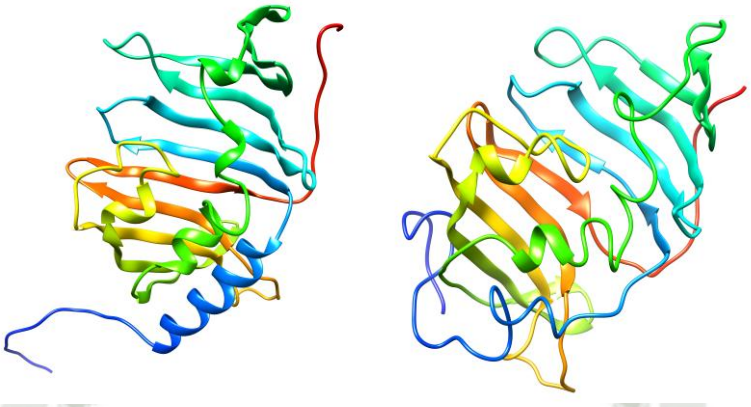
Figura 4.8: Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. bovis*, como resultado de las simulaciones.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) *M. caprae* modelada (b) *M. caprae* final

Figura 4.9: Comparación entre las estructuras modeladas iniciales y las finales de *M. caprae*, como resultado de las simulaciones.

Posterior a la minimización se determinaron los diagramas de RMSD (Root-mean-square deviation ó desviación media de la raíz cuadrada) y RMSF (Root-mean-square fluctuation ó fluctuación media de la raíz cuadrada). La primera se realizó en base a la estructura de la proteína con respecto a las diferentes formas que presentaron estas durante la trayectoria; mientras que la segunda herramienta nos ayudar a identificar los aminoácidos con mayores cambios conformacionales o vibracionales en la etapa de convergencia o tambien denominada fase estable de la trayectoria.

En la **Figura** 4.10(a) se observa que el tiempo aproximado de estabilidad o convergencia de las tres estructuras se encuentra alrededor de los 50 ns (nano segundos) y que las tres no tienen una vibración mayor a 0.04 nm aproximadamente. Por lo que consideramos que estos modelos estructurales llegaron a su forma estable, donde las interacciones entre ellas son mínimas. Estos modelos fueron buenos candidatos para los ensayos que continuaron.

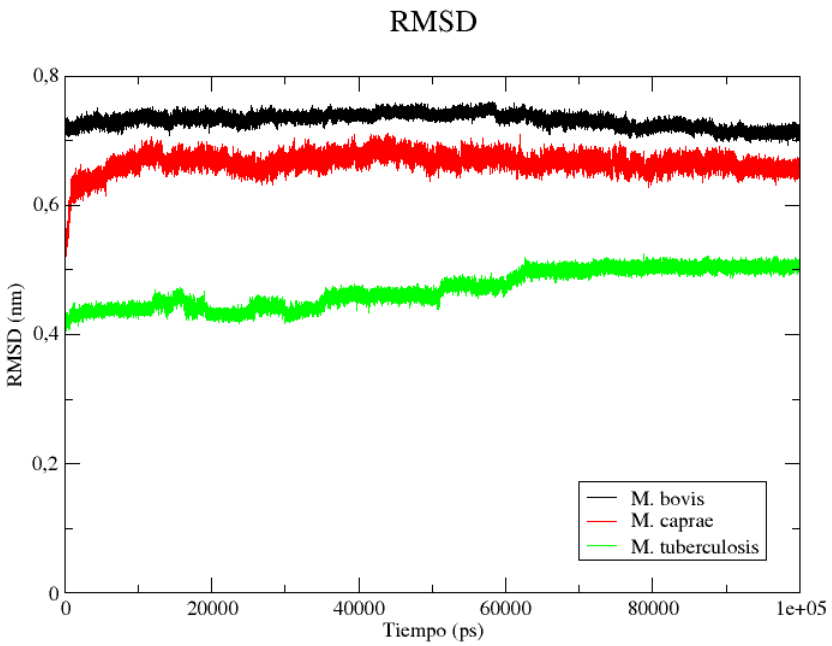
En la **Figura** 4.10(b) se puede observar una comparación de las fluctuaciones por residuo entre las especies de *Mycobacterium* estudiadas. Para *M. tuberculosis*, los residuos con más fluctuaciones fueron desde el 74 al 78 (llegando a fluctuar 0.31 nm aproximandamente), el 90, 123 al 127, 151 al 153. En el caso de *M. bovis* los que registraron mayor



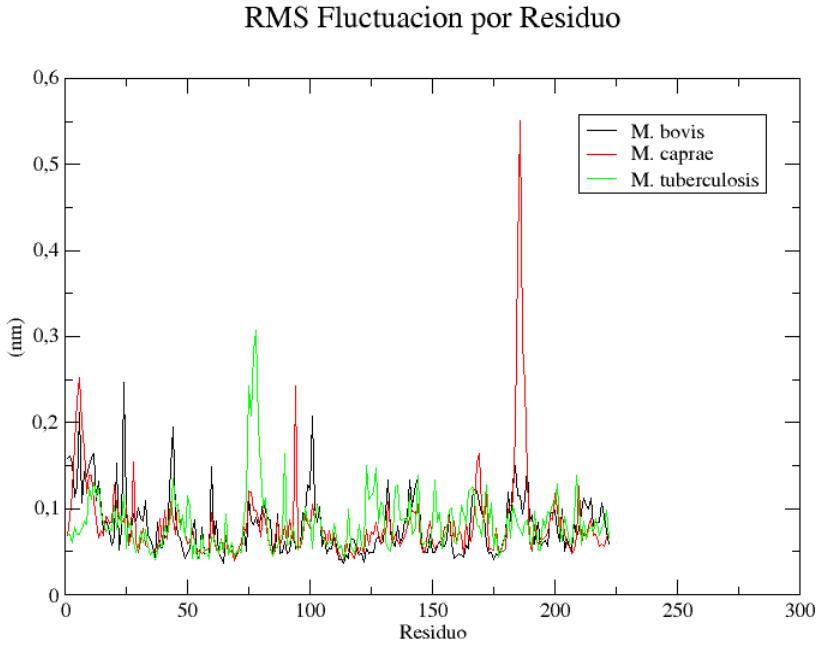
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA




(a) RMSD




(b) RMSF

Figura 4.10: Desviación media cuadrática de lipoproteína F Lpr de las tres especies de *Mycobacterium* estudiadas.

movimiento fueron del 21 al 24, 12 al 45, también desde 58 al 60 y 100 al 102. Por último en *M. caprae* se reportó fluctuaciones entre los residuos 28 y 30, 93 y 95, 168 y 171, y



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

finalmente una gran fluctuación entre los residuos 184 y 188; la cual llegó a tener una fluctuación de 0.45 nm. Cabe resaltar, que las fluctuaciones ocurridas en los extremos de las secuencias son normales en este tipo de estudios, pues al realizar un proceso de dinámica molecular, estas partes son las que más vibran al no estar unidas a otro tipo de aminoácidos.

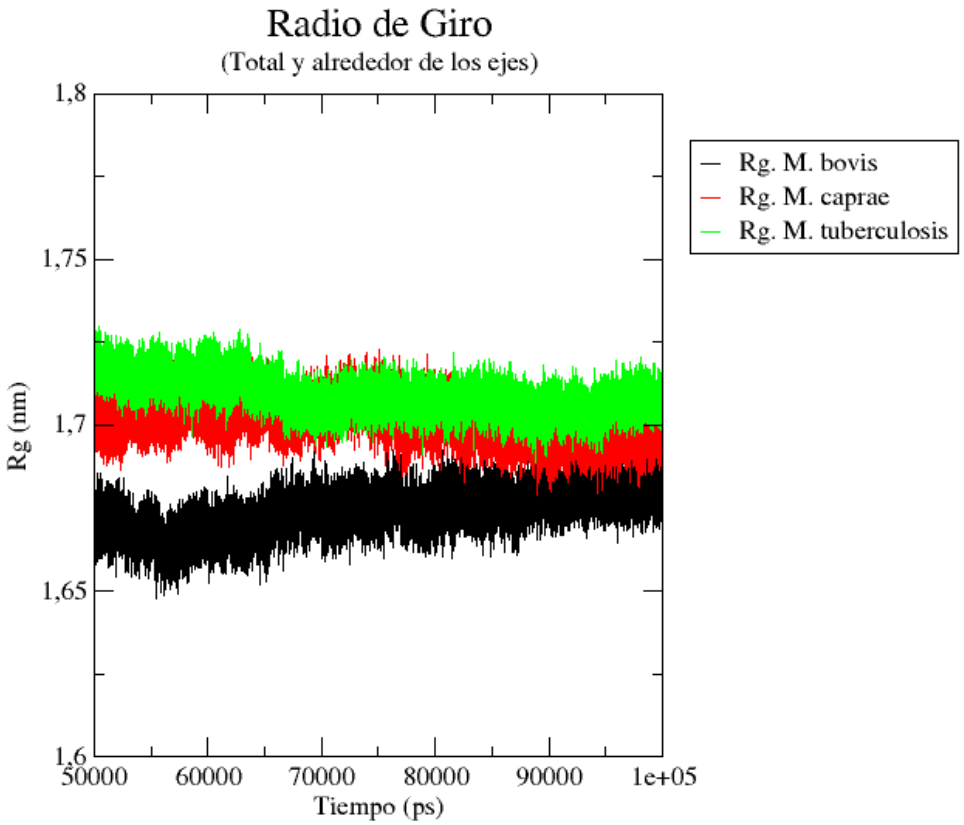



Figura 4.11: Radio de giro calculado para las tres especies de *Mycobacterium*.

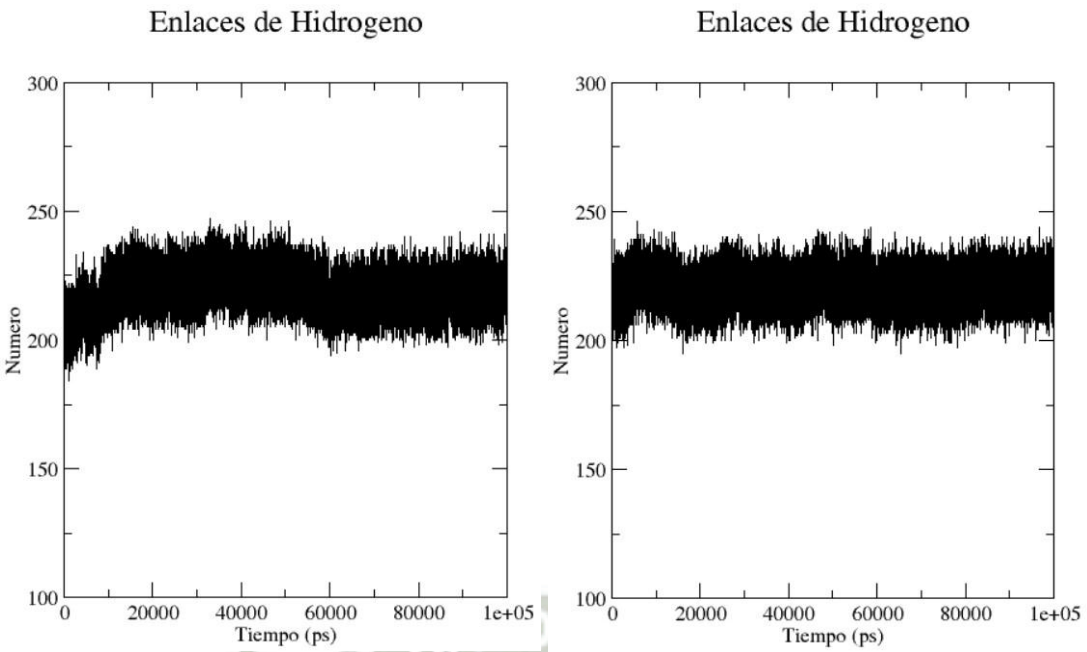
También se realizó el cálculo de radio de giro en cada especie de LprF estudiada. Este nos dio una medida aproximada de la capacidad de una molécula proteica de moverse con respecto al centro de su masa, normalmente cuando una estructura se encuentra en la etapa de establilidad, los movimientos son escasos. En los resultados obtenidos se puede se observar que las tres proteínas en estudio no tienen una oscilación mayor a 1.5 nm durante la fase estable, a partir de los 50ns. Así mismo se observa que para la especie de *M. tuberculosis* presentó un mayor radio de giro; a comparación de *M. bovis*, que alcanzó su mayor grado de compactación muy rápido, lo que nos indica que la lipoproteína de *M. tuberculosis* tardó un poco más de tiempo en llegar a su estado fundamental. Dichos resultados pueden ser observados en la **Figura** 4.11.



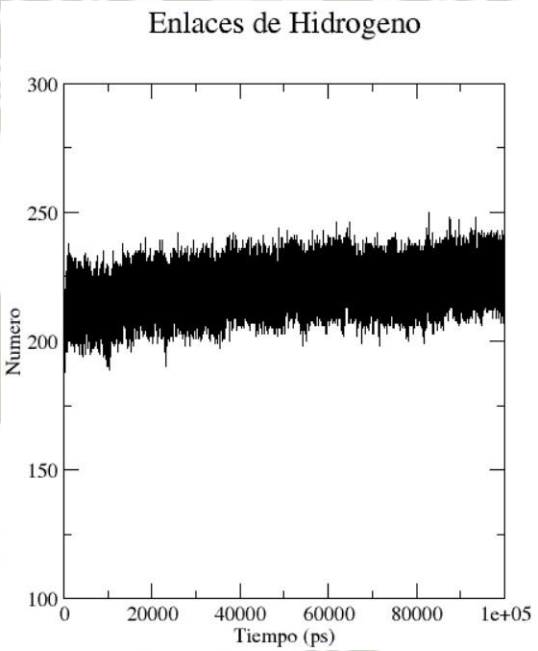
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA




(a) *M. tuberculosis* (b) *M. bovis*




(c) *M. caprae*

Figura 4.12: Estructuras de los puente de hidrógeno de cada una de las especies proteicas de *Mycobacterium* estudiadas.

Los puentes de hidrógeno fueron analizados en función del tiempo, debido a que estos nos muestran la estabilidad de la estructura terciaria y su evolución, pues cuando estos se mantienen en una estructura a lo largo del tiempo de simulación, es más probable que la estructura se mantenga estable y conservada a lo largo del tiempo. Dichos resultados se observan claramente en la **Figura** 4.12, donde la lipoproteína LprF de *M. tuberculosis*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

fue la que más tardó en llegar a un número de enlaces de puente de hidrógeno estables, estabilizándolos alrededor de los 20000 ps (picosegundos), mientras que la más estable es la estructura de *M. caprae*.

El análisis de Ramachandran nos mostró los aminoácidos que se encuentran en las zonas favorecidas, permitidas y atípicas. En la **Figura** 4.13, correspondiente al diagrama de la especie *M. tuberculosis* se observa un total de 116 residuos, es decir un 98.7 % del total de residuos que se encuentran entre las regiones favorecidas y permitidas; y 03 residuos en la zona atípica (1.4 %).

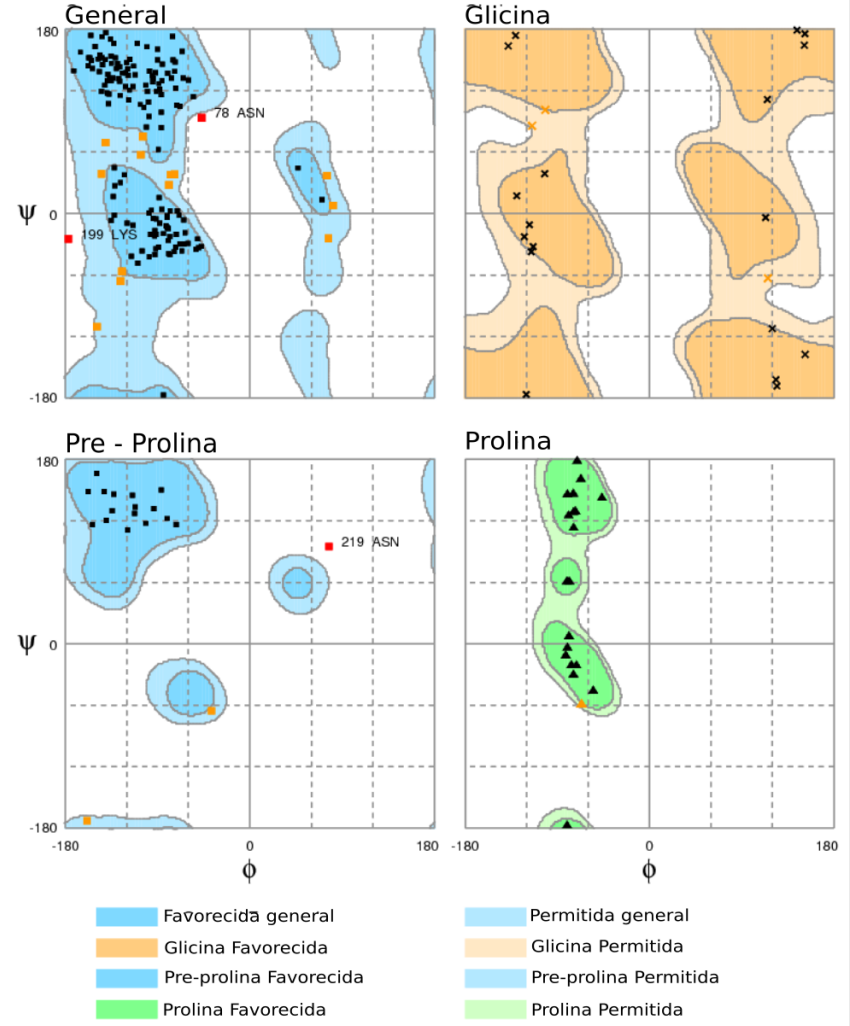



Figura 4.13: Diagrama Ramachandran de la *especie M. tuberculosis*.

Estos tres últimos residuos son ASN78, LYS199 y ASN219. Mientras que en el diagrama de la **Figura** 4.14 correspondiente a *M. bovis* se observa una cantidad mayor de residuos en la zona atípica o no permitica, siendo 8 residuos, los que corresponden a 3.7 % del total. Estos representan a THR79, GLU108, ASN132, GLN164, GLY170, THR181, ALA190 y



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GLY212. Además esta especie cuenta con un total de 96.4 % de residuos entre las zonas favorecidas y permitidas.

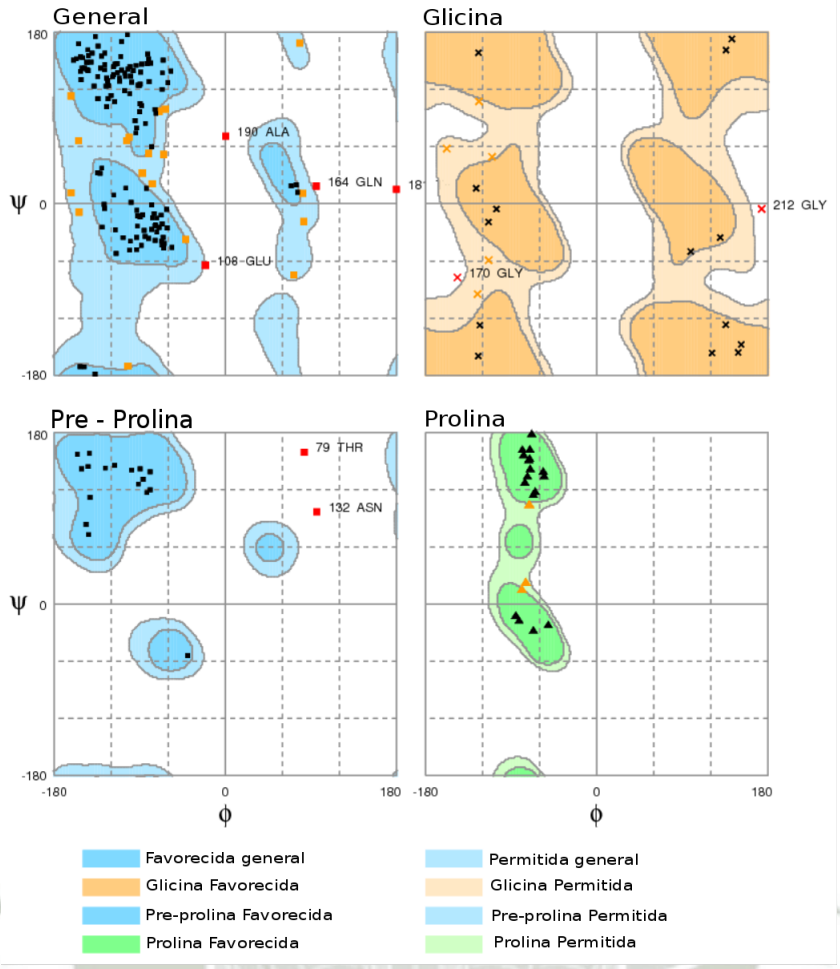



Figura 4.14: Diagrama Ramachandran de la especie *M. bovis.*

En la **Figura** 4.15 de *M. caprae* se observa que esta especie presenta el mayor porcentaje de residuos ubicados en la zona atípica. Siendo un total de 10 residuos, correspondiendo a un 4.6 % del total de la secuencia. Estos son LEU23, ASN78, THR79, PRO80, ASP100, GLU108, ASN132, GLN136, SER184 y por último ASN219. Esta última especie mostró que el 95.5 % del total de residuos se encuentra en las regiones favorecidas y permitidas.

Dentro de una comparación ligeramente más extensa, nos fijamos que los aminoácidos que se encuentran fuera de las regiones permitidas, guardan similitud entre las especies. Estos residuos conservados las observamos en la **Tabla** 4.5, donde se observa que las especies *M. bovis* y *M. caprae* comparten 3 residuos (THR79, GLU108, ASN132); mientras que *M. tuberculosis* tiene sólo un residuo que se repite en la sección atípica con *M. caprae*, ASN219.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

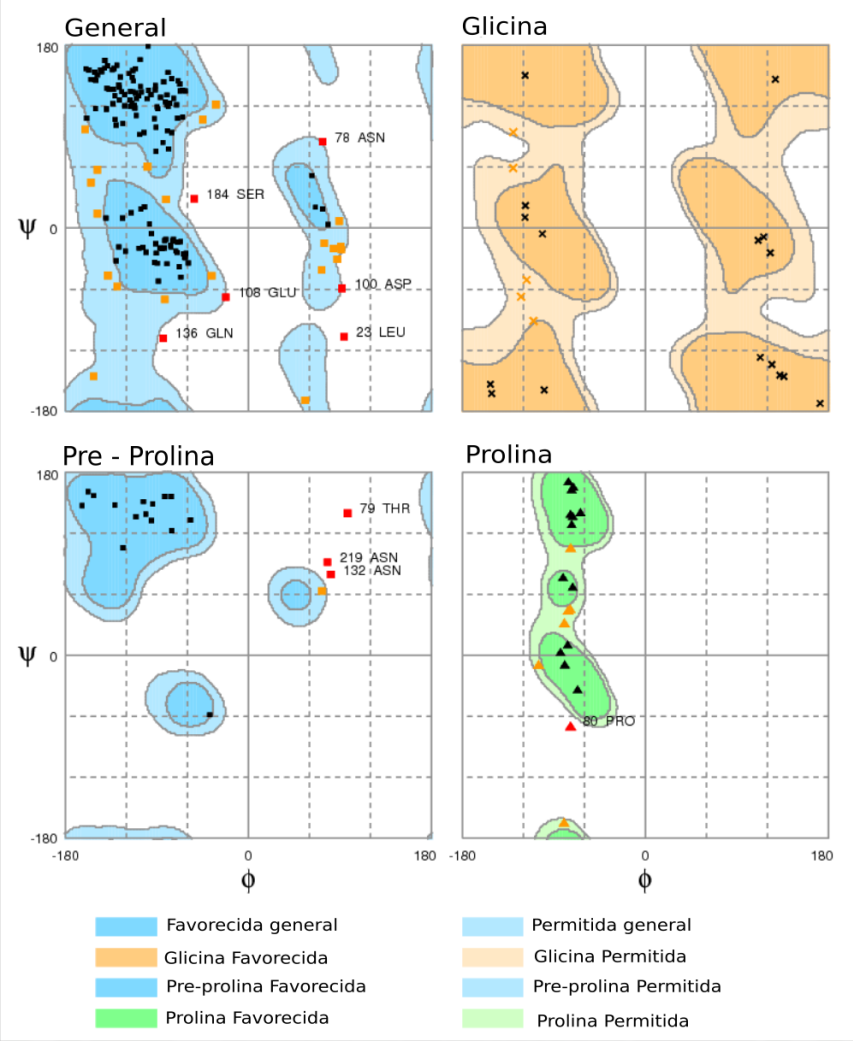



Figura 4.15: Diagrama Ramachandran de la especie *M. caprae*.

Tabla 4.5: Aminoácidos conservados en las zonas atípicas en los diagramas Ramachandran

| Nº | Especies | Aminoácidos relacionados en región atípica |
|---|---|---|
| **1** | *M. tuberculosis - M. caprae* | ASN219 |
| **2** | *M. bovis - M. caprae* | THR79, GLU108, ASN132 |



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

## 4.4. *Análisis de virtual screening.*

### 4.4.1. Análisis de bolsillos hidrofóbicos

Se realizó el análisis de los bolsillos probables para cada especie de *Mycobacterium* en el servidor PockDrug, que reportó la cantidad total de bolsillos con más probabilidad de captar un ligando en las condiciones mencionadas anteriormente; además de brindar otros datos que son de ayuda para la caracterización de estos, como el tipo de residuos aromáticos, además de un porcentaje de drogabilidad. Esto se refiere a la probabilidad que tiene dicha cavidad de poder guardar dentro de su estructura a un ligando, no sólo drogas. Dichos datos se observan en la **Tabla** 4.6. Como resultado de este análisis, se obtuvo que la especie *M. tuberculosis* sólo cuenta con un bolsillo hidrofóbico en la parte externa, con un tamaño de 273.82 Å y con 8 residuos en el centro activo del bolsillo. Además el servidor reporta que tiene un proporción de 0.38 y 0.13 entre residuos polares y aromáticos. Un rasgo importante es que este último bolsillo mencionado es que presenta un porcentaje de drogabilidad bastante alto, de 99 %. Además también presenta un factor de 1.39 de propiedades hidrofóbicas basadas en los residuos presentes en el bolsillo, dicha esquematización se puede observar en la **Figura** 4.16. Pero, en este estudio no sólo tendremos en cuenta dicho dato; si no otros que para nuestro estudio son más relevantes; como el tamaño de cada bolsillo.

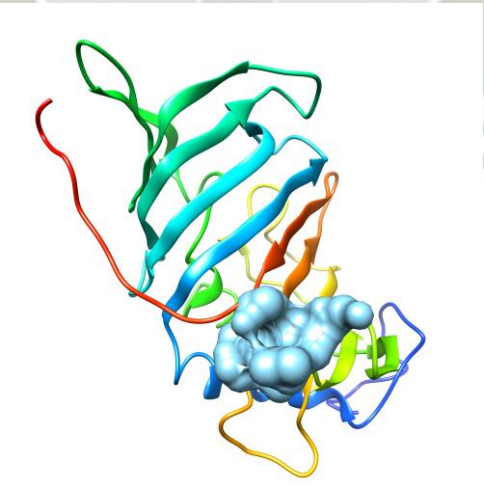


Figura 4.16: Bolsillo hidrofóbico Nº1 de *M. tuberculosis*, siendo el único hallado por el servidor PockDrug usado.



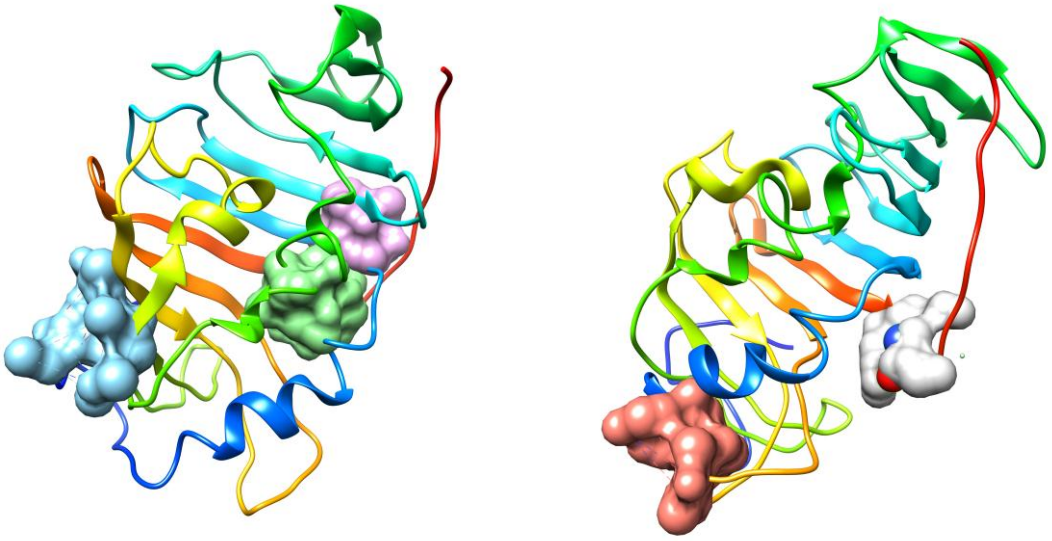
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

Tabla 4.6: Análisis del bolsillo de LPRFs de *Mycobacterium* estudiadas. Las filas sombreadas se refieren a los bolsillos elegidos como más drogables.

| | Bolsillo | Vol. | Prop. hidrofóbicas | Residuos polares | Residuos aromáticos | Atom. O-Tyr | Nº de residuos en bolsillo | % de Drogabilidad |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *M. tuberculosis* | Pº1 | 273.82 | 1.39 | 0.38 | 0.13 | 0.0 | 8.0 | 0.99 |
| *M. bovis* | Pº1 | 392.92 | -1.1 | 0.67 | 0.0 | 0.0 | 12.0 | 0.11 |
| | Pº2 | 178.47 | 0.76 | 0.5 | 0.13 | 0.0 | 8.0 | 0.94 |
| | Pº3 | 338.37 | 1.54 | 0.36 | 0.09 | 0.0 | 11.0 | 0.99 |
| | Pº4 | 217.74 | -0.81 | 0.71 | 0.0 | 0.0 | 7.0 | 0.17 |
| | Pº5 | 141.79 | 0.0 | 0.50 | 0.17 | 0.0 | 6.0 | 0.76 |
| *M. caprae* | Pº1 | 388.9 | -1.3 | 0.7 | 1.0 | 0.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Pº2 | 314.98 | 1.18 | 0.33 | 0.0 | 0.0 | 12.0 | 0.01 |
| | Pº3 | 132.94 | 0.24 | 0.33 | 0.0 | 0.0 | 9.0 | 0.07 |

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Bolsillos N°1 (celeste), N°2 (lila) y N°3 (verde) (b) Bolsillos N°4 (salmón) y N°5 (gris)

Figura 4.17: Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. bovis* con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos.

La especie de *M. bovis* registró la presencia de un total de 5 bolsillos externos aptos de ser drogables, como se logra observar en la **Figura** 4.17 (a) y (b). Sin embargo, todos presentaron características diferentes. Según el servidor, el bolsillo número 1, con un tamaño de 392.92 Å posee un porcentaje de drogabilidad muy bajo, por lo que se le habría podido considerar como no apto. Los bolsillos número 2 y 3, con tamaños de 178.47 y 338.37 Å respectivamente son los que presentarían un mayor porcentaje de drogabilidad; siendo el bolsillo número 3 en el que se observa el mayor de todos. Los bolsillos restantes, los número 4 y 5 tendrían volúmenes menores (217.74 y 141.79 respectivamente); presentándose menos drogables que los otros.

En la especie *M. caprae*, se observa la presencia de 3 bolsillos hidrofóbicos, también externos, de los cuales el primero es el que presenta un mayor tamaño de 388.9 Å (**Figura** 4.18, color celeste) pero con propiedades de drogabilidad muy bajas, con tan sólo un 10 %. Mientras que los otros dos bolsillos (2 y 3) muestran un porcentaje de drogabilidad muy similares al primero.

Sin embargo, la elección del o de los bolsillos más aptos para su unión con las drogas elegidas en este estudio no se basó sólo en el dato de drogabilidad brindado por el servidor, ya que este no es decisivo ni del todo relevante como se mencionó en párrafos anteriores, mas sí es de ayuda para la discriminación de pockets no aptos, junto con otra información.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Los resultados hallados por el servidor PockDrug, no coincidieron con lo reportado en el año 2014 por Jin-Sik Kim[42], pues en su estudio de la lipoproteína F indica que esta presenta un único bolsillo hidrofóbico transportador de glicolípidos en la cavidad central entre el plegamiento de las láminas alfa y beta, como en el caso de sus homólogas LprG y LprX (Ver **Figura** 2.4). Se piensa que esto puede ser resultado de las simulaciones de dinámica molecular en solvente explícito SPC216, lo que podría haber causado que este bolsillo principal se cierre. Al realizarse simulaciones de prueba, adicionando el ligando de diacil glicerol encontrado en la secuencia de *M. bovis BCG*, de la proteína usada para el modelamiento por homología, se observó que el servidor usado para el presente estudio y otros presentes en la web, nos arrojaron como resultado que las proteínas no presentaban bolsillo hidrofóbico alguno. Se llegó a la conclusión que al estar ocupado el bolsillo "principal" con un ligando, como el glicolípido adicionado en el PDB, la proteína considera que está ya está llevando un ligando, por lo tanto, se cierra a la posibilidad de cargar otro. Sin embargo, al estar cerrada la proteína, y mostrar la presencia de posibles bolsillos nos indicaría que al estar sometida la LprF a ambientes hidrofílicos, esta protege su canal principal destinado al transporte de metabolitos primordiales para la síntesis de la pared celular. Además, en ciertas conformaciones cerradas como la que se acaba de explicar, es probable que sean capaces de carrear determinadas drogas.

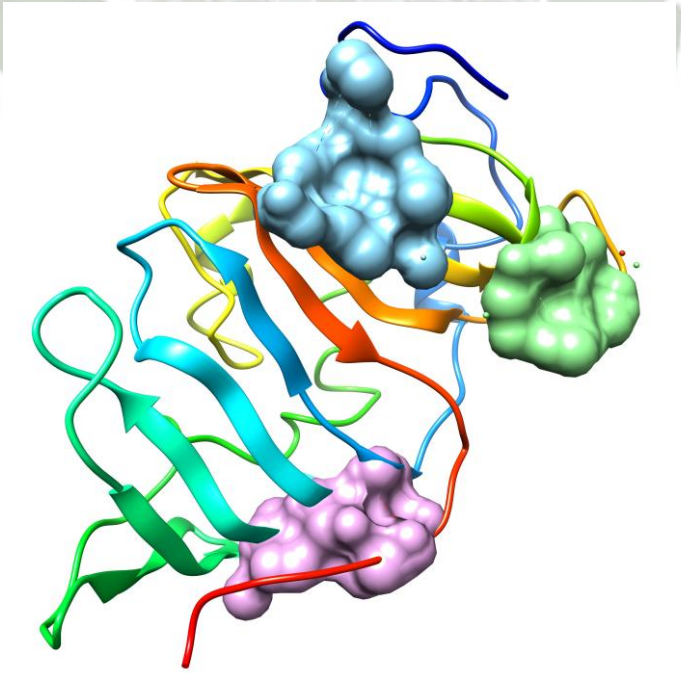


Figura 4.18: Bolsillos hidrofóbicos de *M. caprae*. Bolsillo Nº1 (celeste), bolsillo Nº2 (lila) y bolsillo Nº3 (verde).



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

### 4.4.2. *Virtual Screening*

Luego de haber realizado el análisis de los bolsillos hidrofóbicos por especie, se realizó el *virtual screening* con el paquete computacional iGemdock usando las estructuras finales, procedentes del proceso de simulación de dinámica molecular en formato *.pdb*, así como de los ligandos optimizados por DFT (Density functional theory), del cual se obtuvo una lista de tres soluciones por predicción de acoplamiento y las coordenadas del posible sitio de unión para cada una de las soluciones. Este se prodría explicar como un bombardeo de los ligandos con cada proteína, y se observa los sitios donde más veces un ligando a caído. Para evaluar la efectividad de estos acoplamientos se hizo un análisis en base a los lugares permitidos o espacios adecuados que contengan características donde pueda calzar un ligando normalmente. Para esto se usaron las grillas obtenidas anteriormente en el predictor de sitios activos.

La lipoproteína F de *M. tuberculosis* presentó un total de 12 ligandos con una energía de acoplamiento altamente favorable, los resultados se presentan en KJ/mol como se muestra en la **Tabla** 4.7, siendo la rifampicina la droga que podría resultar más apta para un proceso de acoplamiento espontaneo. Pero a pesar de esto, se debe analizar el posicionamiento de cada ligando en la estructura y del bolsillo, pues como es notorio en la **Figura** 4.19 que ninguno de los ligando se pegan en el bolsillo hidrofóbico, a pesar de sus energías negativas (que como se mencionó en secciones anteriores, esta debe ser negativa para poder considerar el proceso como espontáneo y apto para que ocurra en la naturaleza sin la influencia de de factores externos o intermediarios.

Tabla 4.7: Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. tuberculosis*

| **Nº** | **Fármaco** | **Energía de acoplamiento (KJ/mol)** |
|---|---|---|
| **1** | Ac. P-aminosalicílico | -50.8282 |
| **2** | Amikacina | 1140.92 |
| **3** | Bedaquilina | -85.5848 |
| **4** | Capreomicina | -21.2389 |
| **5** | Cicloserina | -37.5916 |
| **6** | Clofazimina | 176.596 |



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.7: Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. tuberculosis*

| Nº | Fármaco | Energía de acoplamiento (KJ/mol) |
|---|---|---|
| **7** | Delamanid | 73.1999 |
| **8** | Estreptomicina | -76.9806 |
| **9** | Ethambutol | -56.9721 |
| **10** | Etionamida | -52.5456 |
| **11** | Isoniazida | -50.3579 |
| **12** | Kanamicina | 492.298 |
| **13** | Levofloxacino | -81.837 |
| **14** | Linezolid | -73.7522 |
| **15** | Moxifloxacino | 8.58748 |
| **16** | Pirazinamida | -52.1362 |
| **17** | Rifabutina | 100.59º |
| **18** | Rifampicina | -88.267 |

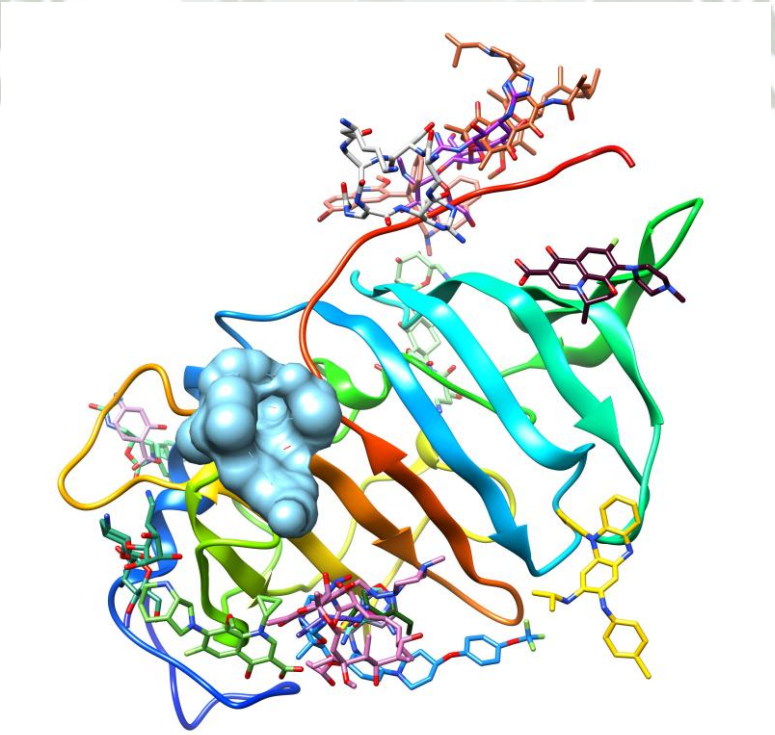


Figura 4.19: *Virtual screening* de *M. tuberculosis* con ligandos.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La lipoproteína F de *M. bovis* también obtuvo 12 ligandos que presentaron buenos valores de energía de acoplamiento, siendo 3 de estos los más optimos (Bedaquilina, Estreptomicina y Rifampicina). En la **Tabla** 4.8 se presentan los valores para cada uno de los ligandos en KJ/mol. Sobre el posicionamiento en cada uno de los bolsillo, se obtuvo buenas coincidencias en el bolsillo Nº 1, donde se ve claramente que este bolsillo funcionó muy bien. Sin embargo, los bolsillo Nº 2, 3, 4 y 5 no obtuvieron buenas coincidencias con los ligandos usados. Dichas esquematizaciones se muestran en la **Figura** 4.20.

Tabla 4.8: Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. bovis*.

| Nº | Fármaco | Energía de acoplamiento (KJ/mol) |
|---|---|---|
| **1** | Ac. P-aminosalicílico | -53.7306 |
| **2** | Amikacina | 1.78789 |
| **3** | Bedaquilina | -82.8682 |
| **4** | Capreomicina | -3.77 |
| **5** | Cicloserina | -43.7965 |
| **6** | Clofazimina | 319.499 |
| **7** | Delamanid | 112.314 |
| **8** | Estreptomicina | -82.3713 |
| **9** | Ethambutol | -54.4137 |
| **10** | Etionamida | -51.7096 |
| **11** | Isoniazida | -54.6297 |
| **12** | Kanamicina | 44.1112 |
| **13** | Levofloxacino | -77.5923 |
| **14** | Linezolid | -71.3874 |
| **15** | Moxifloxacino | 11.7263 |
| **16** | Pirazinamida | -51.0772 |
| **17** | Rifabutina | 354.425 |
| **18** | Rifampicina | -82.8521 |

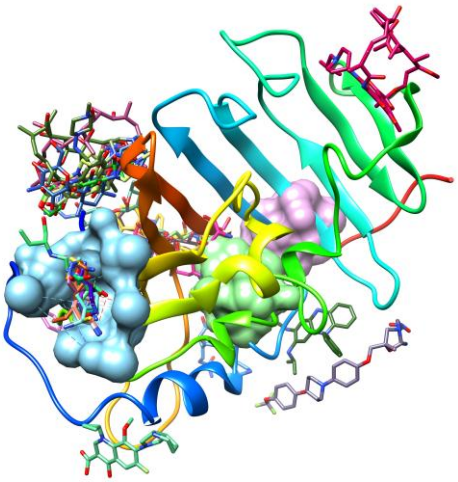
Así mismo se analizó los resultados para la lipoproteína F presente en *M. caprae*, y mostrando un comportamiento similar al de las dos especies ya explicadas, se encontró



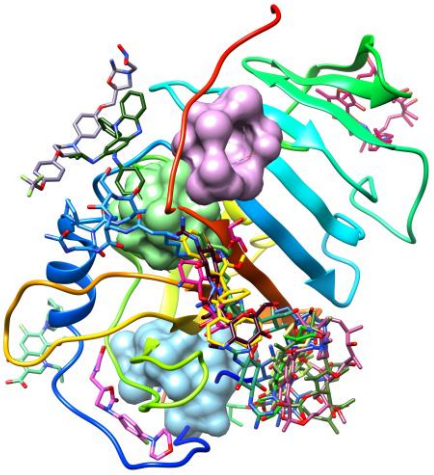
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA



(a) Vista de bolsillo Nº1 (celeste) con ligandos.



(b) Vista de bolsillos Nº2 (lila) y Nº3 (verde) con ligandos.

(c) Vista de bolsillo Nº4 (celeste) y Nº5 (celeste) con ligandos.

Figura 4.20: Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. bovis* con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos.

una coincidencia en el número de ligandos con buenas energías de acoplamiento, siendo la estreptomicina la que obtuvo un mayor valor energético de -83.5393 KJ/mol, siendo seguido por los mejores valores de Levofloxacino con -72.9218 KJ/mol y por Rifampicina de -58.9685 KJ/mol; mientras que el fármaco desechado para este ensayo fue la Rifabutina por mostrar una energía de acoplamiento positiva de 354.425 KJ/mol, como se muestra en la **Tabla** 4.9, en la cual se expresan los valores en KJ/mol. Además, donde se halló mayor número de coincidencias fue en los bolsillos Nº 1 (**Figura** 4.21(a)) y el Nº 2, como visualiza en la figura **Figura** 4.21(b).



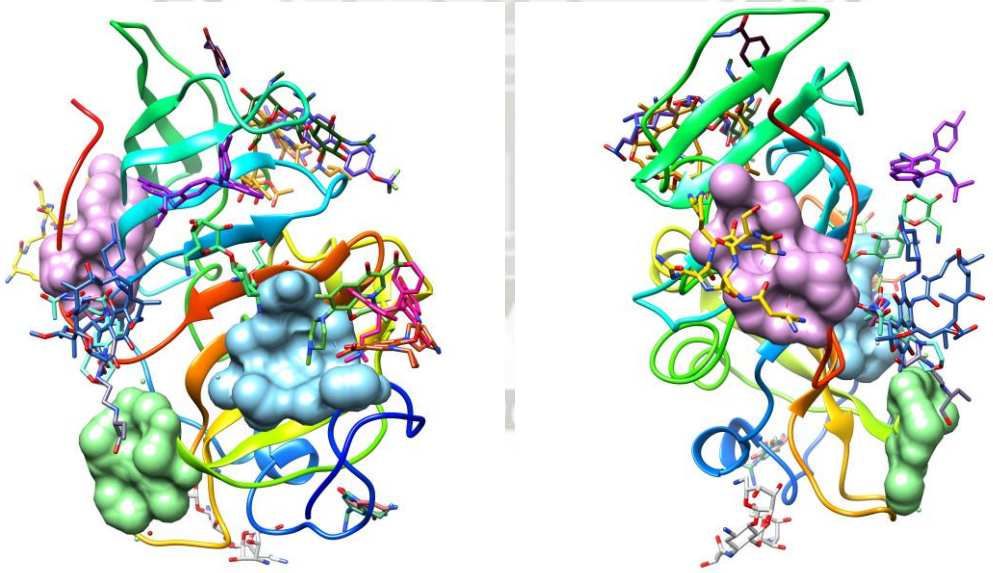
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.9: Energías de acoplamiento para ligandos en LprF de *M. caprae*.

| Nº | Fármaco | Energía de acoplamiento (KJ/mol) |
|---|---|---|
| **1** | Ac. P-aminosalicílico | -49.3613 |
| **2** | Amikacina | 360.806 |
| **3** | Bedaquilina | -70.9106 |
| **4** | Capreomicina | 37.5542 |
| **5** | Cicloserina | -36.1744 |
| **6** | Clofazimina | -34.8305 |
| **7** | Delamanid | 129.634 |
| **8** | Estreptomicina | -83.5393 |
| **9** | Ethambutol | -52.4581 |
| **10** | Etionamida | -48.3751 |
| **11** | Isoniazida | -47.029 |
| **12** | Kanamicina | 662.368 |
| **13** | Levofloxacino | -72.9218 |
| **14** | Linezolid | -78.6138 |
| **15** | Moxifloxacino | 5.04189 |
| **16** | Pirazinamida | -41.9982 |
| **17** | Rifabutina | 870.221 |
| **18** | Rifampicina | -58.9685 |



(a) Vista de bolsillo Nº1 (celeste) con ligandos.

(b) Vista de bolsillos Nº2 (lila) y Nº3 (verde) con ligandos.

Figura 4.21: Bolsillos hidrofóbicos hallados en la especie *M. caprae* obtenidos con ayuda del servidor PockDrug, entre paréntesis, los colores respectivos.

Luego se realizó un refinamiento del *virtual screening* ya realizado, introduciendo al programa iGemdock la secuencia *.pdb* de la proteína, los ligandos en el mismo formato



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.10: Energías de acoplamiento de ligandos para el bolsillo N° 1 obtenidas del refinamiento en iGemdock. Las casillas sin valores, corresponden a fármacos no seleccionados.

| N° | Fármaco | *M. tuberculosis* KJ/mol | *M. bovis* KJ/mol | *M. caprae* KJ/mol |
|---|---|---|---|---|
| **1** | Ac. P-aminosalicílico | - | -29.2911 | -22.4341 |
| **2** | Amikacina | -0.1007 | - | -30.8186 |
| **3** | Bedaquilina | - | - | - |
| **4** | Capreomicina | - | - | -23.7838 |
| **5** | Cicloserina | - | -23.7774 | - |
| **6** | Clofazimina | - | - | -31.8122 |
| **7** | Delamanid | -15.1121 | - | - |
| **8** | Estreptomicina | - | - | -32.6509 |
| **9** | Ethambutol | - | -26.5736 | - |
| **10** | Etionamida | - | -28.7361 | - |
| **11** | Isoniazida | - | -31.5445 | - |
| **12** | Kanamicina | - | - | - |
| **13** | Levofloxacino | -0.0123 | - | -27.8559 |
| **14** | Linezolid | - | - | -33.2417 |
| **15** | Moxifloxacino | - | - | -32.1339 |
| **16** | Pirazinamida | - | -29.3427 | -21.3101 |
| **17** | Rifabutina | - | - | -32.0723 |
| **18** | Rifampicina | -0.3965 | - | -21.7993 |

y adicionalmente las estructuras de los bolsillos elegidos por especie de *Mycobacterium* estudiada, los que fueron seleccionados por el tamaño (para las tres especies el más voluminoso fue el Nº 1, revisar **Tabla** 4.6), la incidencia de drogas situadas en estos o en lugares aledaños y los mejores valores de energía de acoplamiento. Estas debían ser negativas; pues según la definición base, mientras más negativa sea esta es más probable que el proceso tenga lugar en la naturaleza.[137] Las 18 drogas probadas, al inclinarse por un bolsillo más voluminoso mostraron energías más negativas y por lo tanto lograron más coincidencias en el sitio activo del bolsillo o en lugares cercanos.

Los datos de dicho refinamiento se muestra en la tabla **Tabla** 4.10, (en KJ/mol), donde se encontró que *M. tuberculosis* presenta sólo 4 fármacos con una energía de acoplamiento negativa. Estos son Amikacina, Delamanid, Levofloxacino y Rifampicina, a comparación de las energías reportadas en las otras dos especies, esta especie presentó las menores. *M. bovis*, por otro lado tuvo un total de 6 drogas que cayeron en el bolsillo Nº1.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Los fármacos mencionados anteriormente junto con las 10 drogas que tuvieron afinidad por el bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, según lo reportado por el programa; fueron las que mostraron los mejores valores energéticos.

Los ligandos de estas últimas dos especies presentan las más altas energías de acoplamiento del ensayo, siendo Linezolid del ensayo con *M. caprae* la que obtuvo la mejor energía de acoplamiento (-33.2417 KJ/mol).

En el virtual screening practicado con *M. bovis* el ligando con la energía de acoplamiento más óptima resultó ser el fármaco de primera línea Isoniazida, el cual presentó un valor de -31.5445 KJ/mol, resaltando mucho entre las demás estructuras estudiadas. Por estas razones se piensa que podría ser un buen candidato para realizar ensayos de modificaciones de drogas.

Finalmente se seleccionaron los fármacos con mejores valores de energías de acoplamiento que el refinamiento realizado en iGemdock nos indicó que poseían la más alta probabilidad de caer en el bolsillo selecciondo (N° 1) o en lugares cercanos a este para poder realizar un análisis más profundo del posicionamiento de los aminoácidos respecto al ligando.

Para esto, se usó un visualizador llamado LigPlot. Seguidamente se prepararon los archivos en la extensión *.pdb* de la proteína y del ligando para que LigPlot nos muestre los aminoácidos presentes en el bolsillo de la proteína que pudieran estar en contacto con los átomos de cada ligando que estén involucrados en las interacciones que se dan para que estos últimos se puedan adherir o al menos ser aproximados a la estructura y puedan ser carreados por estos transportadores lipídicos.

En el caso del bolsillo hidrofóbico de ***M. tuberculosis*** se pudo observar que tiene un total de 15 aminoácidos involucrados en las interacciones con los fármacos seleccionados (**Tabla** 4.11). Se puede observar en la **Figura** 4.22(a) que la Amikacina presenta interacciones con la mayoria de aminoácidos: desde ASP139 a LYS148, terminando en los residuos 175 y 177, treonina y triptófano, respectivamente.

Delamanid en la **Figura** 4.22(b) presenta interacciones casi homogéneas en tres diferentes grupos de residuos; en VAL40, THR41, SER52, ILE141, ASP142, ASP205 y THR207.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Tabla 4.11: Aminoácidos involucrados en el bolsillo hidrofóbico de *M. tuberculosis*.

| | | FÁRMACOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Nº** | **AMINOÁCIDOS** | **Amikacina** | **Delamanid** | **Levafloxacino** | **Rifampicina** |
| **1** | PRO12 | - | - | x | - |
| **2** | VAL40 | - | x | - | - |
| **3** | THR41 | - | x | - | - |
| **4** | SER52 | - | x | - | - |
| **5** | GLN136 | - | - | x | - |
| **6** | ASP139 | x | - | - | - |
| **7** | ILE141 | x | x | - | - |
| **8** | ASP142 | - | x | x | - |
| **9** | LEU144 | x | - | - | - |
| **10** | LYS148 | x | - | x | - |
| **11** | THR175 | x | - | x | - |
| **12** | TRP177 | x | - | x | - |
| **13** | ARG194 | - | - | Puente de H | - |
| **14** | ASP205 | - | x | - | - |
| **15** | THR207 | - | x | - | - |

Un caso importante se presentó en Levofloxacino (**Figura** 4.22(c)), pues en esta especie es el único fármaco que logró la formación de un punte de hidrógeno; en el residuo ARG194, con una distancia de 3.3 Å.

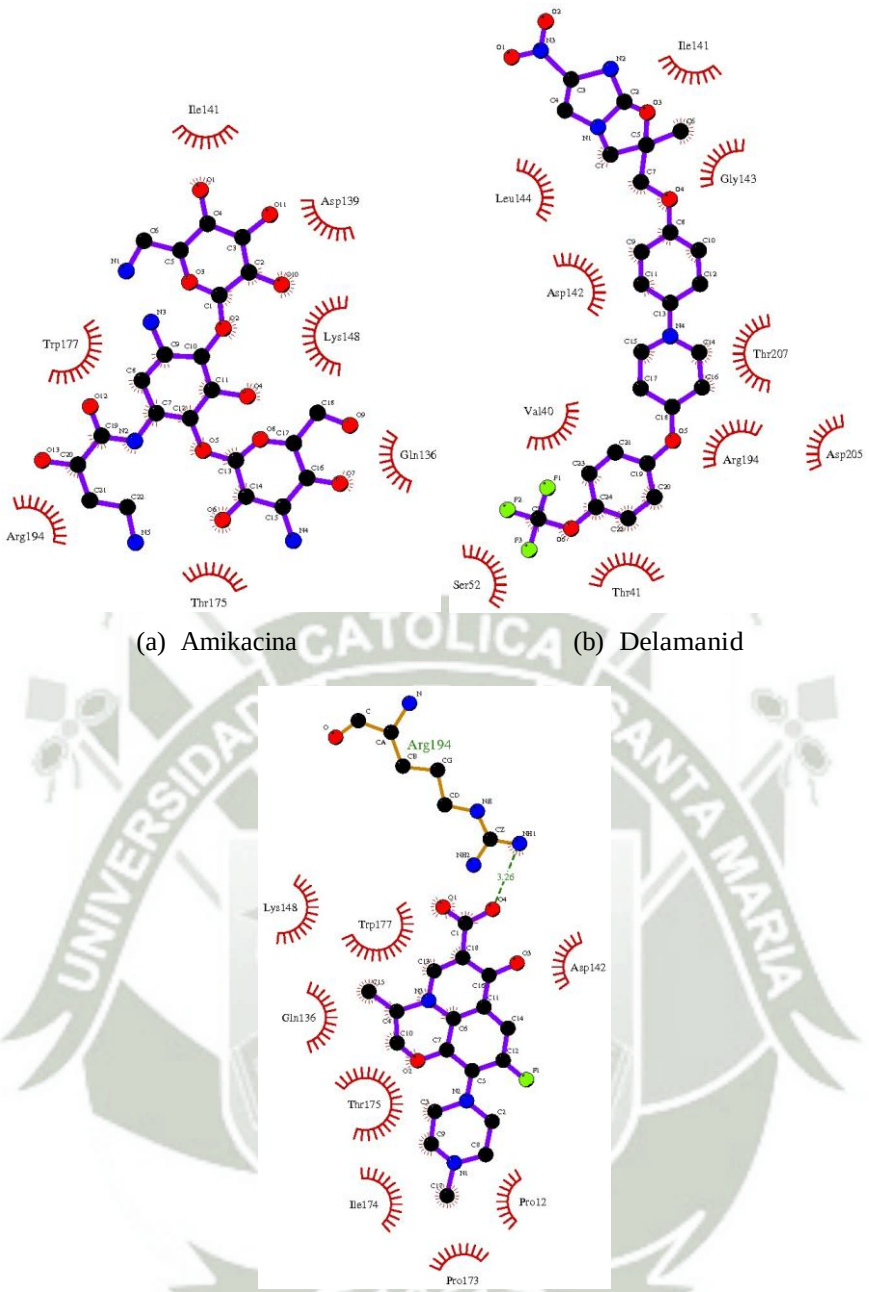
Este tipo de fármaco presenta interacciones cercanas en los aminoácidos 175 y 177, como se presenta también en caso de Amikacina. A pesar que este fármaco tiene una acción sobre el una enzima del RNA de transferencia, es probable que la LprF pueda prestarse para modificaciones para el desarrollo de nuevos fármacos que puedan unirse a ligandos dentro de la membrana celular.

Además, este fármaco presenta interacciones muy similares a las expresadas por Amikacina, por lo que es probable que bajo la influencia de otros factores, también pueda



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA




(a) Amikacina (b) Delamanid

(c) Levofloxacino

Figura 4.22: Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. tuberculosis*

formar puente de hidrógeno para asegurar su adherencia y transporte. A pesar que también la Rifampicina logró una energía de acoplamiento buena (**Tabla** 4.11), no se logró plotear con las coordendas en el visualizador, en embargo se puede observar en la **Figura** A.1 y **Figura** A.2 del anexo A los ensambles de la lipoproteína con cada uno de los fármacos, por separado.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

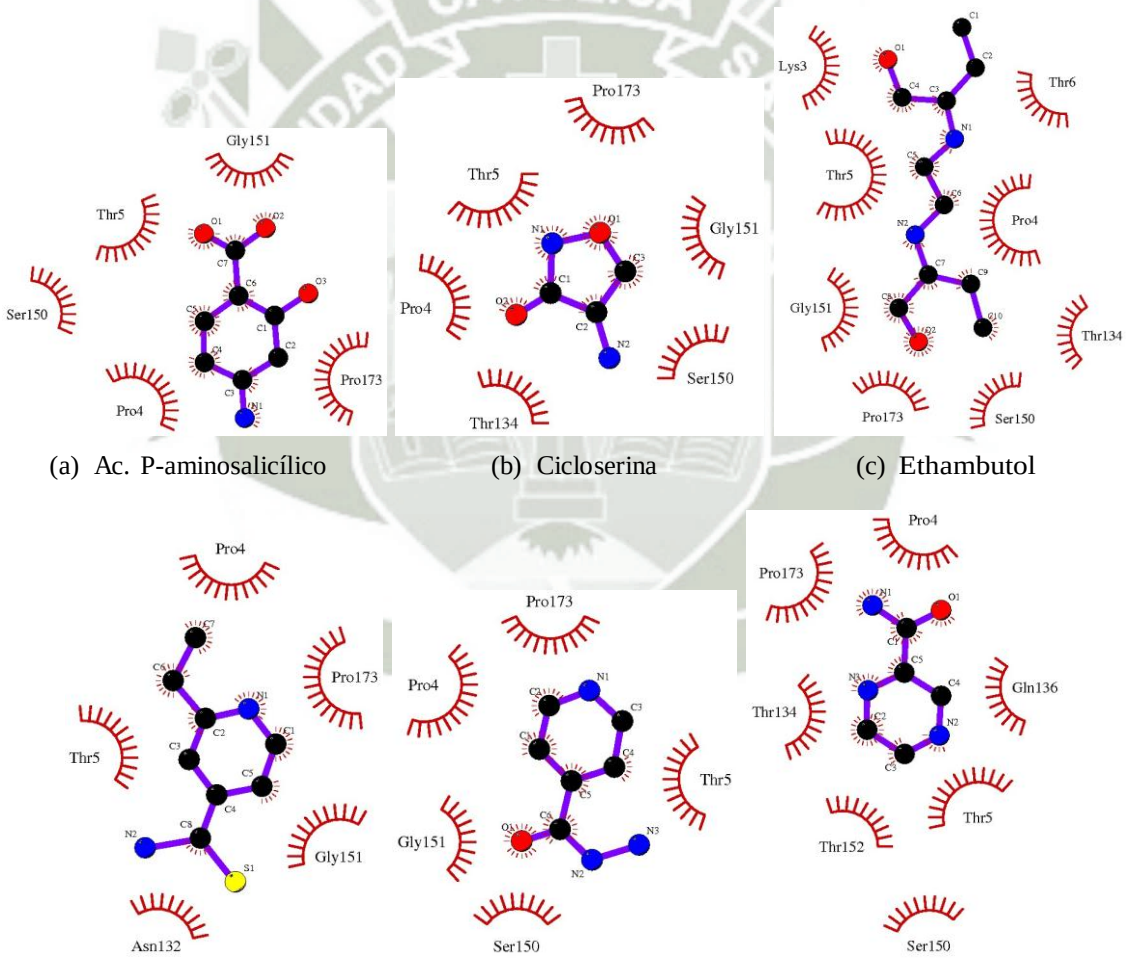
Tabla 4.12: Aminoácidos involucrados en el bolsillo hidrofóbico de *M. bovis*

| | | FÁRMACOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nº** | **AMINOÁCIDOS** | **Ac. P-amino-salicílico** | **Cicloserina** | **Ethambutol** | **Etionamida** | **Isoniazida** | **Pirazinamida** |
| **1** | LYS3 | - | - | x | - | - | - |
| **2** | PRO4 | x | x | x | x | x | x |
| **3** | THR5 | x | x | x | x | x | x |
| **4** | THR6 | - | - | x | - | - | - |
| **5** | ASN132 | - | - | - | x | - | - |
| **6** | THR134 | - | x | x | - | - | x |
| **7** | GLN136 | - | - | - | - | - | x |
| **8** | SER150 | x | x | x | x | x | x |
| **9** | GLY151 | x | x | x | x | x | - |
| **10** | THR152 | - | - | - | - | - | x |
| **11** | PRO173 | x | x | x | x | x | x |

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Los resultados expresados por el refinamiento del *virtual screening* para el bolsillo N° 1 de ***M. bovis*** muestran que la lipoproteína LprF de esta especie puede interaccionar de manera conveniente con 6 de los ligandos probados, además de tener un buen número de residuos que interaccionen en la estructura del bolsillo con los átomos de cada ligan- do. En esta especie las coincidencias respecto a los aminoácidos del bolsillo fueron más numerosas, debido a que este ligando se acomoda de una forma más óptima al bolsillo. De manera general, se puede observar que los fármacos reportados en la **Tabla** 4.12 para esta especie obtuvieron un rango de entre 5 y 8 aminoácidos involucrados en el proceso de adherencia a la estructura hidrofóbica, siendo Ethambutol el que presentó el número mayor de coincidencias. Esta droga podría interaccionar con LYS3, PRO4, THR5, THR6, THR134, SER150, GLY151 y PRO173.




(a) Ac. P-aminosalicílico (b) Cicloserina (c) Ethambutol

(d) Etionamida (e) Isoniazida (f) Pirazinamida

Figura 4.23: Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. bovis*



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Todos los fármacos seleccionados para *M. bovis* presentaron interacciones con los residuos PRO4, THR5, SER150 y PRO173, como se logra ver en la **Figura** 4.23, donde se muestra los aminoácidos más cercamos a tener interacciones con los átomos de cada ligando. Isoniazida, obtuvo una la mayor energía para esta micobacteria, con -31.5445 KJ/mol no presentó interacciones adicionales a los aminoácidos ya mencionados, pero al tener una energía tan favorable, se mantenie aún entre el top de posibles ligandos que puedan ser modificados posteriormente.

Las **Figuras** A.3, A.4, A.5; en la sección Anexo A, se muestran los ensambles de la lipoproteína con los fármacos más aptos. El segundo fármaco en esta especie con una buena energía de acoplamiento, fue Pirazinamida, con -29.3427 KJ/mol, continuado del Ácido P-aminosalicílico, con una energía similar al último fármaco mencionado.

En los resultados reportados para el bolsillo de la lipoproteína LprF de ***M. caprae*** son más extensos ya que esta especie obtuvo un total de 11 ligandos que presentaron un buen rango en las energías de acoplamiento, como se logra ver en la **Tabla** 4.10. En este caso es la Estreptomicina el fármaco que obtuvo la mejor energía de todo el ensayo.

En la tabla **Tabla** 4.13 se muestran la relación de aminoácidos involucrados en el bolsillo N° 1 para *M. caprae*, pero de los 5 primeros fármacos reportados en la **Tabla** 4.10 (es decir, Ac. P-aminosalicílico, Amikacina, Capreomicina, Clofazimina, Estreptomicina); ya que esta especie al tener tantos fármacos aptos, se decidió realizar una partición para poder expresar los resultados de forma entendible.

El menor número de coincidencias fue el ac. p-aminosalicílico, reportando tan sólo 5 aminoácidos que podrían tener contacto con el bolsillo hidrofóbico de la lipoproteína; mientras que la clofazimina registró la mayor interacción con 11 aminoácidos del bolsillo, así mismo; en la **Figura** 4.24(d) se aprecia cómo es que este ligando encaja muy bien dentro del anclaje de aminoácidos del bolsillo; así como el ácido P-aminosalicílico reporta los aminoácidos muy lejanos, por lo que se explica las pocas coincidencias halladas; ademas levofloxacino tiene un anclaje de manera similar la estreptomicina (**Figura** 4.25(e)).

Este primer grupo reportó una incidencia repetida entre los residuos LYS148, THR175, TRP177, ARG194, VAL196 y ASP198. El fármaco que visualmente se observa la cercanía de los aminoácidos fue el ethambutol, y la pirazinamida, rodeados casi totalmente de dichas moléculas proteicas.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

Tabla 4.13: Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, I parte.

| N° | AMINOÁCIDO | Ac. P-amino-salicílico | Amikacina | Capreomicina | Clofazimina | Estreptomicina |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | LYS1 | - | - | - | - | - |
| **2** | LYS3 | - | - | - | x | - |
| **3** | THR5 | - | - | x | x | x |
| **4** | PRO10 | - | - | - | - | x |
| **5** | SER11 | x | - | - | - | - |
| **6** | PRO12 | x | x | x | x | x |
| **7** | THR41 | - | - | - | - | - |
| **8** | ASN43 | - | - | - | x | - |
| **9** | GLN136 | - | - | - | - | - |
| **10** | ASP139 | - | - | - | - | - |
| **11** | ILE141 | - | - | x | - | - |
| **12** | LYS148 | x | x | x | x | |
| **13** | THR175 | - | x | - | x | x |
| **14** | TRP177 | - | x | x | x | x |
| **15** | ARG194 | - | - | x | - | - |
| **16** | VAL196 | - | x | x | x | x |

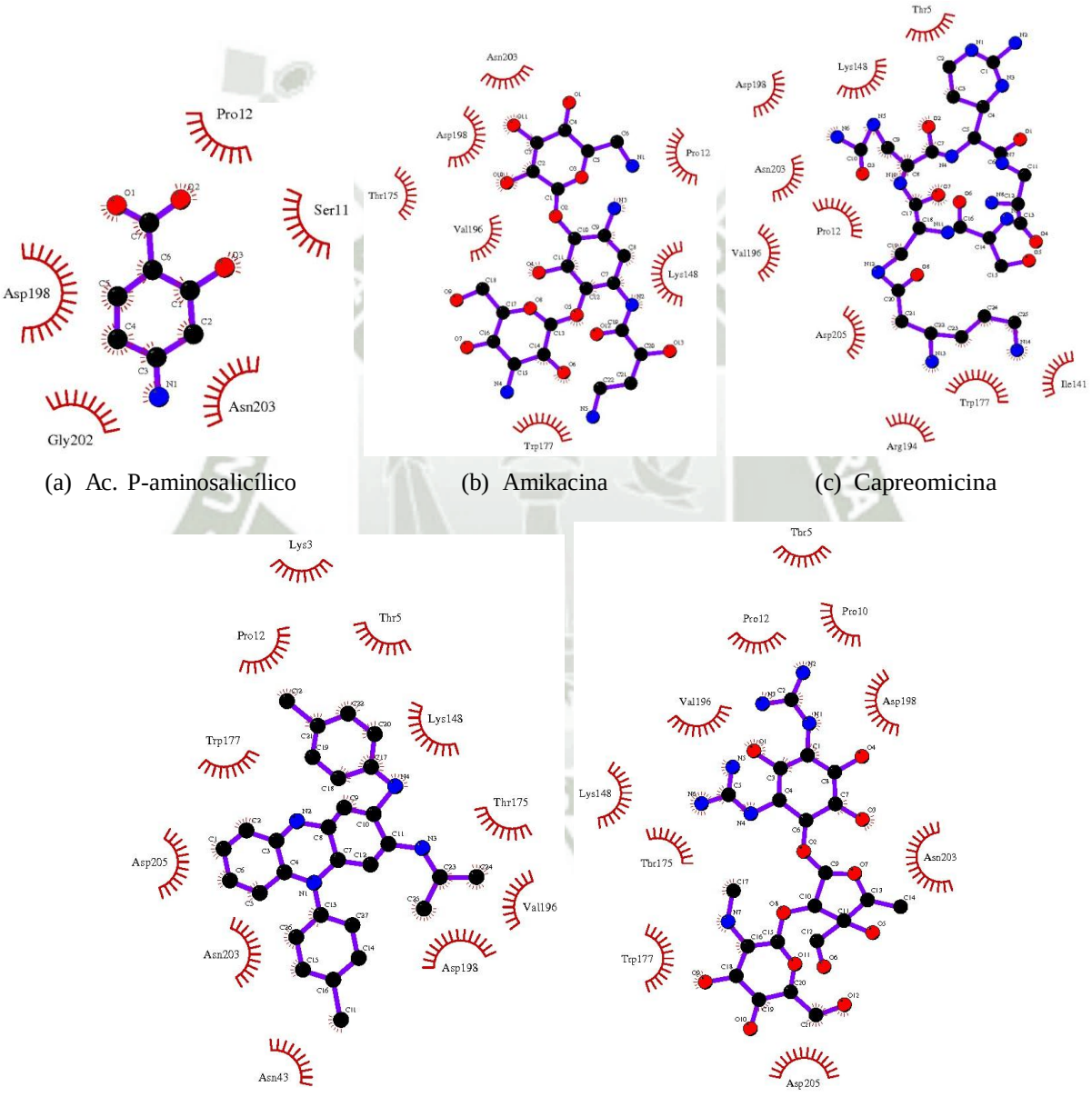
Tabla 4.13: Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, I parte.

| N° | AMINOÁCIDO | Ac. P-amino-salicílico | Amikacina | Capreomicina | Clofazimina | Estreptomicina |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **17** | ASP198 | x | x | x | x | x |
| **18** | LYS199 | - | - | - | - | - |
| **19** | GLN201 | - | - | - | - | - |
| **20** | GLY202 | x | - | - | - | - |
| **21** | ASN203 | x | x | x | x | x |
| **22** | ASP205 | - | - | x | x | x |

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Además se observan tres residuos que presentaron interacciones con los 5 fámacos analizados en este recuadro; PRO12, ASP198 y ASN203. Dichas visualizaciones se muestran en el apéndice A, dentro de las figuras **Figura** A.6 y A.7(a), en las que se observa claramente a los fármacos mencionados en este primer grupo por lo que encajan muy bien en su mayoría, en el bolsillo seleccionado como más drogable, por lo que se piensa que a pesar de la diferencias de los valores de energías, todos estos podrían ser candidatos muy aptos para ser usados en el tratamiento de la tuberculosis bovina.




(a) Ac. P-aminosalicílico (b) Amikacina (c) Capreomicina

(d) Clofazimina (e) Estreptomicina

Figura 4.24: Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. caprae*, correspondientes a la tabla 5.13.



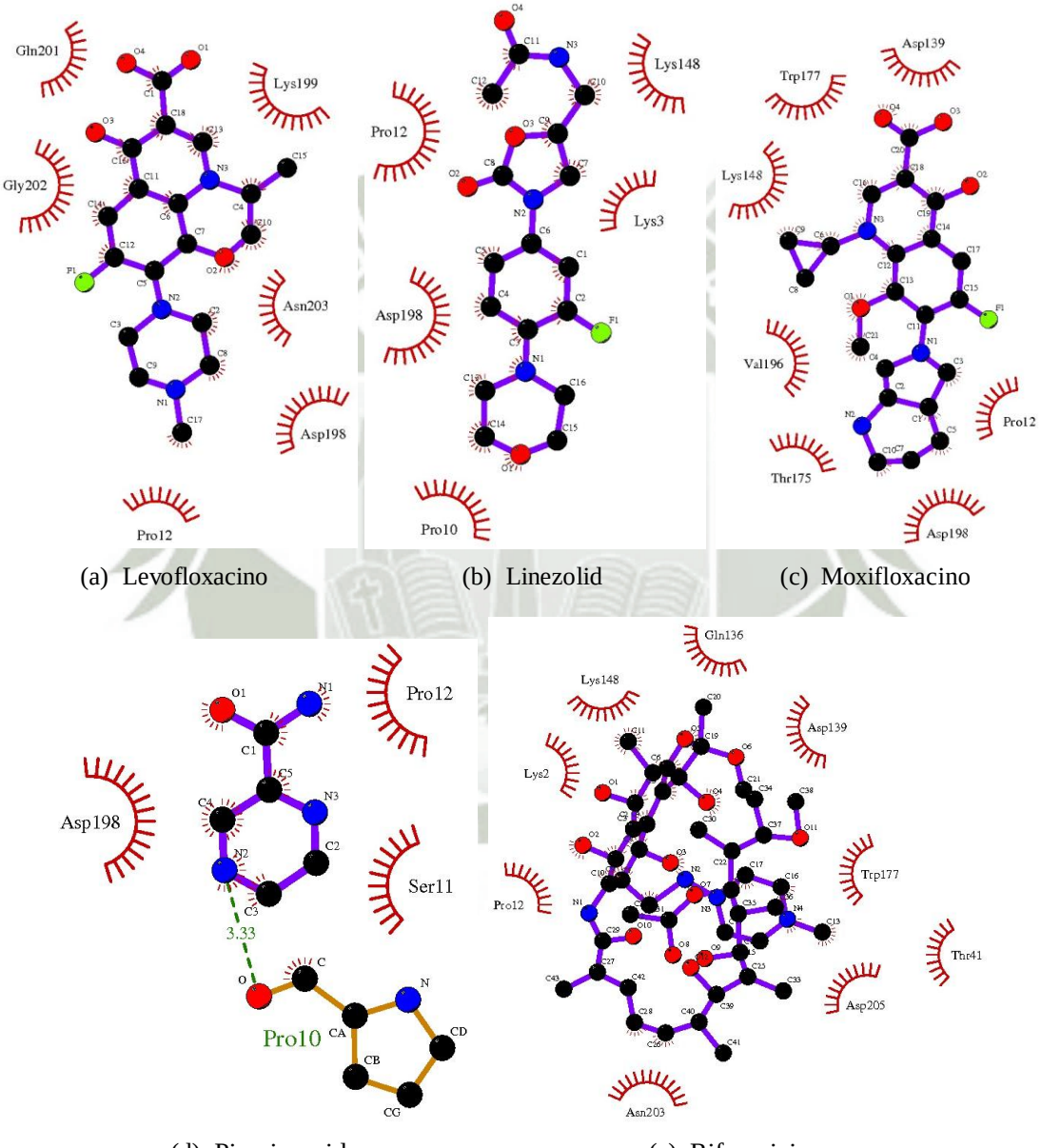
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

El segundo grupo de fámacos reportados en la **Tabla** 4.10, se refiere a los 6 últimos (levofloxacino, linezolid, moxifloxacino, pirazinamida, rifampicina, rifabutina), donde estos son analizados en la **Tabla** 4.14.

El ligando con un mayor número de aminoácidos interaccionantes con su estructura fue rifampicina con un total de 9 residuos interactuantes, seguido de moxifloxacino con 7 interacciones, mientras que Linezolid sólo presentó interacción con 5 aminoácidos del bolsillo.




(a) Levofloxacino (b) Linezolid (c) Moxifloxacino

(d) Pirazinamida (e) Rifampicina

Figura 4.25: Aproximación de las interacciones entre fármacos y bolsillo de LprF en *M. caprae*, correspondiente a la tabla 4.11.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Al revisar la **Figura** 4.25(e) encontramos que la rifampicina se encuentra casi totalmente rodeado de los aminoácidos correspondientes encerrándolo muy bien, además este fármaco un gran peso molecular, que podría ocupar en buena proporción el bolsillo de la lipoproteína F de esta especie, de manera similar que el primer grupo de fármacos sometidos al análisis en *M. caprae*, se reportó una incidencia repetida en los residuos LYS148, THR175, TRP177, ARG194, VAL196 y ASP198 en el caso de Moxifloxacino.

Un caso resaltante es la de Pirazinamida, pues a pesar que no hay muchos residuos (tan sólo 4 residuos) interatuantes entre ellos y la estructura del fármaco, esta fue capaz de la formación de un enlace puente de hidrógeno entre en átomo de nitrógeno (N2) del anillo con el único oxígeno del residuo de PRO10, con una distacia de 3.3 Å.

También, a pesar que la Rifabutina presentó un muy buen valor de energía de acoplamiento, no pudo ser ploteada mediante el visualizador LigPlot, ya que es probable que este haya caído en una posición complicada, con muchas interacciones o ligeramente alejada de la estructura del bolsillo, por lo que el visualizador no puede plotear las coordenadas del fármaco.

Por último, los ensambles de la lipoproteína y de los respectivos fármacos se muestran en el apéndice A, en la **Figura** A.7 y **Figura** A.8, donde se nota claramente que todos encajan muy bien en el bolsillo mencionado anteriormente, por lo que se presume que cualquiera de los fármacos reportados en esta última sección, pueden usados para el tratamiento de la tuberculosis bovina y caprina.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

Tabla 4.14: Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, II parte.

| N° | AMINOÁCIDO | Levofloxacino | Linezolid | Moxifloxacino | Pirazinamida | Rifampicina | Rifabutina |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | LYS1 | - | - | - | - | x | - |
| **2** | LYS3 | - | x | - | - | - | - |
| **3** | THR5 | - | - | - | - | - | - |
| **4** | PRO10 | - | x | - | Puente de H | - | - |
| **5** | SER11 | - | - | - | x | - | - |
| **6** | PRO12 | x | x | x | x | x | - |
| **7** | THR41 | - | - | - | - | x | - |
| **8** | ASN43 | - | - | - | - | - | - |
| **9** | GLN136 | - | - | - | - | x | - |
| **10** | ASP139 | - | - | x | - | x | - |
| **11** | ILE141 | - | - | - | - | - | - |
| **12** | LYS148 | - | x | x | - | x | - |
| **13** | THR175 | - | - | x | - | - | - |
| **14** | TRP177 | - | - | x | - | x | - |
| **15** | ARG194 | - | - | - | - | - | - |
| **16** | VAL196 | - | - | x | - | - | - |
| **17** | ASP198 | x | x | x | x | | - |

Tabla 4.14: Relación de fármacos que interaccionan con aminoácidos del bolsillo hidrofóbico de *M. caprae*, II parte.

| N° | AMINOÁCIDO | Levofloxacino | Linezolid | Moxifloxacino | Pirazinamida | Rifampicina | Rifabutina |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **18** | LYS199 | x | - | - | - | - | - |
| **19** | GLN201 | x | - | - | - | - | - |
| **20** | GLY202 | x | - | - | - | - | - |
| **21** | ASN203 | x | - | - | - | x | - |
| **22** | ASP205 | - | - | - | - | x | - |

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Conclusiones

1. Se logró obtener la estructura secundaria de la lipoproteína F (LprF) de *M. bovis BCG* en la base de datos del Protein Data Bank (pdb) con el código 4QA8, que fue usada como la plantilla con la que se pudo generar, bajo la metodología de modelamiento por homología, las lipoproteínas de las tres especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. caprae*.

2. Se logró optimizar los 18 ligandos mediante metodologías de química cuántica.

3. Se logró realizar la simulación de dinámica molecular de las tres LprF's modeladas en solvente explícito en un tiempo de 100 ns, con un ensamble NVT.

4. Se logró realizar el análisis de los sitios activos de las tres LprF's de *Mycobacterium* estudiadas donde se obtuvo un bolsillo funcional por especie, el cual es capaz de trabajar en un ambiente hidrofílico.

5. Se logró evaluar el mecanismo de unión de 18 fármacos al sitio activo elegido de las LprF's de *Mycobacterium* por medio del valor de las energías de acoplamientos obtenidas del virtual screening.

6. Se concluye finalmente que para la LprF de *M. tuberculosis* el fármaco *levofloxacino* podría unírsele debido a la formación de un enlace puente de hidrógeno con el residuo ARG194. Para la LprF de *M. bovis* se encontró dos fármacos con una buena energía de acoplamiento, *Isoniazida* y *Pirazinamida*, por lo que se les considera buenos candidatos para ser llevados por esta proteína a pesar de no haber formado enlaces puentes de hidrógeno con la estructura proteica. En la LprF de *M. caprae*, sin embargo se halló que la *pirazinamida* formó un enlace puente de hidrógeno con el residuo PRO10, por lo que se considera como un buen ligando para esta especie.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Recomendaciones

1. Es de gran importancia trabajar con secuencias y estructuras provenientes de bases de datos confiables como NCBI y American Chemical Society (ACS); por lo que se recomienda a los estudiantes hacer uso de ellas.

2. Se considera conveniente que tesistas y futuros investigadores realicen simulaciones de dinámica molecular con los bolsillos hidrofóbicos y sus respectivos fármacos para poder evaluar los cambios que podrían tener estos durante una minimización energética y su evolución en el tiempo.

3. Se considera conveniente realizar las simulaciones de dinámica molecular en un solvente hidrofóbico para poder analizar y comparar la reacción de las lipoproteínas en ambientes con estas características, por esta razón se recomienda a los investigadores que para estudios futuros, se busque otros tipos de solventes.

4. Se recomienda a futuros investigadores trabajar con una lipoproteína completa, es decir, sujeta a los cambios post-traduccionales, para realizar las comparaciones con este estudio.

5. Se considera conveniente impulsar a futuros investigadores realizar trabajos similares con otro tipo de lipoproteínas con el fin de hallar la estructura que trabaje mejor como posibles transportadores de fármacos.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Referencias Bibliográficas

[1] Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M. Resultados del muestreo de la tuberculosis bovina en el Perú. IVITA Fac Med Vet, UNMSM Tercer Boletín Extraordinario. 2008;50(4):286–291.

[2] Torres P. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. Programa Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis, SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal). 2006;.

[3] Cervellera MJB. La tuberculosis en la historia. Anales (Reial Acadèmia de Medicina de la Comunitat Valenciana). 2011;(12):7–8.

[4] Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature reviews Drug discovery. 2004;3(11):935.

[5] Arango CJJ, Maya JJM. Epidemiología veterinaria. Editorial El Manual Moderno; 2009.

[6] Lozano Mérida J. Tuberculosis: patogenia, diagnóstico y tratamiento. Offarm: Farmacia y Sociedad. 2002;21(8):102–110.

[7] Abbate EH, Palmero DJ, Castagnino J, Cufre M, Doval A, Estevan R, et al. Tratamiento de la tuberculosis: Guía práctica elaborada por la Sección Tuberculosis, Asociación Argentina de Medicina Respiratoria. Medicina (Buenos Aires). 2007;67(3):295–305.

[8] de la Salud OM. Informe mundial sobre la tuberculosis 2012. OMS Ginebra; 2012.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[9] Santos MdLSG, Vendramini SHF, Gazetta CE, Oliveira SAC, Villa TCS. Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. Revista latino-americana de enfermagem. 2007;15(SPE):762–767.

[10] Chacón O, Realpe T, Barletta RG, Robledo J. Inactivación de genes de Mycobacterium tuberculosis y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis. Biomédica. 2004;24:165–187.

[11] Pla RV, De Gracia Roldán X, Arribas AJ. Tuberculosis en la infección por VIH: patogenia, clínica y diagnóstico. Archivos de bronconeumología. 1992;28(1):39–44.

[12] Bonilla Asalde C. Situación de la tuberculosis en el Perú: current status. Acta Médica Peruana. 2008;25(3):163–170.

[13] Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). Veterinary research. 2005;36(3):411–436.

[14] Garrido JB. Tuberculosis caprina: estudio de la respuesta inmune y aportaciones a su diagnóstico; 2011.

[15] Pérez JR, de Mendoza Salcedo JH, Galván JC. Tuberculosis bovina. Patogenia. Bovis. 1992;(47):35–42.

[16] Hope J, Thom M, McCormick P, Howard C. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. Veterinary immunology and immunopathology. 2004;100(3-4):187–195.

[17] Rivera S, Giménez JF. La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. REDVET Revista electrónica de Veterinaria. 2010;11(9).

[18] Martínez BR, García AM, de Juan Ferré L, Martín AA. Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública. 2010;.

[19] Salem S, Gros P. Genetic determinants of susceptibility to Mycobacterial infections: IRF8, a new kid on the block. In: The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis. Springer; 2013. p. 45–80.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[20] Offiong EE, Obioku OE, Akpabio U, Ukpanah U. Retrospective Study on the Incidence of Bovine Tuberculosis A Case Study of Abak Abbattoir;.

[21] De Ward J. Tuberculosis bovina. Manual del Ganadería Doble Propósito Ediciones Astro Data, SA Maracaibo, Venezuela. 2005;p. 364–369.

[22] Abalos P, Retamal P. Tuberculosis:? una zoonosis reemergente? Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 2004;23(2):583–594.

[23] Imperiale B, Morcillo N, Bernardelli A. Identificación fenotípica de micobacterias. Bioquímica y Patología Clínica. 2007;71(2):47–51.

[24] de Vega FAF, Moreno JE, Martín JG, Gutiérrez JJP. Procedimientos en Microbiología Clínica;.

[25] García Ramos R, Lado Lado F, Túnez Bastida V, Pérez del Molino Bernal M, Cabarcos Ortiz de Barrón A. Tratamiento actual de la tuberculosis. In: Anales de medicina interna. vol. 20. SciELO Espana; 2003. p. 43–52.

[26] Pfyffer GE, Palicova F. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. American Society of Microbiology; 2011. p. 472–502.

[27] Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. Elsevier Brasil; 2015.

[28] Ho MM. Methods in Molecular Medicine Mycobacterium tuberculosis Protocols. The Journal of Medical Microbiology. 2002;51(4):359–360.

[29] Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana; 2008.

[30] Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. Advances in applied microbiology. 2009;69:23–78.

[31] Hernández C, de Adjounian MFC, Zamora F, Rossi M, Rico SG, Pedroza R, et al. Aislamiento e identificación de micobacterias mediante métodos bacterioló-



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

gicos y de biología molecular. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2005;25(2):203–216.

[32] Medina GJ, Gómez V, Arroyave O, Maldonado JG. Estandarización de dos técnicas de aislamiento para detección de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en bovinos. CIENCIAS FORENSES Y DE LA SALUD. 2014;8(8).

[33] Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The Mycobacterial cell wall—Peptidoglycan and arabinogalactan. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(8):a021113.

[34] Gorocica P, Jiménez-M GY, Sada I, Lascuraín R. Structural components of the envelope of Mycobacterium tuberculosis that intervene in the pathogenesis of tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005;18:142–153.

[35] Alejandra RRN, Elvia CRB, Armando MP, José AB. Mycobacterium tuberculosis: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. Revista Médica de la Universidad Veracruzana. 2002;2(2):39–43.

[36] Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. Assembly of the mycobacterial cell wall. Annual review of microbiology. 2015;69:405–423.

[37] Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2003;83(1):91–97.

[38] Rezwan M, Grau T, Tschumi A, Sander P. Lipoprotein synthesis in mycobacteria. Microbiology. 2007;153(3):652–658.

[39] Kovacs-Simon A, Titball R, Michell SL. Lipoproteins of bacterial pathogens. Infection and immunity. 2011;79(2):548–561.

[40] von Heijne G. The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. Protein Engineering, Design and Selection. 1989;2(7):531–534.

[41] Sutcliffe IC, Harrington DJ. Lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. FEMS microbiology reviews. 2004;28(5):645–659.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[42] Kim JS, Jiao L, Oh JI, Ha NC, Kim YH. Crystal structure and functional implications of LprF from Mycobacterium tuberculosis and M. bovis. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2014;70(10):2619–2630.

[43] Brülle JK, Grau T, Tschumi A, Auchli Y, Burri R, Polsfuss S, et al. Cloning, expression and characterization of Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprF. Biochemical and biophysical research communications. 2010;391(1):679–684.

[44] Martinot AJ, Farrow M, Bai L, Layre E, Cheng TY, Tsai JH, et al. Mycobacterial metabolic syndrome: LprG and Rv1410 regulate triacylglyceride levels, growth rate and virulence in Mycobacterium tuberculosis. PLoS pathogens. 2016;12(1):e1005351.

[45] Drage MG, Tsai HC, Pecora ND, Cheng TY, Arida AR, Shukla S, et al. Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. Nature Structural and Molecular Biology. 2010;17(99):1088.

[46] Boldú J, Cebollero P, Abu J, Prado Ad. Tratamiento de la tuberculosis pulmonar. In: Anales del Sistema Sanitario de Navarra. vol. 30. SciELO Espana; 2007. p. 99–115.

[47] KANTOR D, ISABEL N, TORRES PM, MORCILLO N, IMAZ MS, SEQUEIRA MD. LA TUBERCULOSIS ZOONÓTICA EN LA ARGENTINA. MEDICINA (Buenos Aires). 2012;72(6).

[48] Collaguazo C, Martín D. Prevalencia de Tuberculosis Bovina (TBB) mediante inspección post-mortem y cultivo bacteriológico en el Matadero Municipal del Cantón Mejía (Pichincha) [B.S. thesis]. Quito: UCE; 2014.

[49] Gil A, Samartino L, et al. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Rome: FAO. 2001;p. 12–3.

[50] Almazán García I, et al. Relación de peso y medidas corporales en cabras de raza alpina en la producción y calidad de leche. 2012;.

[51] Asensio CB, Casanova MG, López BB, Zaragozano JF. Tuberculosis ganglionar producida por «Mycobacterium bovis», transmitida por herida de asta de vaca. Acta Pediatrica Espanola. 2004;62(10):485.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[52] Francis SA, Smith F, Malkinson J. Integrated Pharmacy Case Studies. Pharmaceutical Press; 2015.

[53] PubChem. CID 978; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/para-aminobenzoic%20acid#section=Top.

[54] Korolkovas A, Burckhalter JH. Compendio esencial de química farmacéutica. Reverté; 1983.

[55] PubChem. CID 4649; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4649#section=Top.

[56] Siddiqi A, Khan D, Khan F, Razzaq A. Therapeutic drug monitoring of amikacin in preterm and term infants. Singapore medical journal. 2009;50(5):486.

[57] PubChem. CID 37768; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37768#section=Top.

[58] Thesaurus N. Amikacin; 2018. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jspdictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C61615.

[59] DrugBank. Amikacin; 2018. Available from: http://www.drugbank.ca/drugs/DB00479.

[60] PubChem. CID 5388906; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5388906#section=Top.

[61] Thesaurus N. Bedaquiline; 2018. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C87658.

[62] DrugBank. Bedaquilina; 2018. Available from: http://www.drugbank.ca/drugs/DB08903.

[63] Hards K, Robson JR, Berney M, Shaw L, Bald D, Koul A, et al. Bactericidal mode of action of bedaquiline. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015;70(7):2028–2037.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[64] Lin Y, Li Y, Zhu N, Han Y, Jiang W, Wang Y, et al. The antituberculosis antibiotic capreomycin inhibits protein synthesis by disrupting interaction between ribosomal proteins L12 and L10. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(4):2038–2044.

[65] PubChem. CID 6234; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6234#section=Top.

[66] DrugBank. Capreomicina; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00314#BE0004846.

[67] Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, Douthwaite S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded $2^{0}$-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. Molecular cell. 2006;23(2):173–182.

[68] Koul A, Dendouga N, Vergauwen K, Molenberghs B, Vranckx L, Willebrords R, et al. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. Nature chemical biology. 2007;3(6):323.

[69] PubChem. CID 3000502; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000502#section=Top.

[70] DrugBank. Cycloserine; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00260.

[71] Manallack DT. The p K a distribution of drugs: application to drug discovery. Perspectives in medicinal chemistry. 2007;1:1177391X0700100003.

[72] Sheinin A, Shavit S, Benveniste M. Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. Neuropharmacology. 2001;41(2):151–158.

[73] PubChem. CID 2794; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2794#section=Top.

[74] DrugBank. Clofazimine; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00845.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[75] Oliva B, O'Neill AJ, Miller K, Stubbings W, Chopra I. Anti-staphylococcal activity and mode of action of clofazimine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004;53(3):435–440.

[76] Arbiser JL, Moschella SL. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. Journal of the American Academy of Dermatology. 1995;32(2):241–247.

[77] PubChem. CID 6480466; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6480466#section=Top.

[78] Ryan NJ, Lo JH. Delamanid: first global approval. Drugs. 2014;74(9):1041–1045.

[79] PubChem. CID 19649; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19649#section=Top.

[80] DrugBank. Delamanid; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB11637.

[81] DrugBank. Streptomycen; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB01082.

[82] PubChem. CID 14052; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14052#section=Top.

[83] DrugBank. Ethambutol; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00330.

[84] Mikusova K, Slayden RA, Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(11):2484–2489.

[85] Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, Chojnacki T, Brennan PJ. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. Journal of Biological Chemistry. 1994;269(37):23328–23335.

[86] PubChem. CID 2761171; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2761171#section=Top.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[87] Thesaurus N. Ethionamide; 2018. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C47522.

[88] Wang F, Langley R, Gulten G, Dover LG, Besra GS, Jacobs WR, et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. Journal of experimental medicine. 2007;204(1):73–78.

[89] PubChem. CID 3767; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3767#section=Top.

[90] Thesaurus N. Isoniazid; 2018. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C600.

[91] Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. Molecular microbiology. 2006;62(5):1220–1227.

[92] PubChem. CID 6032; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6032#section=Top.

[93] DrugBank. Kanamycin; 2018. Available from: http://www.drugbank.ca/drugs/DB01172.

[94] (HMDB) HMD. Kanamycin; 2018. Available from: http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0015303.

[95] PubChem. CID 149096; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/149096#section=Top.

[96] Thesaurus N. Levofloxacin; 2018. Available from: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C1586.

[97] PubChem. CID 441401; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441401#section=Top.

[98] DrugBank. Linezolid; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00601.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[99] Swaney SM, Aoki H, Ganoza MC, Shinabarger DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1998;42(12):3251–3255.

[100] DrugBank. Moxifloxacin; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00218.

[101] Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clinical infectious diseases. 2001;32(Supplement_1):S9–S15.

[102] PubChem. CID 1046; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1046#section=Top.

[103] DrugBank. Pyrazinamide; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00339.

[104] Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(5):790–795.

[105] PubChem. CID 6323490; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6323490#section=Top.

[106] DrugBank. Rifabutin; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB00615.

[107] Floss HG, Yu TW. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. Chemical reviews. 2005;105(2):621–632.

[108] PubChem. CID 5381226; 2018. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5381226#section=Top.

[109] DrugBank. Rifampicin; 2018. Available from: https://www.drugbank.ca/drugs/DB01045.

[110] Wehrli W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. Reviews of infectious diseases. 1983;5(Supplement_3):S407–S411.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[111] Lahoz-Beltrá R. Bioinformática: simulación, vida artificial e inteligencia artificial. Ediciones Díaz de Santos; 2010.

[112] Barazorda H. Interacción de la region poliglutaminica de la proteínas que genera la enfermedad de Huntington con osmolitos organicos, por metodos de bioinformatica. Universidad Catolica de Santa María;.

[113] Ramachandran K, Deepa G, Namboori K. Computational chemistry and molecular modeling: principles and applications. Springer Science & Business Media; 2008.

[114] Lewars EG. Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. Springer; 2016.

[115] Beck EJ, Drysdale KD, Thompson LK, Li L, Murphy CA, Aquino MA. Weak intermolecular antiferromagnetic exchange in {[Ru2 (O2CCH3) 4 (L)] X} n polymers (L= 4, $4^0$-dipyridine and 1, 4-diazabicyclooctane, X= PF6- or BPh4-). Inorganica chimica acta. 1998;279(1):121–125.

[116] Pérez MSA. Mecánica molecular. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 1994;.

[117] Leach AR, et al. Molecular modelling: principles and applications. 2001. Harlow: Prentice Hall. 2010;24(744):2.

[118] de la Vega JMG. La Química Computacional como herramienta de la Química Experimental. Encuentro con la Química. 2015;p. 44.

[119] Callejas Basto JF, et al. Producción de un Éster Graso de Azúcar para su Utilización como Surfactante. Universidad Nacional de Colombia;.

[120] Bourne P. Will a biological database be different from a biological journal? PLoS Computational Biology. 2005;1(3):e34.

[121] Carvajal Patiño DF, et al. Un método híbrido para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos. Universidad Nacional de Colombia-Sede de Bogotá;.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[122] Moreno OAF, Montoya JEZ, Buelvas LM, Ortiz O. Hidrolizados proteicos y perspectivas del modelamiento en cinética enzimática de proteínas: una revisión. Revista Agunkuya. 2015;2(1):64–78.

[123] Eswar N, John B, Mirkovic N, Fiser A, Ilyin VA, Pieper U, et al. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. Nucleic acids research. 2003;31(13):3375–3380.

[124] Webb B, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. In: Protein Structure Prediction. Springer; 2014. p. 1–15.

[125] Xiang Z. Advances in homology protein structure modeling. Current Protein and Peptide Science. 2006;7(3):217–227.

[126] Xu D, Zhang Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2012;80(7):1715–1735.

[127] Hardin C, Pogorelov TV, Luthey-Schulten Z. Ab initio protein structure prediction. Current opinion in structural biology. 2002;12(2):176–181.

[128] Shattuck TW. Colby College Molecular Mechanics Tutorial. Department of Chemistry, Colby College, Waterville, Maine. 2008;4901.

[129] Pall S, Abraham MJ, Kutzner C, Hess B, Lindahl E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: International Conference on Exascale Applications and Software. Springer; 2014. p. 3–27.

[130] Hashmi I, Shehu A. Informatics-driven protein-protein docking. In: Proceedings of the International Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedical Informatics. ACM; 2013. p. 771.

[131] Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nature reviews Drug discovery. 2004;3(11):935.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

[132] Audie J, Swanson J. Advances in the Prediction of Protein–Peptide Binding Affinities: Implications for Peptide-Based Drug Discovery. Chemical biology & drug design. 2013;81(1):50–60.

[133] Abraham M, Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, van Buuren A, Apol E, et al.. GROMACS User Manual version 5.1; 2015.

[134] Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. Journal of molecular biology. 1963;7(1):95–99.

[135] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics. 1996;14(1):33–38.

[136] Ho BK, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. BMC structural biology. 2005;5(1):14.

[137] FERENCI T, BOOS W, SCHWARTZ M, SZMELCMAN S. Energy-Coupling of the Transport System of Escherichia coli Dependent on Maltose-Binding Protein. The FEBS Journal. 1977;75(1):187–193.

[138] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 2015;1:19–25.

[139] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry. 2004;25(13):1605–1612.

[140] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics. 1996;14(1):33–38.

[141] Schaftenaar G, Noordik JH. Molden: a pre-and post-processing program for molecular and electronic structures. Journal of computer-aided molecular design. 2000;14(2):123–134.

[142] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein engineering, design and selection. 1995;8(2):127–134.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

[143] Frisch M, Trucks G, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, et al.. Gaussian 09, revision D. 01. Gaussian, Inc., Wallingford CT; 2009.

[144] Dennington R, Keith T, Millam J, et al. GaussView, version 5. 2009;.

[145] Hsu KC, Chen YF, Lin SR, Yang JM. iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. BMC bioinformatics. 2011;12(1):S33.

[146] Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, et al. Structure validation by Cα geometry: φ, ψ and Cβ deviation. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2003;50(3):437–450.

[147] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank, 1999–. In: International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of biological macromolecules. Springer; 2006. p. 675–684.

[148] Hussein HA, Borrel A, Geneix C, Petitjean M, Regad L, Camproux AC. PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. Nucleic acids research. 2015;43(W1):W436–W442.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Anexos



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

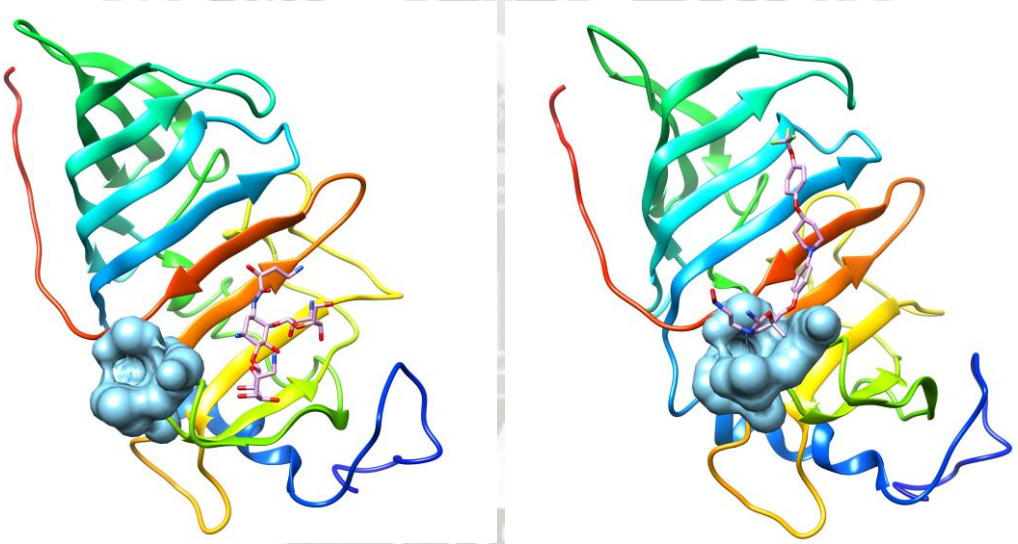
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

# Anexo A

# Virtual Screening

A continuación, se muestran las figuras del ensamble de cada fármaco apto y su respectiva lipoproteína:



(a) Ensamble LprF - Amikacina (b) Ensamble LprF - Delamanid

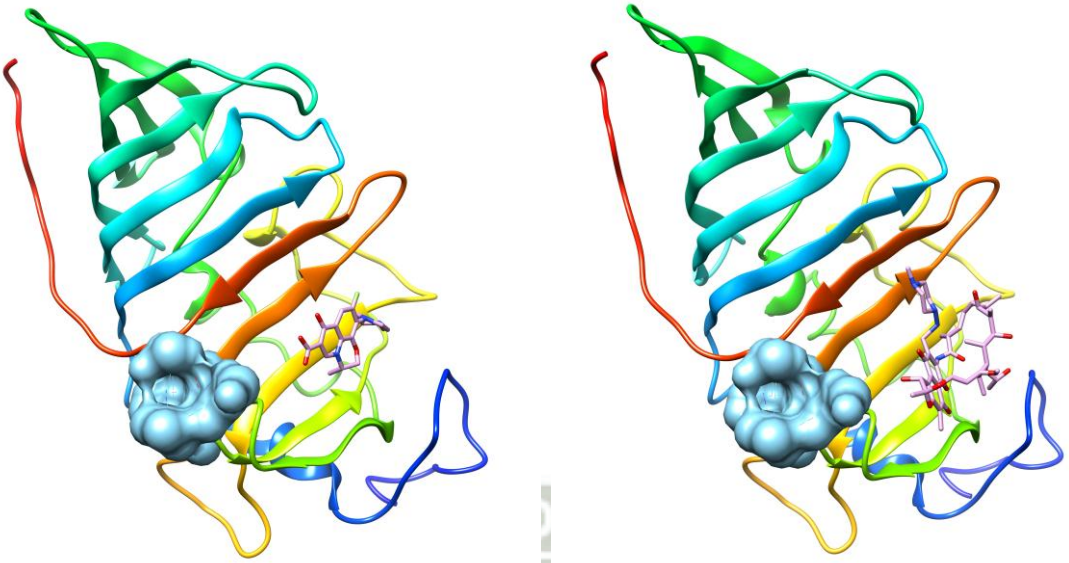
Figura A.1: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. tuberculosis*.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

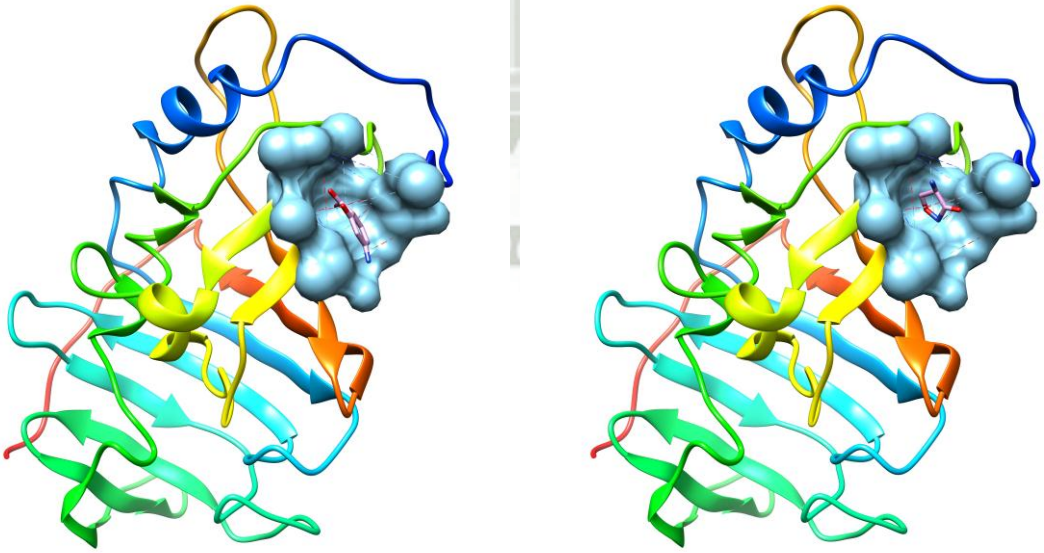
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Ensamble LprF - Levofloxacino (b) Ensamble LprF - Rifampicina

Figura A.2: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. tuberculosis*.



(a) Ensamble LprF - Ac. P-aminosalicílico (b) Ensamble LprF - Cicloserina

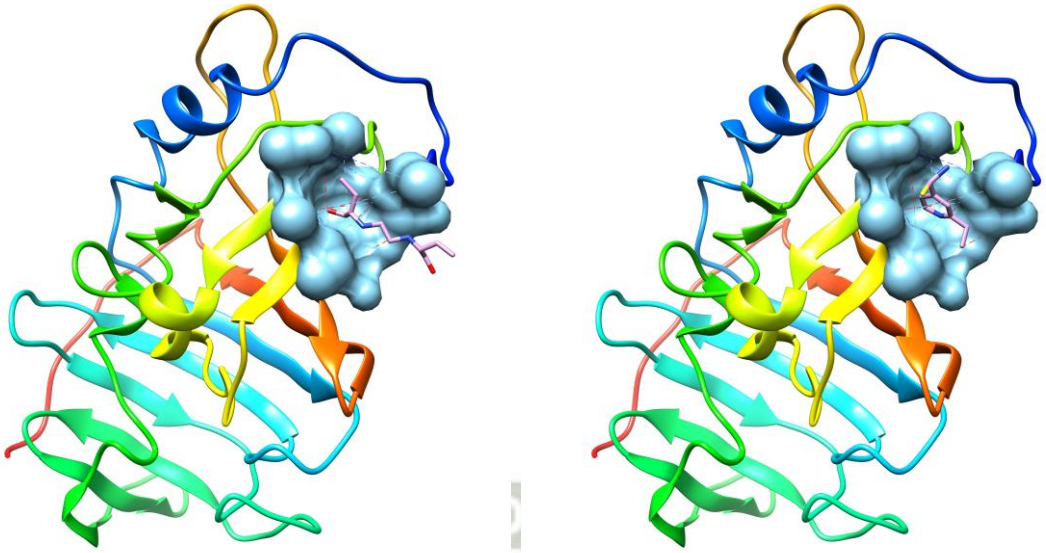
Figura A.3: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

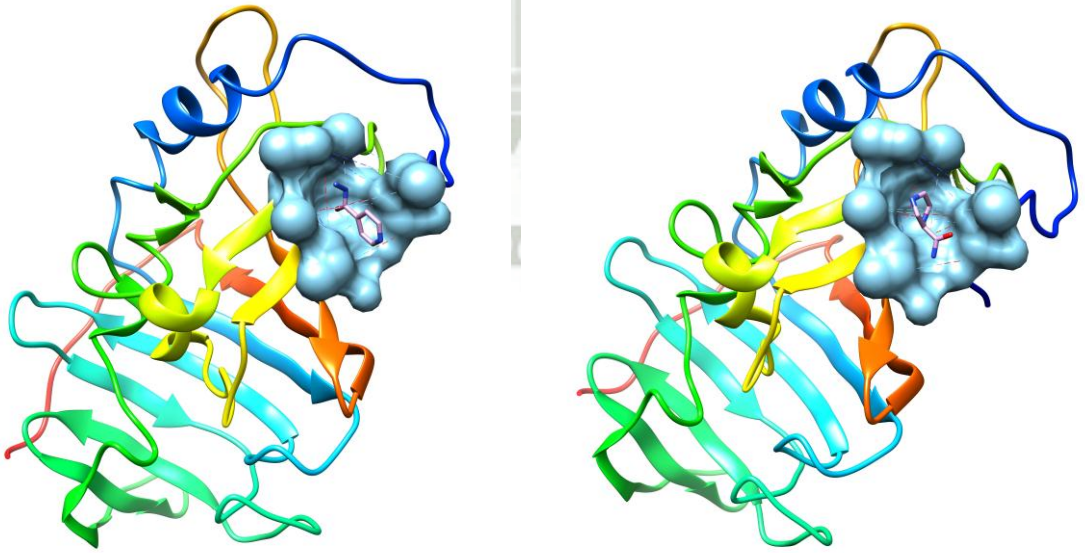
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Ensamble LprF - Ethambutol (b) Ensamble LprF - Etionamida

Figura A.4: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*.



(a) Ensamble LprF - Isoniazida (b) Ensamble LprF - Pirazinamida

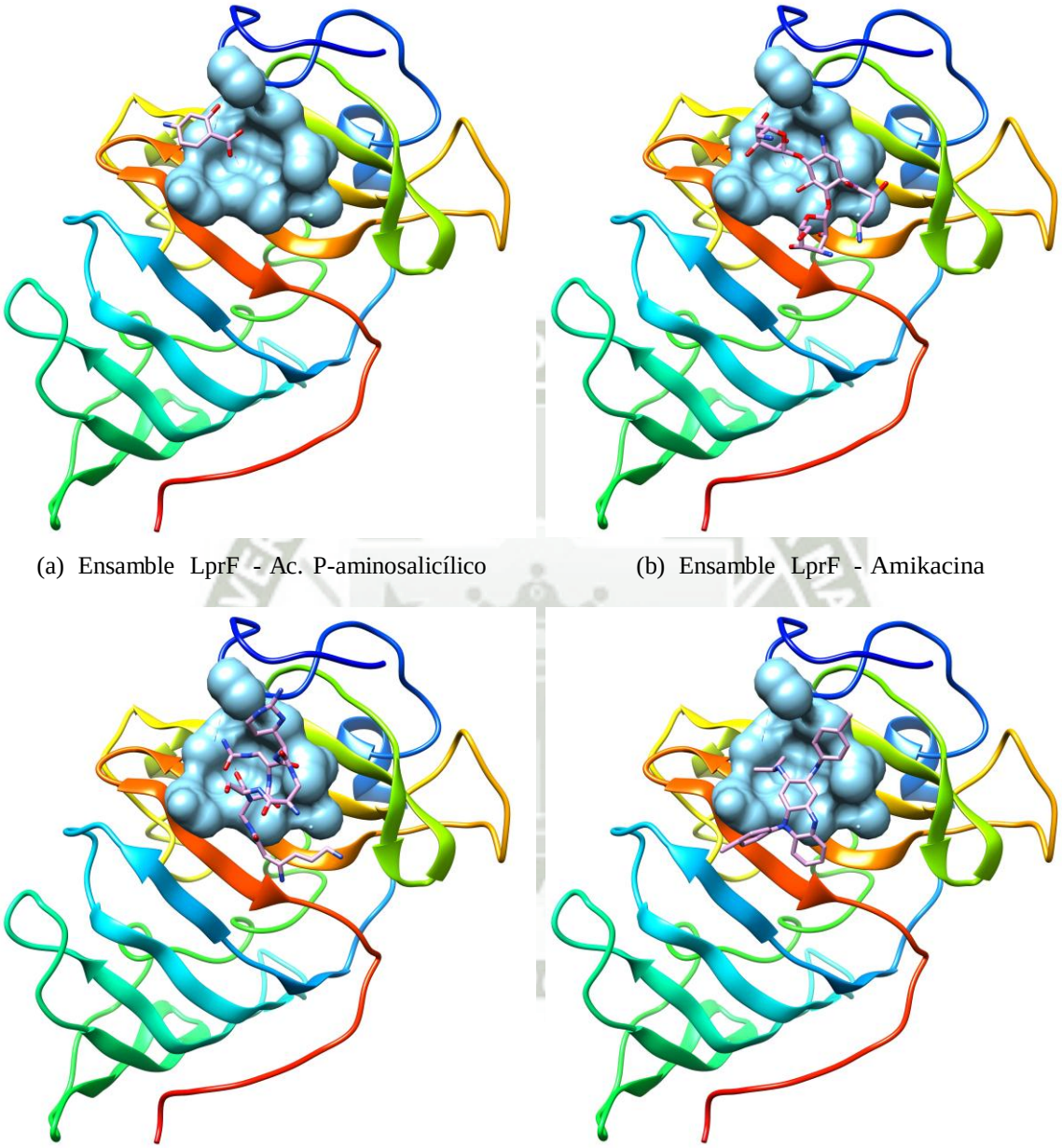
Figura A.5: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. bovis*.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Ensamble LprF - Ac. P-aminosalicílico

(b) Ensamble LprF - Amikacina

(c) Ensamble LprF - Capreomicina

(d) Ensamble LprF - Clofazimina

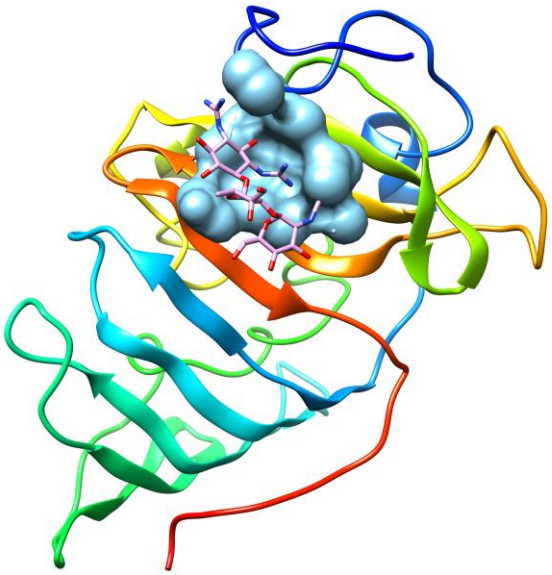
Figura A.6: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*.



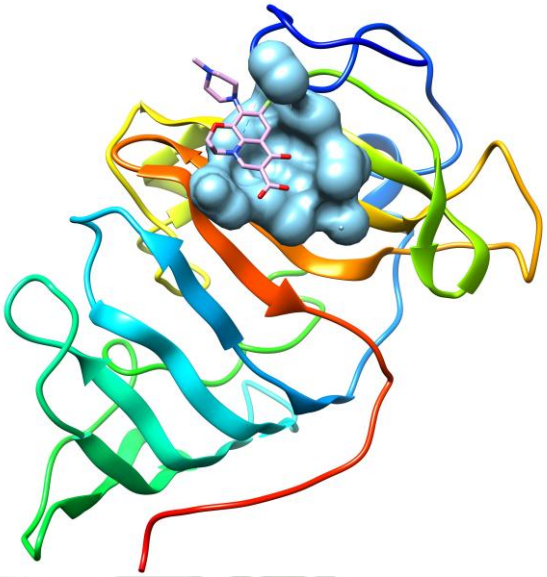
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

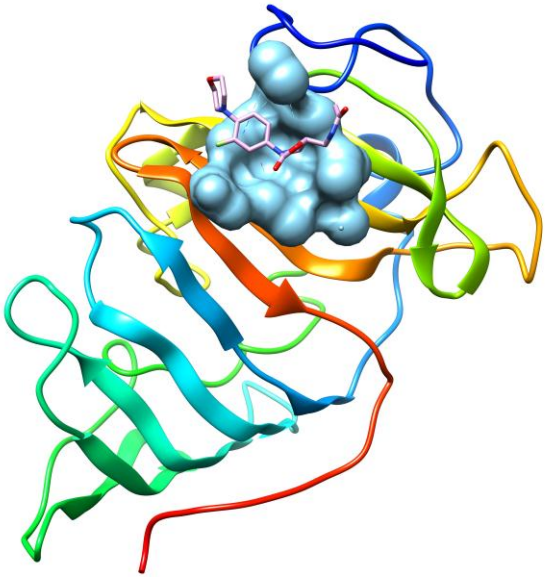
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



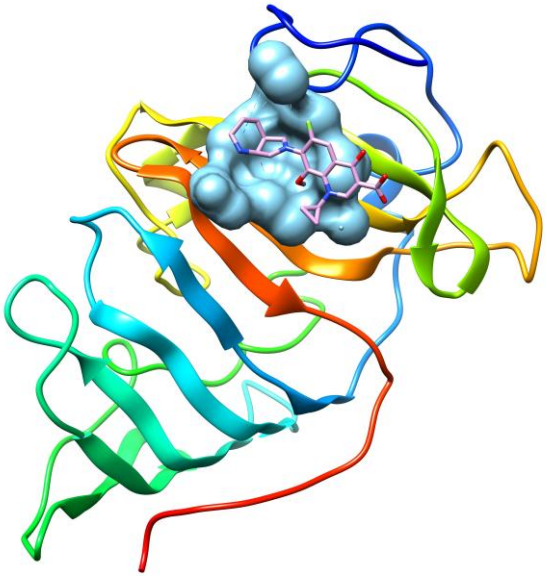
(a) Ensamble LprF - Estreptomicina



(b) Ensamble LprF - Levofloxacino



(c) Ensamble LprF - Linezolid



(d) Ensamble LprF - Moxifloxacino

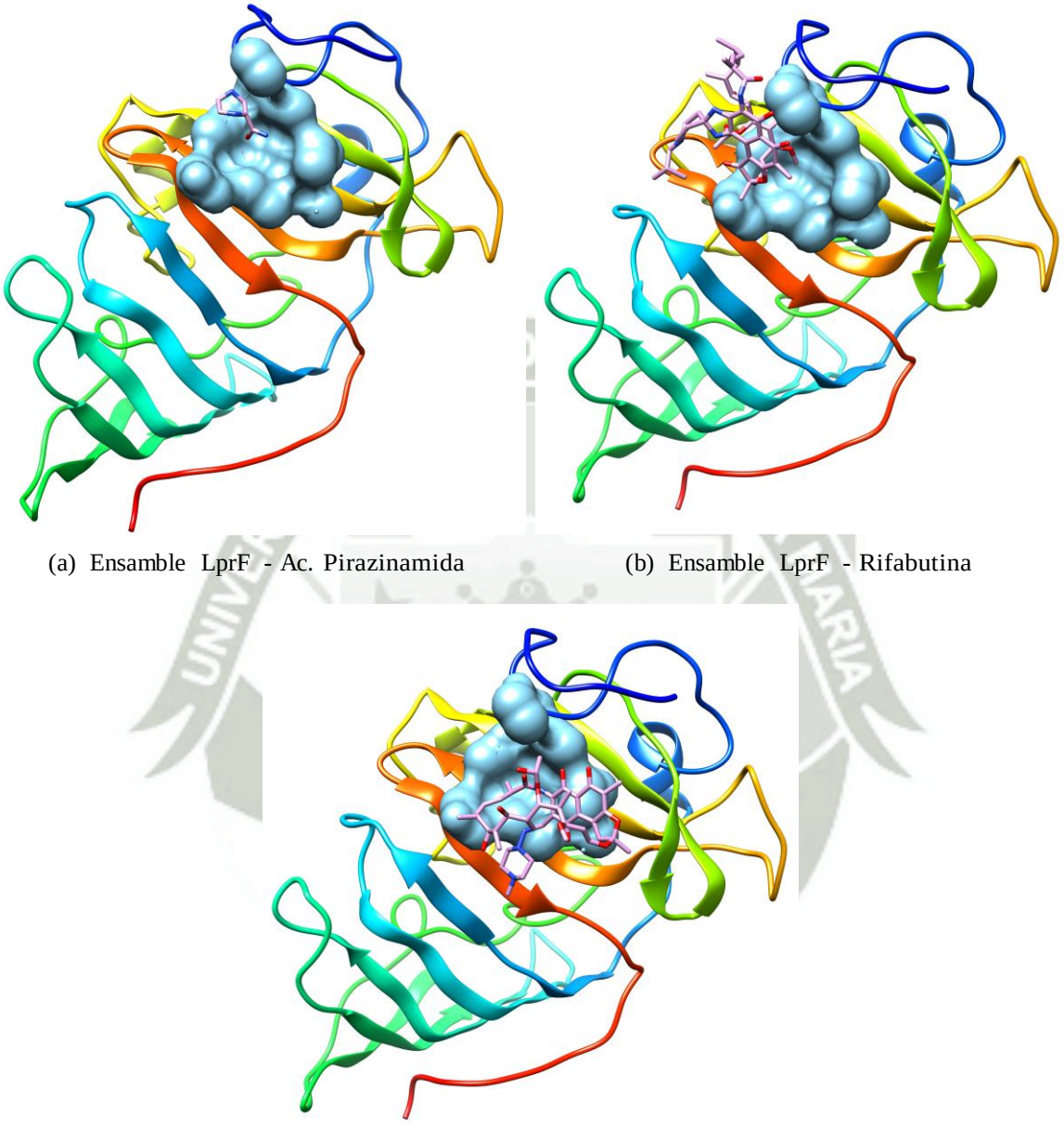
Figura A.7: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



(a) Ensamble LprF - Ac. Pirazinamida

(b) Ensamble LprF - Rifabutina

(c) Ensamble LprF - Rifampicina

Figura A.8: Ensambles de fármacos seleccionados con LprF de *M. caprae*.



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis