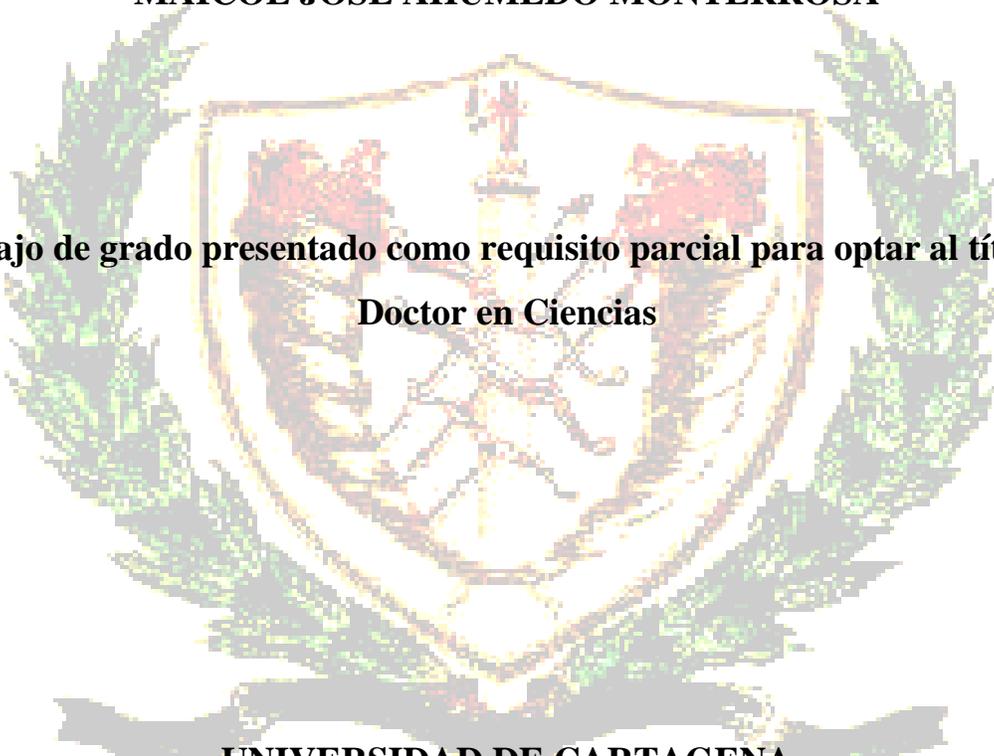


**MODELADO MOLECULAR DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE
LAS ACIL HOMOSERINA LACTONAS EN EL SITIO ACTIVO DEL
RECEPTOR LasR**

MAICOL JOSE AHUMEDO MONTERROSA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias**



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE QUÍMICA CUÁNTICA Y TEÓRICA
CARTAGENA, D. T. y C.
JUNIO 2018**

**MODELADO MOLECULAR DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE
LAS ACIL HOMOSERINA LACTONAS EN EL SITIO ACTIVO DEL
RECEPTOR LasR**

MAICOL JOSE AHUMEDO MONTERROSA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias**

DIRECTOR

RICARDO VIVAS REYES

Co-DIRECTORES

JORGE ALI TORRES

JHON ZAPATA RIVERA

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE QUÍMICA CUÁNTICA Y TEÓRICA
CARTAGENA, D. T. y C.
JUNIO 2018**

**MODELADO MOLECULAR DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE
LAS ACIL HOMOSERINA LACTONAS EN EL SITIO ACTIVO DEL
RECEPTOR LasR**

MAICOL JOSE AHUMEDO MONTERROSA

**RICARDO VIVAS REYES
DIRECTOR**



**JORGE ALI TORRES
Co-DIRECTOR**



**JHON ZAPATA RIVERA
Co-DIRECTOR**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE QUÍMICA CUÁNTICA Y TEÓRICA
CARTAGENA, D. T. y C.
JUNIO 2018**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo de mis padres Lelia Monterrosa y Nilson Ahumedo a quienes he dedicado todos mis trabajos académicos. A mis dos grandes amores mi hijo Thiago Ahumedo y mi esposa Yoelis Arias, quienes me han sostenido en mis momentos de debilidad y son mi fuente de inspiración. Doy gracias a mis hermanos Nilson y Vanessa Ahumedo Monterrosa por ser un soporte especial durante toda mi vida.

Agradezco a mi director y amigo Profesor Ricardo Vivas Reyes, quien ha apoyado mi carrera académica y científica desde hace muchos años siendo siempre una fuente de sabios consejos no solo en aspectos científicos o académicos sino también de carácter personal. A mis co-directores los doctores Jorge Ali Torres y Jhon Zapata Rivera, por sus opiniones sinceras respecto a mi trabajo.

Un agradecimiento muy especial al grupo de química cuántica y computacional de la universidad nacional de Colombia quienes me abrieron las puertas de su grupo para realizar mis pasantías, en especial a mi asesor y amigo Dr. Johan Fabian Galindo, quien me ayudo de manera constante en el desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros y amigos del grupo de química cuántica y teórica de la universidad de Cartagena. Un agradecimiento a mis Profesores del Doctorado los Doctores Juan Carlos Drosos, Boris Johnson, Darío Méndez, Maricela Viola, Roberto Fernández, Beatriz Jaramillo, Edgardo Meza y Rafael Galeano, por sus opiniones siempre objetivas y honestas. Muchas gracias a los evaluadores de este trabajo por sus recomendaciones y correcciones. Agradezco a la Universidad de Cartagena y al departamento de Postgrado, en especial a Sara Ines por su apoyo en las labores administrativas.

Quiero agradecer a la Fundación universitaria tecnológico Comfenalco por brindarme la oportunidad de estar en su planta docente, a mi Jefe el ingeniero José Solana por confiar en mí y en mis capacidades como docente. A la profesora Ganibeth Manjarrez por su apoyo incondicional y soporte durante mis pasantías.

Un agradecimiento muy especial a mis amigos amantes de la química Jorge Anaya Gil y Benicio Sanchez, quienes despertaron en mí el amor hacia esta ciencia tan exquisita llamada química y me enseñaron que la constancia, dedicación y el amor al enseñar es lo que convierte en maestro.

Y mi agradecimiento infinito a Dios quien permitió realizara este trabajo y me dio el regalo más grande del mundo, ser el padre de Thiago.

CONTENIDO

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Comunicación bacteriana	4
1.2. Quorum sensing	5
1.3. Autoinductores	6
1.4. <i>Quorum sensing</i> en bacterias Gram negativas	8
1.4.1. Acil homoserina lactonas (<i>AHL</i>).....	9
1.4.2. Funciones de la familia de proteínas <i>LuxI</i> y <i>LuxR</i>	11
1.5. <i>Quorum sensing</i> en <i>Pseudomona aeruginosa</i>	14
1.6. Modulación del Quorum sensing en bacterias Gram negativas	17
1.6.1. Inhibición de la enzima tipo <i>LuxI</i>	17
1.6.2. Diseminación de la señal <i>AHL</i>	17
1.6.3. Inhibición en la recepción de la señal	18
1.7. <i>Quórum sensing</i> como blanco para terapia anti-microbiana	19
2. MODELADO MOLECULAR.....	22
2.1. Mecánica molecular	22
2.2. Dinámica molecular	25
2.2.1. Cálculo de Energías Libres de Unión Proteína-Ligando.....	27
2.3. Mecánica cuántica	30
2.3.1. Métodos <i>ab initio</i>	31
2.3.2. Métodos semiempíricos	32
2.3.3. Teoría del funcional de la densidad (DFT)	33
2.3.4. Conjunto de Funciones de Bases.....	34
2.4. Cribado de ligandos asistido por ordenador	35
2.4.1. Cribado virtual basado en ligandos o métodos indirectos	36
2.4.2. Cribado virtual basado en el receptor o métodos directos	41
3. OBJETIVOS	44
4. METODOLOGÍA.....	47
4.1 Modelado molecular de análogos sobre el receptor <i>LasR</i> de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	47
4.1.1. Acoplamiento molecular	47
4.1.2. 3D-QSAR	48
4.1.3. Simulaciones de dinámica molecular	50
4.1.4. Cálculo de energías libres de unión mediante MM-PBSA y MM-GBSA.	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Validación de la metodología de acoplamiento molecular	52

5.2 Acoplamiento entre <i>LasR</i> y Análogos.....	54
5.2.1. Acoplamiento entre <i>LasR</i> y <i>AHLs</i> no nativos	58
5.2.2. Acoplamiento entre <i>LasR</i> y otros análogos.....	59
5.2.3. Acoplamiento entre <i>LasR</i> y <i>PHLs</i>	59
5.2.4. Acoplamiento entre <i>LasR</i> y <i>POHLs</i>	61
5.2.5. Acoplamiento entre <i>LasR</i> y <i>PPHLs</i>	63
5.3. 3D-QSAR.....	66
5.3.1. Resultados estadísticos del COMFA.....	67
5.4. Simulaciones de dinámica molecular.....	72
5.4.1. Análisis del RMSD.....	72
5.4.2. Análisis del RMSF	74
5.4.3. Puentes de hidrógeno	77
5.5. Cálculo de energías libres de unión mediante MM-PBSA y MM-GBSA.	78
6. CONCLUSIONES.....	81
7. REFERENCIAS.....	84
8. ANEXOS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Algunos fenotipos regulados por el QS en bacterias.....	6
Figura 1.2. Representación de autoinductores en bacterias Gram positivas y Gram negativas.	7
Figura 1.3. Estructuras químicas de los AI-2. A) (2S, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydro-Furano-borato.....	7
Figura 1.4. Esquema del QS en bacterias gram negativas. A) Baja densidad celular. B) Alta densidad celular. (Adaptado de (Geske, O'Neill, Miller, Mattmann, & Blackwell, 2007))......	9
Figura 1.5. Biosíntesis dirigida por LuxI del autoinductor acil homoserina lactona. Tomado de (Li & Nair, 2012).....	12
Figura 1.6. Diagrama esquemático de regiones de las proteínas de la súper familia LuxR. En el módulo regulador se distinguen: 1. Región de autorregulación de LuxR. 2. Región del autoinductor; 3. Región de multimerización. En el módulo activador se reconocen dos re.....	13
Figura 1.7. Complejo TraR-ligando-ADN. Los homodímeros están en color rojo y verde	14
Figura 2.1. Modelos y representación gráfica de los términos generalmente presentes en un campo de fuerza.	24
Figura 2.2. Determinación de energía libre de unión por los métodos MM-PBSA y MM-GBSA (Tomado de Homeyer and Gohlke 2013).	28
Figura 2.3. Modelo farmacofórico. Las características se representan con esferas coloreadas: hidrofóbico (Verde), Donador (lila), aceptor (cian)	39
Figura 2.4. Mapas de contorno CoMFA. Para los modelos a y b mostrando las contribuciones estéricas y electrostáticas favorecidas y desfavorecidas	41
Figura 5.1. Alineamiento entre el ligando presente en el complejo co-cristalizado (en verde) y el ligando acoplado (en rojo), izquierda.....	53
Figura 5.2. Alineamiento de las mejores poses de los 28 análogos acoplados dentro del sitio de unión de LasR.	56
Figura 5.3. Interacciones en el sitio activo del receptor LasR por los ligandos 1(a), B7 (b), B14(c) y C14(d).....	56

Figura 5.4. División de los análogos en dos regiones. La región A, que es la parte conservada, la cual está formada, por la homoserina lactona y el carbonilo, y la región B, las cadenas laterales variables.	58
Figura 5.5. Interacciones existentes entre la región B de los ligandos (C10 en rojo, C11 en azul y C14 en gris) PHLs y los residuos	61
Figura 5.6. Puentes de halógenos presentes en los ligandos	63
Figura 5.7. Las distancias existentes entre el átomo de bromo y el átomo de oxígeno del residuo Tyr-47.....	64
Figura 5.8. Superficie de potencial electrostático, basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals.	65
Figura 5.9. Puentes de halógenos presentes en los ligandos	66
Figura 5.10. Alineamiento estructural. (Izquierda) basado en el ligando. (Derecha) basado en el receptor (Docking)	67
Figura 5. 11. Actividad calculada vs experimental obtenida por análisis PLS usando CoMFA. (a) modelo basado ligando (b) modelo basado receptor	69
Figura 5.12. Conjunto de ligandos usados para la validación externa	70
Figura 5.13. Mapas de contorno 3D CoMFA. Campos estéricos.	71
Figura 5.14. RMSD de complejos proteína-ligando durante la simulación en función de la escala de tiempo.....	74
Figura 5.15. RMSF de los complejos proteína-ligando durante los 150ns de simulación. El eje X representa número del residuo y el eje Y representa el RMSF del átomo C α en Angstrom.....	76
Figura 5.16. Alineamiento del sitio activo de ligando nativo vs dos antagonistas (ligando 1 y ligando B7. En las dos imágenes el ligando nativo esta en amarillo al igual la Tyr47.	76
Figura 5.17. Alineamiento del sitio activo de ligando nativo vs dos agonistas (ligando 11 y ligandoTP1.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Estructuras de homoserina lactonas aciladas producidas por diferentes especies de bacterias	10
Tabla 5.1. Clasificación de los análogos de las AHLs con actividad biológica reportada como IC ₅₀ . En negrita se resaltan los valores de IC ₅₀ de los ligandos más activos por grupo	54
Tabla 5.2. Puentes de hidrógeno formados por los ligandos más activos de cada grupo	57
Tabla 5.3. Datos estadísticos para los modelos COMFA	68
Tabla 5.4. Actividades predichas vs experimentales para modelos CoMFA	68
Tabla 5.5. Actividades experimentales vs las predichas de las moléculas del conjunto de prueba.....	70
Tabla 5.6. Porcentaje de existencia de los puentes de hidrógeno en los ligandos más activos durante los 150 ns de simulación	78

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó un estudio de modelado molecular que combina cálculos de acoplamiento molecular, relación cuantitativa estructura actividad 3D basado en el receptor, simulaciones de dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión, sobre un conjunto de 28 análogos estructurales de las N-acil homoserina lactonas (AHLs) con actividad antagonista de Quorum sensing, con el propósito de comprender el modo de unión y el microambiente molecular al cual están expuestos los 28 análogos en el sitio activo del receptor LasR en *Pseudomonas aeruginosa*. También queremos estudiar la estabilidad de los complejos formados y encontrar las características estructurales claves que explican la actividad antagonista de este grupo de ligandos y dar a conocer esta información para la modificación racional de moléculas para la identificación y diseño de potentes moduladores *LasR*.

El análisis de los cálculos de acoplamiento molecular muestra que los 28 análogos tienen una forma de unión similar, a la del ligando nativo. Los grupos carbonilo que pertenecen al anillo lactona y el grupo amida de la cadena acilo están orientados correctamente hacia los aminoácidos, que forman las interacciones tipo puente de hidrógeno. La diferencia en la actividad antagonista se debe a la ubicación y orientación de las cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico de LasR en su sitio de unión. Las simulaciones Dinámica molecular fueron útiles para comprender los cambios conformacionales y la estabilidad de cada complejo formado. Los componentes de energía se calcularon para investigar la contribución energética de un conjunto de 150 geometrías tomadas de cada simulación de Dinámica molecular. Se encontró una relación directa entre el valor de la energía de Van der Waals y su actividad como agonista o antagonista del receptor LasR.

Palabras claves: *Quorum sensing*, Acoplamiento Molecular, Dinámica Molecular, Energía libre, *LasR*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Comunicación bacteriana

Las bacterias habían sido consideradas por mucho tiempo organismos simples y asociales cuya única actividad era dividirse para generar nuevas bacterias, el descubrimiento de que las bacterias tienen la capacidad de comunicarse entre ellas cambió la percepción de que son sencillos y simples organismos (Rojas-Badía, 2011), por el contrario, se demostró que son organismos sociales, a menudo presentes en comunidades densas de individuos que cooperan y compiten entre sí para explotar los recursos en su entorno y al igual que los organismos superiores, algunas veces deben alterar su comportamiento para tener ventajas en los entornos cambiantes (Bassler & Losick, 2006; Gerdt, McInnis, Schell, & Blackwell, 2015; Schuster, Sexton, Diggle, & Greenberg, 2013). Subyacente a este comportamiento, es la capacidad de comunicarse a través de la liberación y detección de señales químicas en el medio ambiente que les rodea (Blackwell & Fuqua, 2011).

Hace más de 45 años se publicaron los dos primeros artículos relacionados con la capacidad de comunicación que poseen las bacterias, llegando en general a la misma conclusión: las bacterias usan señales químicas para comunicarse y coordinar sus actividades como grupo, este fenómeno recibió el nombre de autoinducción. La primera publicación, indicó que la bacteria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* controlaba los factores de competencia genética utilizando una señal química auto-producida llamada factor de competencia (Tomasz, 1965), la segunda publicación describía el control de la bioluminiscencia por una bacteria Gram negativa (*Vibrio Fisheri*) utilizando una molécula señal (Nealson, Platt, & Hastings, 1970).

En la actualidad este fenómeno es conocido como *Quorum Sensing* (QS), este término fue citado por primera vez en una revisión que publicaron Fuqua *et al.* en la revista *Journal of Bacteriology* en el año 1994 (W. C. Fuqua, Winans, & Greenberg, 1994). Se sabe que estos mecanismos de comunicación (señalización química) son frecuentes entre las bacterias, se han encontrado en más de 200 especies de proteobacterias (Hudaiberdiev *et al.*, 2015), estos

mecanismos son de interés significativo particularmente en las áreas de salud humana, veterinaria y en la agricultura, donde a menudo las bacterias, juegan papeles importantes en procesos como: colonización, manipulación y liberación de factores de virulencia, por tal motivo, este comportamiento es uno de los descubrimientos más notables en microbiología en los últimos 50 años (Bai & Rai, 2011; Hentzer & Givskov, 2003).

1.2. Quorum sensing

Quorum sensing (QS) es un mecanismo dependiente de la densidad celular que le permite a las bacterias regular la expresión de genes específicos en respuesta a cambios locales en su densidad poblacional, y de esta manera pueden coordinar sus actividades con el fin de funcionar como una unidad multicelular (Bassler & Losick, 2006; J. Huang, Shi, Zeng, Gu, & Chen, 2016; S. T. Rutherford & Bassler, 2012).

En este mecanismo la bacteria produce pequeñas moléculas señales llamadas autoinductores (*AIs*), las cuales son liberadas en el medio extracelular donde se acumulan a una concentración proporcional a la densidad celular, (Camilli & Bassler, 2006; Hense & Schuster, 2015; S. T. Rutherford & Bassler, 2012), cuando la población bacteriana alcanza una densidad crítica, o *Quorum*, los *AIs* son capaces de unirse y activar receptores específicos en las bacterias, lo que permite a las bacterias alterar sus niveles de expresión de genes para coordinar un amplio rango de conductas (Hense & Schuster, 2015), incluyendo la producción de factores de virulencia, producción y resistencia a antibióticos, motilidad, formación de biopelículas, bioluminiscencia, esporulación, entre otros comportamientos (Alberto & Rossello, 2013; Palmer, Streng, & Blackwell, 2011; S. T. Rutherford & Bassler, 2012; Smith & Iglewski, 2003). (Figura 1.1)

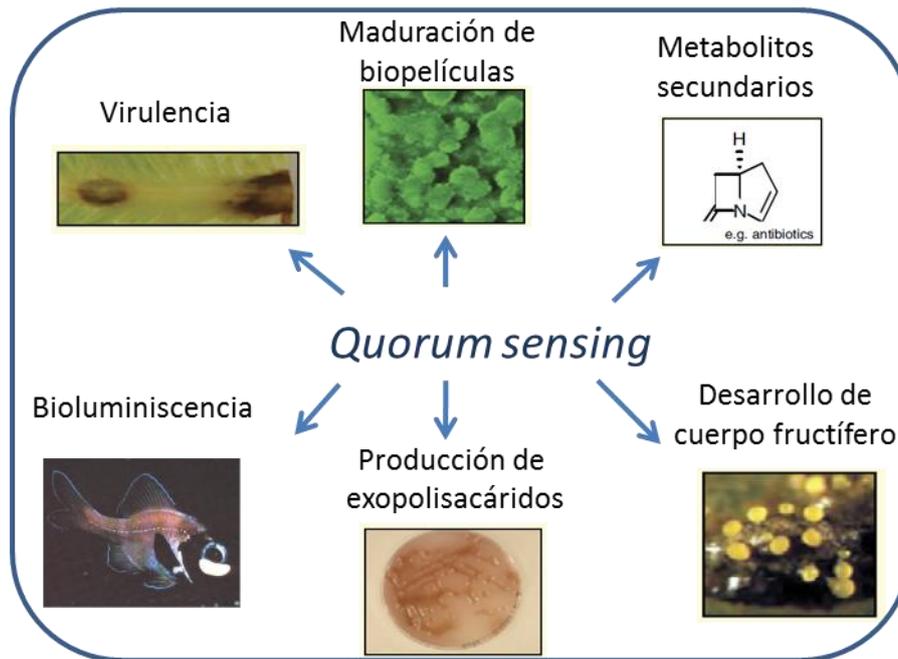


Figura 1.1. Algunos fenotipos regulados por el QS en bacterias

1.3. Autoinductores

Los A/s son usualmente moléculas pequeñas que difunden libremente a través de la membrana de las células o son transportados activamente fuera de estas (Hartmann & Schikora, 2012; Mashburn & Whiteley, 2005). Diferentes especies de bacterias utilizan diversas moléculas señal para comunicarse entre ellas, las bacterias Gram positivas utilizan como molécula señal, péptidos u oligopéptidos modificados, por otro lado las bacterias Gram negativas utilizan generalmente, N-acil homoserina lactonas (AHL), ambas moléculas son conocidas como autoinductores (Atkinson & Williams, 2009; Bassler & Ng, 2009; Lade, Paul, & Kweon, 2014b; LaSarre & Federle, 2013) (Figura 1.2)

Existe un sistema de QS mixto, en el cual la comunicación se establece entre diferentes especies bacterianas, esta comunicación inter-especies tiene implicaciones en muchas áreas de la microbiología, debido a que las bacterias en la naturaleza casi siempre existen en poblaciones mezcladas, conocidas generalmente con el nombre de biopelículas, las cuales tienen mucha relación con las infecciones crónicas.

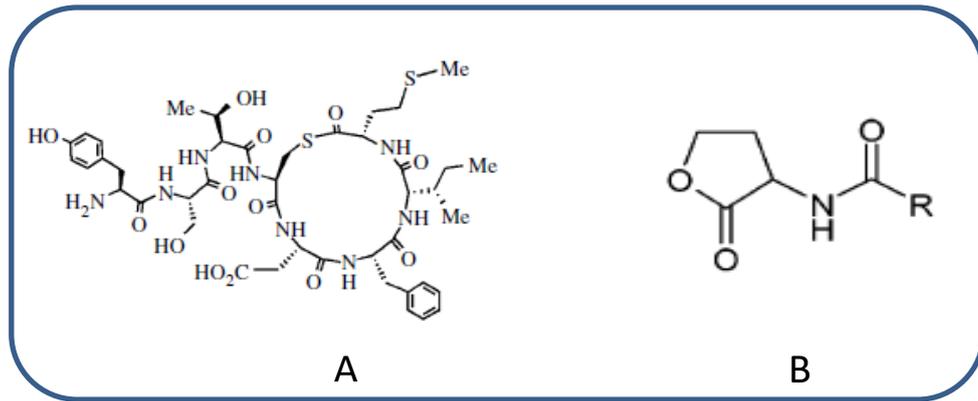


Figura 1.2. Representación de autoinductores en bacterias Gram positivas y Gram negativas. A) las bacterias Gram positivas utilizan péptidos sin modificar o péptidos con modificaciones post-transduccionales. B) las bacterias Gram negativas utilizan generalmente N-acil homoserina lactonas, donde R puede variar dependiendo la clase de bacteria a la cual pertenece el autoinductor. (Adaptado de P. Williams *et al.*, 2007)

Este sistema utiliza como molécula señal, un diéster borato furanosil derivado de la transformación de la S-adenosil-homocisteína a homoserina, este tipo de moléculas pueden ser generadas y detectadas por diferentes especies de bacterias, ver figura 1.3. Generalmente estas moléculas señal son conocidas como autoinductor II (AI-2) (LaSarre & Federle, 2013; Zheng & Sintim, 2014).

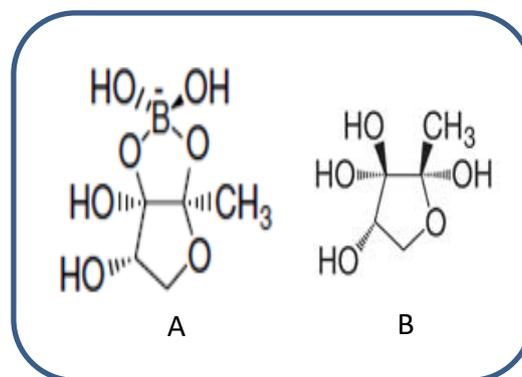


Figura 1.3. Estructuras químicas de los AI-2. A) (2S, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidro-Furano-borato (S-THMF-borato). B) (2R, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano (R-THMF) (Tomado de González y Keshava, 2006)

El fenómeno de QS no solo está limitado al reino procariota. Se ha reportado que el patógeno fúngico *Candida albicans* produce Farsenol para regular la transición de levadura a micelio, que es importante para la virulencia del hongo (Blankenship & Mitchell, 2006; Cho et al., 2010; Krom, Levy, Meijler, & Jabrari, 2016; Rumbaugh, 2011). En las últimas décadas se han descubierto moléculas señal con estructuras químicas que van desde derivados de ácidos grasos, oligopéptidos, furanonas, AHLs, tiolactonas cíclicas (AIP), ester metílico del ácido palmítico (PAME), borato furanosil (AI2), entre otras moléculas.

Para que puedan ser considerados como moléculas señales del QS, los compuestos deben cumplir una serie de criterios (Winzer, Hardie, & Williams, 2002).

1. La producción de la señal de QS debe llevarse a cabo durante etapas específicas de crecimiento, o en respuesta particular a cambios ambientales.
2. La señal de QS debe poder acumularse en el ambiente extracelular y ser reconocida por las bacterias receptoras.
3. La acumulación de la señal de QS por encima de un umbral crítico de concentración debe estimular una respuesta.
4. La respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos necesarios para metabolizar la molécula o detoxificar.

A pesar de las diferencias existentes en los componentes reguladores y los mecanismos moleculares, todos los sistemas de QS conocidos dependen de tres componentes básicos (Rutherford and Bassler 2012). Una enzima (o varias enzimas implicadas) productora de la molécula señal, la molécula señal difusible (el autoinductor), que se libera en el medio ambiente y un receptor de la señal situado en la membrana celular o en el citoplasma (Hense & Schuster, 2015).

1.4. Quorum sensing en bacterias Gram negativas

El primer sistema de QS caracterizado en una especie bacteriana Gram-negativa fue el presente en la bacteria bioluminiscente marina *V. fischeri* (Bassler & Ng, 2009; C. Fuqua & Greenberg, 2002). En bacterias Gram negativas, el circuito del QS funciona generalmente de la siguiente forma: una enzima tipo-LuxI (LuxI es una familia de proteínas que participa directamente en la síntesis de AHLs) que produce y libera la *AHL*, a baja densidad celular, la *AHL* difunde pasivamente al medio extracelular, a favor de un gradiente y son inmediatamente diluidos en los alrededores.

Un incremento en la densidad de la población bacteriana resulta en una acumulación gradual de *AHL* en y alrededor de las células (Moore, Gerdt, Eibergen, & Blackwell, 2014). La *AHL* se une y activa al receptor transcripcional tipo-LuxR, la unión del *AHL* al receptor a altas densidades

celulares promueve la homodimerización y posteriormente la interacción con secuencias de ADN blanco (Figura 1.4), con el fin de mejorar o bloquear la transcripción de los genes regulados por el QS, resultando en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana (González & Marketon, 2003; Henke & Bassler, 2004; Moore et al., 2014; O'Reilly & Blackwell, 2016).

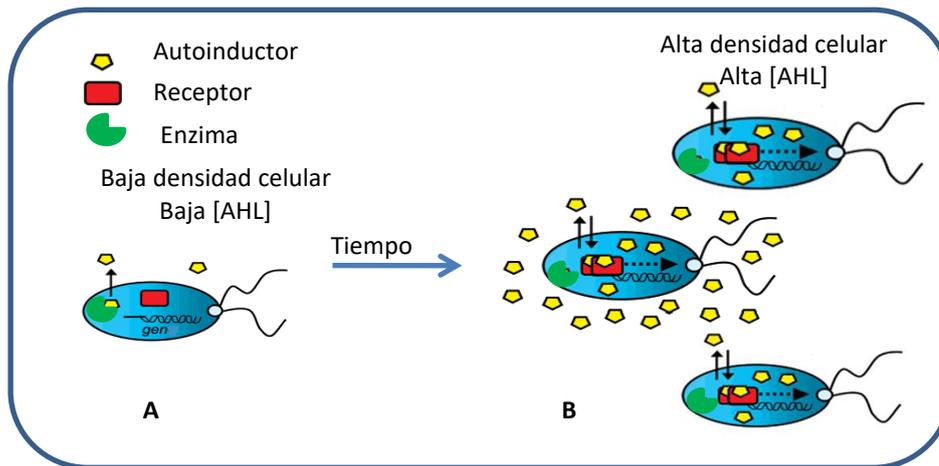


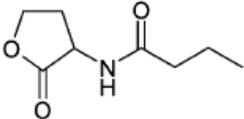
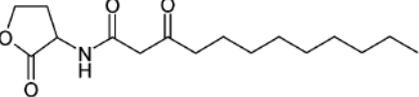
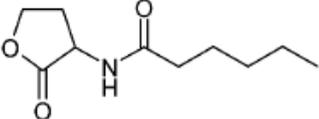
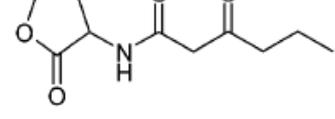
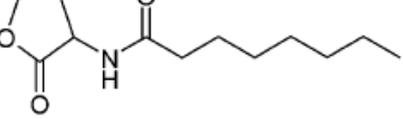
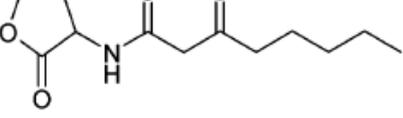
Figura 1.4. Esquema del QS en bacterias gram negativas. A) Baja densidad celular. B) Alta densidad celular. (Adaptado de (Geske, O'Neill, Miller, Mattmann, & Blackwell, 2007)).

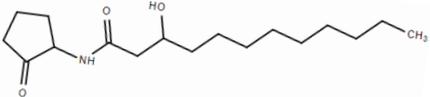
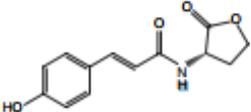
1.4.1. Acil homoserina lactonas (AHL)

Las acil homoserina lactonas (AHLs) son el mayor grupo de autoinductores presentes en las bacterias Gram negativas, estas moléculas han conservado el anillo homoserina lactona (HSL) con una cadena lateral acilo variable, las AHLs típicamente tienen una longitud de la cadena acilo de 4 a 18 carbonos, usualmente por incrementos de dos unidades de carbono (C4, C6, C8 etc.)(C. Fuqua & Greenberg, 2002). La longitud, el nivel de saturación de la cadena acilo acoplada y la presencia o ausencia de sustituciones hidroxilo u oxo en la posición C-3 de la cadena acilo proporcionan diversificación y especificidad para el circuito del QS presente en una población bacteriana mixta (Bhargava, Sharma, & Capalash, 2010; Churchill & Chen, 2011; LaSarre & Federle, 2013; Thiel, Kunze, Verma, Wagner-Döbler, & Schulz, 2009; Watson, Minogue, Val, von Bodman, & Churchill, 2002; Welsh & Blackwell, 2016b). Ha sido reportado que algunas especies de bacterias gram negativas utilizan HSL con cadenas laterales ramificadas o aromáticas más complejas (Lindemann et al., 2011; Schaefer et al., 2008).

En algunos casos una sola especie bacteriana puede tener más de un sistema de QS y por lo tanto utiliza más de una molécula señal (tabla 1.1), la bacteria responde a cada molécula de una manera diferente (Thiel et al., 2009; Williams, Winzer, Chan, & Cámara, 2007). Además, es posible que bacterias diferentes puedan tener el mismo *AI*, pero este puede estar involucrado en la regulación de diferentes fenotipos en cada una. Por ejemplo, 3-oxo-C6-HSL regula el fenómeno de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, pero activa la producción de exopolisacáridos en *Erwinia stewartii* (Watson et al., 2002). En este sentido las moléculas de señalización se pueden pensar como palabras dentro de una lengua, cada una tiene un significado diferente.

Tabla 1.1. Estructuras de homoserina lactonas aciladas producidas por diferentes especies de bacterias

Estructura de la molécula señal	Microorganismo
	<i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Chromobacterium Violaceum</i> <i>Burkholderia cenocepacia</i>
	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Pectobacterium carotovora</i>
	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

	<p><i>Acinetobacter baumannii</i></p>
	<p><i>Rhodospseudomonas palustris</i></p>

1.4.2. Funciones de la familia de proteínas *LuxI* y *LuxR*

Las investigaciones realizadas sobre varios homólogos de las proteínas LuxI/LuxR indican que las funciones fundamentales y los mecanismos bioquímicos de acción son idénticas a las de LuxI y LuxR de *V. fischeri* (Bassler & Ng, 2009). Dichas investigaciones han contribuido a la comprensión de los procesos de: biosíntesis de AHLs, detección del AHL y activación transcripcional del circuito del QS. Debido a que en *V. fischeri* se caracterizó por primera vez el fenómeno del QS y se identificaron las proteínas LuxI/LuxR que regulaban el proceso, a las proteínas homologas de las diferentes bacterias Gram negativas que regulan el proceso del QS se les llama proteínas tipo LuxI/LuxR (Schuster *et al.* 2013).

1.4.2.1. Proteínas tipo *LuxI*

Hasta el momento se han identificado tres familias de AHL sintasa, entre las que se incluyen las familias, LuxI (Waters & Bassler, 2005), HdtS (Burton, Read, Pellitteri, & Hickey, 2005; Laue *et al.*, 2000), y LuxM (Milton *et al.*, 2001). La familia LuxI ha sido la más estudiada, los tipos HdtS y LuxM de AHL sintasas se han encontrado sólo en algunas especies bacterianas y se conoce poco sobre el mecanismo enzimático de estas sintasas (Christensen, Brecht, Dudekula, Greenberg, & Nagarajan, 2014; Li & Nair, 2012; Lintz, Oinuma, Wysoczynski, Greenberg, & Churchill, 2011).

En el mecanismo para la síntesis de AHL, S-adenosilmetionina (*SAM*) y las proteínas transportadoras de grupos acilo (*acil-ACP*) son los substratos para las enzimas tipo *LuxI*. Las proteínas tipo *LuxI* unen específicamente un *acil-ACP* a *SAM* por medio de la formación de un enlace amida entre la cadena

lateral acilo de la *acil-ACP* y el grupo amino de la homocisteína de *SAM* (Gould, Schweizer, & Churchill, 2004). La subsecuente lactonización de los intermediarios ligados en la interacción, junto con la liberación de 5-metiltioadenosina, resulta en la formación del autoinductor *AHLs* (Hanzelka & Greenberg, 1996; Parsek, Val, Hanzelka, Cronan, & Greenberg, 1999). En la figura 1.5 se observa un esquema para la biosíntesis de *AHL* dirigida por *LuxI*.

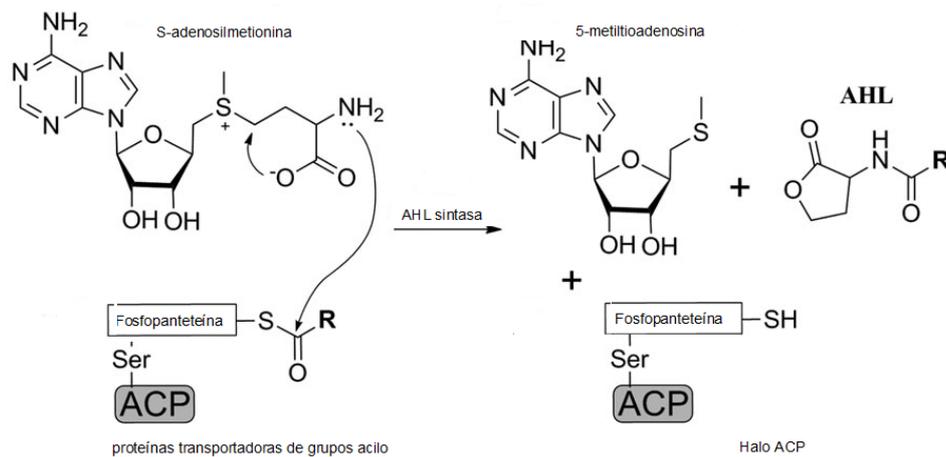


Figura 1.5. Biosíntesis dirigida por *LuxI* del autoinductor acil homoserina lactona. Tomado de (Li & Nair, 2012)

Este mecanismo bioquímico para la conversión de *SAM* y *acil-ACPs* en autoinductores *AHL* ha sido demostrado para varias proteínas tipo *LuxI* de diferentes bacterias (Lerat & Moran, 2004). Estas enzimas incluyen *LuxI* de *V. fischeri*, *Tral* de *Agrobacterium tumefaciens* (Hanzelka & Greenberg, 1996) *RhlI* y *LasI* de *Pseudomonas aeruginosa* (Gould et al., 2004; Parsek et al., 1999). En conjunto, estos resultados sugieren que la ruta biosintética *SAM/acil-ACP* está probablemente conservada en todos los homólogos de *LuxI*. Curiosamente, una subfamilia de homólogos *LuxI*, se clasificó recientemente en función de su preferencia por el sustrato acil-CoA sobre acil-ACP (Ahlgren, Harwood, Schaefer, Giraud, & Greenberg, 2011; Lindemann et al., 2011; Schaefer et al., 2008).

Estudios bioinformáticos muestran que estas proteínas presentan un bajo porcentaje de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos (Chakrabarti & Sowdhamini, 2003; Watson et al., 2002). En estos estudios se identificaron siete residuos que se conservan en la familia de proteína *LuxI*, y propone que participan en la catálisis y la unión a *SAM*. Los siete residuos están en la región

N-terminal entre los residuos 24 y 104 (usando la numeración de RhII), incluyen seis residuos cargados (Arg24, Glu46, Asp48, Asp51, Arg71 y Arg104) y un residuo neutro (Gly68).

1.4.2.2. Función de las proteínas tipo *LuxR*.

Las proteínas tipo *LuxR* (receptores transcripcionales) son responsables de la unión a su autoinductor *AHL*, el complejo receptor/autoinductor, se homodimeriza para posteriormente unirse específicamente a los promotores de los genes y activar la transcripción. Los trabajos realizados con las proteínas *LuxR* de *V. fischeri*, *LasR* de *P. aeruginosa*, *TraR* de *A. tumefaciens*, *CviR* de *Chromobacterium violaceum* y *SdiA* de *E.coli*, muestran que estas presentan dos dominios (Bottomley, Muraglia, Bazzo, & Carfi, 2007; Chen et al., 2011; Vannini et al., 2002; Yao et al., 2006; Zou & Nair, 2009a), el dominio amino terminal involucrado en la unión de los autoinductores *AHL*, y el dominio carboxi terminal, requerido para la unión al ADN y activación transcripcional, ver figura 1.6. Los residuos en el dominio carboxi terminal son también requeridos para la multimerización de las proteínas tipo *LuxR*, y los multimeros son la especie que se une a las secuencias promotoras de DNA (Stevens, Dolan, & Greenberg, 1994).

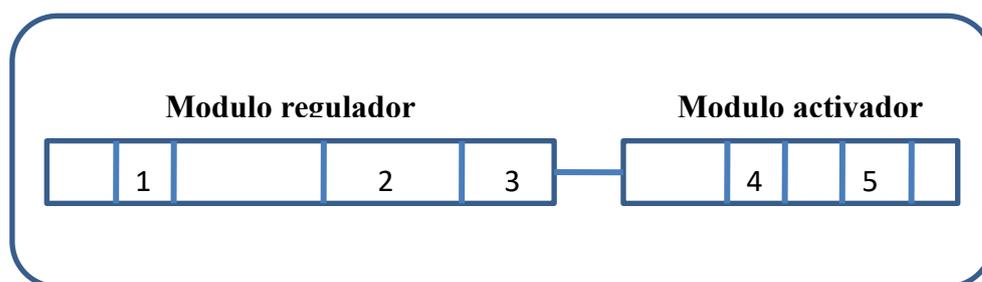


Figura 1.6. Diagrama esquemático de regiones de las proteínas de la súper familia *LuxR*. En el módulo regulador se distinguen: 1. Región de autorregulación de *LuxR*. 2. Región del autoinductor; 3. Región de multimerización. En el módulo activador se reconocen dos regiones. 4. Dominio HTH de unión al ADN; región c-terminal requerida para activación transcripcional.

Se ha demostrado que las proteínas tipo *LuxR* se homodimerizan en presencia de su *AHL* específico (Kiratisin, Tucker, & Passador, 2002; Lou, Smyth, Gao, Qin, & Farrand, 2003) y el grado de dimerización depende de la concentración del *AHL* (Lamb et al., 2003), en donde, la homoserina lactona y la cadena acilo de la molécula *AHL* se acomodan mediante interacciones hidrófilas e

hidrofóbicas. Los residuos polares que interaccionan con la homoserina lactona incluyen Trp57, Trp59 y Trp60 (numeración TraR), que están completamente conservados entre las proteínas tipo LuxR (Ahumedo, Díaz, & Vivas-Reyes, 2010; Soulère, Frezza, Queneau, & Doutheau, 2007).

Los residuos que proporcionan las interacciones de Van der Waals al ligando AHL están menos conservados, siendo esto una posible explicación de la diversidad en las cadenas acilo en diferentes moléculas de AHL, tal como se ha demostrado por estudios de mutagénesis sobre QscR y LasR (Gerdt et al., 2015; Lintz et al., 2011), en la figura 1.7 se muestra el complejo TraR-ligando nativo, unido al ADN.

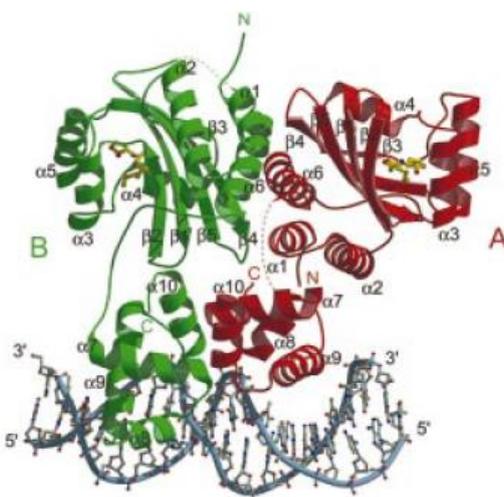


Figura 1.7. Complejo TraR-ligando-ADN. Los homodímeros están en color rojo y verde, los ligandos nativos en amarillo (Vannini et al., 2002).

Se pensaba que este tipo de proteínas solo podía plegarse completamente en presencia de su ligando nativo, un estudio reportó que *LasR* puede plegarse completamente en presencia de compuestos estructuralmente diferentes a las AHLs (Zou & Nair, 2009b), este resultado puede ser analizado más a fondo para tratar de entender la función de los autoinductores en el circuito del QS.

1.5. Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa omnipresente que se desarrolla en diversos hábitats (Lee & Zhang, 2015). Es un patógeno versátil, altamente adaptable a la vida en ambientes variados como: el suelo, tejidos, el agua, e incluso es capaz de contaminar las herramientas médicas y dispositivos médicos implantados (Brown, Palmer, & Whiteley, 2008; Ding et al., 2011).

Es responsable de muchas enfermedades infecciosas en diversos organismos incluyendo insectos, animales, plantas y una variedad de tejidos humanos (Dekimpe & Déziel, 2009). La bacteria es capaz de alimentarse de diferentes fuentes de carbono (principalmente aminoácidos en las vías respiratorias de los pacientes que sufren de fibrosis quística y ácidos grasos en las quemaduras) (Turner, Everett, Trivedi, Rumbaugh, & Whiteley, 2014; Turner, Wessel, Palmer, Murray, & Whiteley, 2015), puede detectar y responder a los cambios locales en la concentración de nutrientes, lo que le permite adaptar su modo de crecimiento y el perfil de virulencia para establecer infecciones agudas o crónicas (Crousilles et al., 2015; Markou & Apidianakis, 2014)

P. aeruginosa es un patógeno nosocomial que afecta a una amplia categoría de pacientes convalecientes en hospitales, causando graves infecciones crónicas, y en general, mortales. Incluyen pacientes con fibrosis quística y otras enfermedades pulmonares, córnea traumatizada, quemaduras, pacientes entubados a largo plazo, pacientes inmunocomprometidos y ancianos (Folkesson et al., 2012; Lee & Zhang, 2015). Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* suelen ser resistentes al tratamiento con múltiples antibióticos (Bonomo & Szabo, 2006; Doshi, Chua, Kagda, & Tambyah, 2011), debido al arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y a su capacidad para formar biopelículas (Lewis, 2007; Moore et al., 2014).

Las biopelículas son ecosistemas microbianos organizados, conformados por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte. Estos microorganismos excretan sustancias para formar una matriz extracelular formada generalmente por exopolisacáridos, que forman canales por donde circula el agua, enzimas, nutrientes, y residuos. En las biopelículas las bacterias viven, cooperan y se comunican a través de señales de QS, que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, como un tejido en un organismo multicelular. Uno de los principales problemas de las biopelículas reside en que impiden la actuación del antibiótico en el foco de infección y que son una fuente de diseminación de las bacterias presentes en él (Donlan & Costerton, 2002).

El mecanismo de QS controla un gran arsenal de factores de virulencia excretados en *P. aeruginosa* (la síntesis de exotoxina A, fosfatasa alcalina, elastasa, piocianina y también la síntesis del surfactante rhamnolípido, que es capaz de lisar eritrocitos, monocitos y neutrófilos) y está también involucrado en la formación de biopelículas, las cuales forman la base para las infecciones crónicas por esta bacteria (Sadikot, Blackwell, Christman, & Prince, 2005). Por tal motivo, no es sorpresa que el circuito (o los circuitos) de QS mejor estudiado es el del patógeno oportunista *P. aeruginosa* (Schuster et al., 2013). *P. aeruginosa*, ha servido como organismo modelo tanto para investigadores interesados en los mecanismos fundamentales de “cómo QS regula la virulencia” y aquellos que buscan bloquear los circuitos del QS con agentes químicos.

El circuito de QS es sustancialmente más complejo en *P. aeruginosa* que en *V. fischeri*, *P. aeruginosa* posee, al menos dos sistemas LuxI/LuxR QS canónicos: La enzima LasI sintetiza el autoinductor N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona (OdDHL), el cual se une al receptor transcripcional LasR. Rhl sintetiza N-butil-L-homoserina lactona y este se une al receptor RhlR. También existe un receptor tipo-LuxR huérfano, QscR, que no tiene AHL sintasa asociada pero se puede unir a OdDHL y por lo tanto "inhibir" la actividad de LasR y RhlR. Dentro de esta mezcla, *P. aeruginosa* también tiene un tercer sistema de QS, Pqs, que utiliza quinolonas como autoinductores. La señal de quinolona principal, la señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS), es sintetizada por pqsABCDE y pqsHand es limitada por la citosólica LysR de tipo receptor PqsR (también conocido como MVRF) (Maddocks & Oyston, 2008).

Una vez activados por su autoinductor cognado, LasR, RhlR y PqsR regulan la transcripción de un conjunto de genes distintos, pero a menudo solapados, muchos de los cuales codifican factores de virulencia y fenotipos asociados. Desde un punto de vista fisiológico, tener múltiples sistemas QS entrelazados puede proporcionar varios beneficios al organismo (Welsh & Blackwell, 2016b)

1.6. Modulación del Quorum sensing en bacterias Gram negativas

Como se mencionado anteriormente, todos los sistemas de QS conocidos dependen de tres componentes básicos (Rutherford and Bassler 2012). Por lo tanto, existen tres objetivos de intervención externa en un sistema de QS mediado por AHL: la sintasa tipo LuxI (generador de señal), el ligando AHL (la propia señal) y el receptor transcripcional tipo LuxR (El receptor de la señal).

1.6.1. Inhibición de la enzima tipo LuxI

Interferir con la producción de autoinductores es un método simple para modular las vías del QS; si no se produce molécula de señal, no puede ocurrir señalización. Sin embargo, existen pocos reportes que detallan el uso de moléculas contra las sintasas tipo LuxI (Geske, Neill, & Blackwell, 2008). La mayoría de los estudios sobre la modulación química de la síntesis de *AHL* hasta la fecha se basan en el uso varios análogos del S-adenosil-metionina (*SAM*), tales como S-adenosilhomocisteína, S-adenosilcisteína, y sinefugín, los cuales, han demostrado ser potentes inhibidores de la síntesis de *AHL* catalizada por proteína RhII en *P. aeruginosa* (Rasmussen & Givskov, 2006).

1.6.2. Diseminación de la señal *AHL*.

La comunicación célula a célula en bacterias puede ser afectada por una disminución en la concentración de la molécula señal activa en el medio. Existen tres mecanismos diferentes para lograr la disminución de los *AHL* en el medio, la degradación química, metabólica y enzimática (Kalia & Purohit, 2011).

La degradación química se refiere principalmente al proceso en el que, el pH alcalino da como resultado la apertura del anillo de lactona (Yates et al., 2002), y conduce a la pérdida de la actividad de la señal *AHL*. Sin embargo, el anillo lactona se vuelve a formar y la actividad de la señal de *AHL* puede invertirse a pH ácido (Kalia & Purohit, 2011; Yates et al., 2002). Algunas bacterias como *Pseudomonas cepa* PAI-A y *Variovorax paradoxus* tienen la capacidad de metabolizar las señales *AHL* para el crecimiento (J. J. Huang, Han, Zhang, & Leadbetter, 2003; Leadbetter & Greenberg, 2000).

Variovorax paradoxus es capaz de crecer usando 3-oxo-C6-N-homoserina lactona como única fuente energía y nitrógeno. La importancia ecológica de las bacterias degradantes de *AHL* no está clara, pero las enzimas degradantes de *AHL* son de gran interés clínico para el uso en prevención de enfermedades causadas por poblaciones de bacterias eficaces con el QS.

Las señales de AHL pueden ser completamente degradadas o inactivadas por enzimas de quórum quenching incluyendo AHL-lactonasas, AHL-acilasas y oxidorreductasas (Dong, Xu, Li, & Zhang, 2000; Lade, Paul, & Kweon, 2014a). Se encontró una especie de *bacillus* que producen una enzima, llamada *AiiA*, que cataliza la hidrólisis de moléculas de *AHL*. La expresión del gen *aaiA* en el patógeno de plantas *Erwinia corotovor*a resulta en la reducción en cuanto a liberación de las señales *AHL*, la disminución de la actividad de enzimas pectolíticas extracelulares, y reduce la enfermedad de descomposición en todas las plantas examinadas (Dong et al., 2000)

1.6.3. Inhibición en la recepción de la señal

Bloquear la recepción de la señal de QS se puede lograr por la acción de una molécula antagonista capaz de competir o interferir con las señales nativas de *AHL*, por la unión al sitio activo de los receptores tipo *LuxR*. Los inhibidores competitivos pueden concebiblemente ser estructuralmente similares a las señales de *AHL* nativas, para unirse y ocupar los sitios de unión de los *AHL* pero falla la actividad del receptor tipo *LuxR*.

Se han reportado moléculas estructuralmente diferentes a las AHL, que pueden unirse y activar al receptor tipo *LuxR*, comportándose como agonistas (Zou & Nair, 2009b). La mayoría de los compuestos identificados hasta la fecha son análogos de AHL naturales en los que la cadena acilo, la homoserina lactona o ambos están estructuralmente modificados. Sin embargo, también se han descubierto inhibidores del QS no lactona, siendo ejemplos tempranos notables las furanonas halogenadas y sus derivados (Hentzer et al., 2002).

Existen muchos reportes, relacionados con estudios de relaciones estructura-actividad (SAR) (Galloway, Hodgkinson, Bowden, Welch, & Spring, 2011; Galloway et al., 2012; Geske, Neill, et al., 2008; O'Connell et al., 2013; Rampioni, Leoni, & Williams, 2014), en los cuales el lector, puede conocer información relacionada con estrategias de síntesis e información relacionada con el diseño racional de ligandos con actividad agonista o antagonista. Estos estudios han generado un conocimiento sustancial acerca de la relaciones estructura-función de las señales de *AHL*, las cuales tienen mucho valor para la continua búsqueda de potentes inhibidores del QS. Sumado a esto los estudios computacionales que simulan la unión de los agonistas y antagonistas en el sitio activo de los diferentes receptores transcripcionales han abierto otra alternativa para el diseño de compuestos moduladores del QS (Ahumado et al., 2010; Ahumado, Drosos, & Vivas-Reyes, 2014a; Soulère et al., 2007; Soulère, Sabbah, Fontaine, Queneau, & Doutheau, 2010).

1.7. *Quórum sensing* como blanco para terapia anti-microbiana

En las últimas décadas, la tasa de descubrimiento de nuevas terapias antimicrobianas ha disminuido constantemente, mientras que la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos ha aumentado (Boucher et al., 2013). Por lo tanto, investigaciones recientes se han centrado en enfoques que disminuyen la patogenicidad bacteriana sin afectar el crecimiento bacteriano (Cegelski, Marshall, Eldridge, & Hultgren, 2008).

La formación de biopelículas, los factores de virulencia bacteriana, la producción de antibióticos, transferencia y pigmentación de plásmidos conyugales, producción de exopolisacáridos (EPS), funciones reguladas por el QS, ha promocionado a este mecanismo como un blanco ideal para las llamadas terapias de "antivirulencia" (Rasmussen and Givskov 2006; LaSarre and Federle 2013; Galloway et al. 2012). Por ende, la inhibición del QS con pequeñas moléculas ofrece una estrategia única para el tratamiento y la prevención de una serie de infecciones bacterianas agudas y crónicas, hecho que es de particular importancia dada la propagación rápida y continua de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Kollef, Golan, Micek, Shorr, & Restrepo, 2011).

Este enfoque anti-infeccioso es conceptualmente distinto de los enfoques tradicionales para el tratamiento de infecciones bacterianas que usualmente utilizan moléculas bactericidas o bacteriostáticas dirigidas a procesos celulares críticos (Capitato et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de QS mejor estudiados son los presentes en *P. aeruginosa*, muchos estudios se han centrado en el diseño y síntesis de ligandos con características estructurales que le permitan alterar la formación del complejo *LasR-AHL*, generando una cantidad considerable de ligandos con capacidad de modular la actividad transcripcional de LasR, a través de interacciones no covalentes con LasR (Galloway et al. 2011; Mattmann and Blackwell 2010; Welsh and Blackwell 2016a) o de interacciones covalentes (Amara et al., 2009; O'Brien, Noto, Nichols-O'Neill, & Perez, 2015).

El dominio de unión al ligando LBD (por sus siglas en inglés Ligand Binding Domain) de LasR cristalizado, ha proporcionado detalles importantes de las interacciones existentes entre LasR y 3O-C12-HSL (Bottomley et al. 2007; Zou and Nair 2009a), al igual que con varios agonistas (Zou & Nair, 2009b). Además, estudios de mutagénesis sobre LasR han sido de utilidad para identificar los residuos de particular importancia en el bolsillo de unión de este receptor, siendo este resultado útil para ayudar a guiar el diseño de agonistas y antagonistas (Gerdt et al., 2015; Gerdt, McInnis, Schell, Rossi, & Blackwell, 2014a).

Aunque se han realizado muchas investigaciones relacionadas a la modulación del complejo *LasR-AHL* en *P. aeruginosa* a través del uso de ligandos estructuralmente diferentes, existe poca información sobre que interacciones *LasR-Ligando* son críticas para la activación o la inhibición de LasR, por parte de los ligandos diseñados y como estas interacciones pueden afectar el funcionamiento del receptor LasR, debido a los cambios conformacionales que este receptor sufre después del reconocimiento molecular y posterior formación del complejo. Recientemente un estudio reveló que múltiples antagonistas funcionan uniéndose y estabilizando al receptor LasR, formando un complejo proteína-ligando con una conformación inadecuada para unirse al ADN (Suneby, Herndon, & Schneider, 2017), y por ende sea imposible comenzar la

transcripción. Lo cual genera una pregunta ¿Cuáles son las características estructurales necesarias para que un ligando sea considerado antagonista o agonista de LasR?

Para dar respuesta a la problemática y a la pregunta planteadas en los párrafos anteriores en este estudio se presentó una alternativa fundamentada en el modelado molecular para generar información estructural relacionada con el microambiente químico al cual están expuestos los ligandos en el sitio activo de LasR, así como una visión en profundidad sobre los mecanismos de interacción que permitan comprender el comportamiento de los ligandos en el sitio activo de LasR y los cambios conformacionales que sufre el receptor *LasR* cuando se une a diferentes ligandos. Por lo anterior es necesario conocer los fundamentos teóricos del modelado molecular y sus limitaciones.

2. MODELADO MOLECULAR

El modelado molecular (también llamado química computacional) está compuesto de dos grandes ramas. Por una parte, tenemos los métodos de mecánica molecular (MM) basados en la mecánica clásica y los métodos de estructura electrónica, que se basan en la aplicación de la mecánica cuántica a los sistemas atómicos y moleculares (Gutiérrez-de-Terán, 2004), ambos métodos se caracterizan por usar técnicas gráficas para representar la estructura y el comportamiento de las moléculas. Estos dos métodos, independientemente de su fundamento teórico, pretenden abordar un conjunto básico de propiedades cuyos exponentes más destacados son la energía de una determinada disposición espacial de núcleos, la geometría óptima de un sistema molecular y otras propiedades moleculares como pueden ser, por ejemplo las frecuencias vibracionales, el momento dipolar, polarizabilidad, hiperpolarizabilidades, etc (Gutiérrez-de-Terán, 2004).

El modelado molecular se utiliza en los campos de diseño de fármacos, biología computacional, química medicinal y ciencia de materiales, entre otros campos, para estudiar sistemas moleculares que van desde pequeños sistemas químicos hasta grandes moléculas biológicas y ensamblajes de materiales. Algunos métodos pueden ser usados para modelar no solo moléculas estables, sino también, intermedios inestables y estados de transición. En esta forma, puede proporcionar información acerca de moléculas y reacciones con suficiente precisión como para ser usadas en condiciones simuladas muy similares a las de laboratorio o al menos dar tendencias sobre lo que está ocurriendo a nivel experimental (Frisch & Foresman, 1994).

2.1. Mecánica molecular

La Mecánica molecular (MM) considera los átomos como esferas unidas por resortes (representando los enlaces entre átomos) según los criterios de la física clásica, donde solo se consideran los núcleos de los átomos, sin tener en cuenta explícitamente los electrones (Cuevas & Cortés, 2003).

A través de la MM podemos analizar:

- Sistemas moleculares muy grandes
- La estructura de una proteína y obtener información de su geometría.
- Análisis conformacionales.
- La energía de unión entre proteína y una serie de compuestos, así como la minimización de energía tanto de dichos compuestos como de la proteína problema.

Los distintos métodos dentro de la MM comparten el hecho general que se basan en las mismas leyes de la física clásica. Se diferencian generalmente en el tipo de ecuaciones que definen como varía la energía potencial (E_{pot}) de una molécula con la geometría de sus átomos componentes, también se diferencian por el tipo de átomos, entendiéndose por ello las características que definen a un átomo de número atómico dado en el entorno molecular en que se encuentre y/o finalmente en el conjunto de parámetros que ajustan las ecuaciones aplicadas a los átomos definidos por su tipo, a los valores experimentales (o calculados por otros métodos) que se emplean para la parametrización. Estos tres componentes definen lo que se conoce con el nombre de campo de fuerza y definen completamente un método de MM (C. J. Cramer, 2004; Leach, 2001).

Las ecuaciones matemáticas que definen los campos de fuerza generalmente incluyen los siguientes términos, ver figura 2.1:

- Interacciones enlazantes: intervienen átomos unidos por enlaces químicos. Son considerados interacciones enlazantes, los términos de enlace, ángulos, ángulos diedros o torsiones y ángulos fuera del plano.
- Interacciones no enlazantes: intervienen átomos no unidos de manera directa por enlaces. Constan de términos electrostáticos e interacciones de Van der Waals.

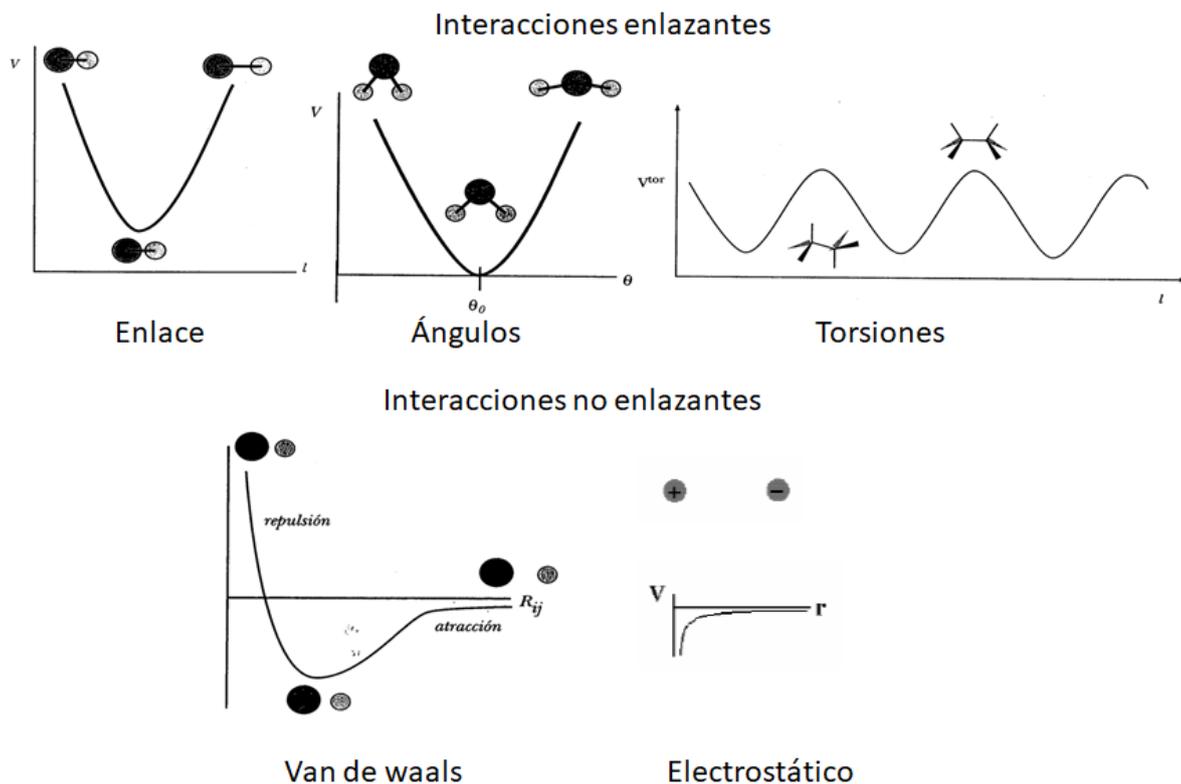


Figura 2.1. Modelos y representación gráfica de los términos generalmente presentes en un campo de fuerza. La energía se calcula como el sumatorio de diferentes términos. (Tomado de (Cuevas & Cortés, 2003))

En la ecuación 2.1, se muestra la expresión matemática de la energía potencial (E_{pot}), el primer término es la energía de enlace, donde k_r es la constante de fuerza alargamiento/acortamiento de enlace, r y r_0 son la longitud de enlace y la longitud de enlace de referencia, respectivamente. El segundo término es la energía debido a la deformación angular, donde k_θ constante de flexibilidad angular, θ y θ_0 son el ángulo de enlace y el ángulo de enlace de referencia, respectivamente, el tercer término es la energía de torsión, donde V_n es la constante de fuerza torsionales, ϕ y ϕ_0 son los ángulos de torsión y torsión de referencia, respectivamente, y los términos cuatro y quinto son respectivamente las energía debido a las interacciones electrostática y Van der Waals respectivamente, donde E_r es la constante dieléctrica del medio, R_{ij} la distancia entre los átomos, Q es la carga, A_{ij} y B_{ij} son constantes.

$$E_{pot} = \sum_{\text{enlaces}} k_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] +$$

$$\sum_{\text{no enlazantes}} \frac{q_i q_j}{E_r R_{ij}} + \sum_{\text{no enlazantes}} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \quad (2.1)$$

Existe una gran variedad de campos de fuerza desarrollados en función de los grupos de moléculas empleados como referencia en la parametrización. Desde los aplicados a moléculas orgánicas pequeñas y medianas, como son por ejemplo (TRIPOS (Clark, Cramer, & Van Opdenbosch, 1989), MMFF94 (Halgren, 1996), a los dirigidos a macromoléculas (AMBER (Cornell, y otros, 1995), CHARMM (Brooks, Bruccoleri, Olafson, States, Swaminathan, & Karplus, 1983). No se pretende hacer un trabajo monográfico detallado sobre Mecánica molecular, en caso de que el lector desee profundizar, se citan las referencias más relevantes en los temas antes mencionados (C. J. Cramer, 2004; Jensen, 2007; Young, 2001).

2.2. Dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es una disciplina particular del modelado molecular donde se simulan movimientos de estructuras moleculares empleando modelos atomísticos, lo que permite analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton (Cai, Li, & Yip, 2012; Homeyer & Gohlke, 2013). La comprensión de cómo los ligandos se unen a las biomoléculas es de fundamental importancia no sólo para los campos básicos de la biofísica y la bioquímica, sino también para las disciplinas aplicadas como la química, biología y la química medicinal (Chipot, 2014; Montalvo-Acosta & Cecchini, 2016).

Las simulaciones de DM pueden revelar cambios en las características estructurales de los sistemas receptor-ligando que no son observables en estructuras estáticas. Los métodos de DM se utilizan ampliamente para obtener información sobre la evolución temporal de las conformaciones de proteínas y otras macromoléculas biológicas, información cinética y termodinámica (Adcock & McCammon, 2006). Si bien, las ecuaciones del movimiento no describen el sistema a nivel cuántico (lo cual requeriría una capacidad de cálculo extremadamente grande), este tipo de estudios han mostrado buena

correlación con resultados experimentales, y se pueden realizar con equipos de cómputo ciertamente convencionales, pero que cumplan ciertas especificaciones técnicas (Cai et al., 2012).

En dinámica molecular, sucesivas configuraciones del sistema son generadas por integración de las ecuaciones de Newton del movimiento. El resultado es una trayectoria que especifica como las posiciones y velocidades de las partículas del sistema varían con el tiempo (Leach, 2001).

$$\frac{\delta^2 X_i}{\delta t^2} = \frac{F x_i}{m_i} \quad (2.2)$$

Donde m_i es la masa de la partícula, x_i es la coordenada y $F x_i$ es la fuerza aplicada sobre la partícula en esta dirección. En las funciones de energía potencial la fuerza entre dos átomos o moléculas cambia continuamente con su separación.

$$r_i(t_2) = r_i(t_1) + \int_{t_1}^{t_2} \frac{P(t)}{m} dt \quad (2.3)$$

$$P(t_2) = P(t_1) + m \int_{t_1}^{t_2} a(t) dt^0 \quad (2.4)$$

Dada esta naturaleza continua, la resolución del problema no puede hacerse analíticamente y la integración de las ecuaciones 2.3 y 2.4 se realiza mediante un método de diferencias finitas. Donde P y a son el momento atómico y la aceleración, respectivamente.

En general, en un procedimiento de DM se empieza con una conformación de partida químicamente plausible (Las estructuras resueltas por cristalografía de rayos X o experimentos de resonancia magnética nuclear o generadas por modelación por homología), se calculan las cargas parciales (Homeyer & Gohlke, 2013), se calculan las fuerzas que actúan mediante la integración de las ecuaciones de Newton, se deja que el sistema evolucione a lo largo del tiempo, con lo que cambian las posiciones de los átomos, se calcula la energía de la nueva conformación y se vuelven a calcular las fuerzas, volviendo a integrar las ecuaciones de Newton, repitiendo así el ciclo a lo largo del tiempo.

Contra más tiempo pase más cambios se podrán calcular, lo cual implica mayor número de conformaciones exploradas y mejor descripción del sistema.

Los estudios de dinámica molecular dan cuenta de varias propiedades de un sistema, como son:

- Estabilidad del sistema
- Exploración conformacional
- Calculo de propiedades moleculares promedio

2.2.1. Cálculo de Energías Libres de Unión Proteína-Ligando

Los cálculos de energía libre han demostrado ser útiles para una serie de temas en bioquímica computacional, tales como el diseño de fármacos y la determinación de estructuras de proteínas (Genheden & Ryde, 2015; Homeyer & Gohlke, 2012, 2013; Miller et al., 2012).

Varias metodologías computacionales se han desarrollado para calcular las energías libres de unión, los denominados métodos de enfoques rigurosos, tales como Perturbación de la energía libre e Integración termodinámica (Homeyer & Gohlke, 2013; Montalvo-Acosta & Cecchini, 2016), los cuales son computacionalmente exigentes, por ende es complicado utilizarlos en sistemas muy grandes. Por otro lado están, los métodos de energía libre de punto final, en estos se toman en cuenta sólo los estados finales entre los cuales se determinará la diferencia en energía libre, por lo tanto, reducen el costo computacional al eliminar la necesidad de simular estados intermedios. Entre los métodos que pertenecen a este tipo de cálculos se encuentran los enfoques ampliamente utilizados de solventes continuos: Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) and Molecular Mechanics-Poisson Boltzman Surface Area (MM-PBSA) (Homeyer & Gohlke, 2012).

MM-GBSA y MM-PBSA son métodos aproximados basados en la mecánica estadística, conteniendo los distintos términos fisicoquímicos que intervienen en el proceso de unión de un ligando a una proteína, son eficientes para calcular las energías libres de sistemas moleculares diversos.

Los cálculos de punto final se usan con frecuencia para dos tipos de análisis: calcular la estabilidad relativa de múltiples configuraciones de un sistema y calcular la energía libre de unión ($\Delta G_{unión}$) en un complejo receptor-ligando unido no covalentemente. Los cálculos de estabilidad comparan las energías libres de múltiples conformaciones para determinar su estabilidad relativa y la energía libre de unión se calcula como la suma de su energía en fase gaseosa, energía libre de solvatación y entropía configuracional. La energía libre de solvatación se aproxima mediante un modelo continuo que describe las propiedades del disolvente polar y un término que explica los efectos no polares del disolvente. Las estimaciones de energía libre calculadas por esta aproximación para el complejo, receptor y ligando pueden usarse para calcular la energía libre de unión ($\Delta G_{unión}$) como la diferencia en energía libre entre el complejo ($\Delta G_{complejo}$) y sus componentes no unidos ($\Delta G_{receptor} + \Delta G_{ligando}$) (Homeyer & Gohlke, 2013; Miller et al., 2012). Ver figura 2.2

MM-PBSA y MMGBSA

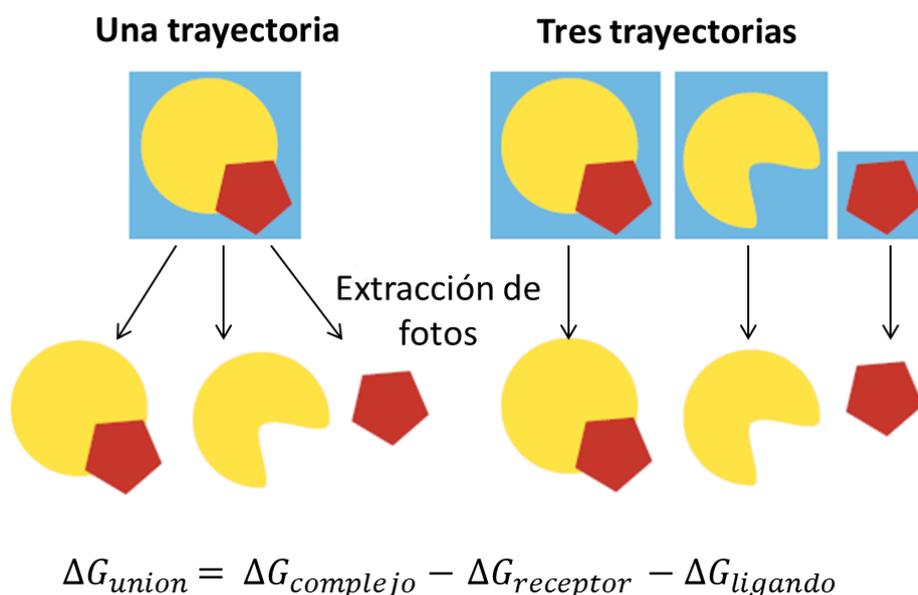


Figura 2.2. Determinación de energía libre de unión por los métodos MM-PBSA y MM-GBSA (Tomado de Homeyer and Gohlke 2013).

Para tener en cuenta las características dinámicas de las moléculas, la energía libre se computa normalmente mediante el cálculo de promedios sobre conjuntos conformacionales extraídos de simulaciones de DM con solvente explícito (Homeyer & Gohlke, 2013; Miller et al., 2012). Los conjuntos pueden

obtenerse a partir de simulaciones de complejo, receptor y ligando (enfoque de tres trayectorias) o de una sola simulación del complejo (enfoque de una trayectoria).

Si consideramos el proceso de una biomolécula cambiando de conformaciones del estado A al estado B, entonces la energía libre (ΔG) asociada con ese cambio conformacional se calcula de acuerdo con la ecuación 2.5:

$$\Delta G_{A \rightarrow B, \text{solvatado}} = \Delta G_{B, \text{solvatado}} - \Delta G_{A, \text{solvatado}} \quad (2.5)$$

De forma similar, las energías libres de unión se calculan restando las energías libres del receptor y el ligando no unidos de la energía libre del complejo unido, como se muestra en la ecuación 2.6:

$$\Delta G_{\text{union, solvatado}} = \Delta G_{\text{complejo, solvatado}} - [\Delta G_{\text{receptor, solvatado}} + \Delta G_{\text{ligando, solvatado}}] \quad (2.6)$$

El cambio de energía libre asociado con cada término en el lado derecho de las ecuaciones 2.5 y 2.6 se estima según la ecuación 2.7:

$$\Delta G_{\text{solvatado}} = E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{solvatación}} + TS_{\text{soluta}} \quad (2.7)$$

En la ecuación 2.7, ΔG solvatación representa una energía libre verdadera, ya que el disolvente ha sido promediado, debido al uso de un modelo de disolvente implícito. A continuación, usamos ΔG solvatado en las ecuaciones 2.5 y 2.6 para la consistencia; pero, es importante señalar que, en este punto, sólo tienen una estructura para el soluto. Las energías en fase gaseosa (E_{gas}) son a menudo las energías mecánicas moleculares (MM) del campo de fuerza, mientras que las energías libres de solvatación (ΔG solvatación) se calculan usando un modelo de disolvente implícito, y la contribución entrópica (S) se estima usando aproximaciones conocidas.

La energía libre de solvatación se descompone adicionalmente como la suma de contribuciones electrostáticas y no polares. Las energías descritas en las ecuaciones anteriores son puntos del sistema. Sin embargo, en la práctica, los cálculos del estado final estiman estas energías de acuerdo con los promedios

de un conjunto de estructuras representativas. Por ejemplo, expresar la ecuación 2.7 en términos de promedios produce la ecuación 2.8:

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{solvatado}} &\cong \langle E_{\text{gas}} \rangle + \langle \Delta G_{\text{solvatacion}} \rangle - T \langle S_{\text{soluto}} \rangle \\ &= \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N E_{i,\text{gas}} + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \Delta G_{i,\text{solvatacion}} - \frac{T}{N} \sum_{i=1}^N S_{i,\text{soluto}} \quad (2.8) \end{aligned}$$

donde i es el índice de una conformación particular y N es el número total de conformaciones analizadas.

Debido a las aproximaciones en los cálculos, los métodos de energía libre de punto final permiten estimar energías libres de unión a un costo computacional relativamente bajo. Sin embargo, la exactitud de las predicciones de energía libre vinculante es limitada debido a estas aproximaciones (Homeyer & Gohlke, 2013).

2.3. Mecánica cuántica

Para describir el estado de un sistema en mecánica cuántica, se postula la existencia de una función de onda o función de estado, representada por el símbolo Ψ . Esta función de onda no es un observable, sino una construcción matemática con la que se puede obtener:

$$|\Psi|^2 = \Psi\Psi^* \quad (2.9)$$

Que se interpreta como la densidad de probabilidad de la posición de la partícula en el espacio, esta función a diferencia de Ψ , si es una observable. Dentro de una aproximación no relativista, Ψ se obtiene de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo. Si la función de energía potencial del sistema no depende del tiempo, entonces el sistema puede estar en uno de sus estados estacionarios de energía constante. Dichos estados estacionarios se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo (Landau & Lifshitz, 1993):

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.10)$$

En esta ecuación diferencial de valores propios, H es el operador Hamiltoniano asociado a la energía del sistema de electrones y núcleos, Ψ es la función de

onda que describe el estado del sistema y E es la energía total del sistema en dicho estado (Gutiérrez-de-Terán, 2004). La ecuación de Schrödinger sólo puede resolverse exactamente para sistemas de dos partículas, hasta fecha sigue siendo irresoluble de forma exacta para sistemas de más de un electrón, debido al término de repulsión inter-electrónica, lo cual complica la matemática presente. Por lo que es necesario el uso de aproximaciones para sistemas mayores. Las principales aproximaciones se realizan en el operador Hamiltoniano. Aunque hemos dado igual tratamiento a electrones y núcleos, como se conoce hay una gran diferencia en la masa de estas dos fases que interactúan.

La aproximación de Born-Oppenheimer minimiza el problema separando el movimiento de los núcleos y el de los electrones, basados en el hecho que la masa de los núcleos es muy grande comparada con la masa de los electrones y se mueven, por tanto, mucho más lentamente (Goodisman, 1973). Así, el movimiento electrónico puede describirse en el campo creado por los núcleos fijos. De esta forma, es posible plantear el Hamiltoniano como suma de un término electrónico y otro nuclear, lo cual permite resolver la ecuación de Schrödinger electrónica y después la ecuación de Schrödinger para el movimiento nuclear.

Existen diversos métodos, caracterizados por el distinto nivel de aproximación matemática, para la resolución de la ecuación de Schrödinger. Una de las clasificaciones más empleadas por los químicos computacionales es la que distingue entre métodos semiempíricos, métodos *ab initio* y el método del funcional de la densidad que se fundamenta en la densidad electrónica.

2.3.1. Métodos *ab initio*

El término *ab initio* (o primeros principios) hace referencia a que los cálculos están basados únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y no emplean otros datos experimentales que no sean los valores de las constantes físicas fundamentales (la velocidad de la luz, las masas y cargas de electrones y núcleos, la constante de Planck, etc...). Son métodos que resuelven la

ecuación de Schrödinger haciendo uso de una serie de aproximaciones matemáticas rigurosas. Algunos de estos métodos son capaces de reproducir resultados experimentales, así como de proporcionar predicciones cuantitativas precisas de un amplio rango de propiedades moleculares, para lo que demandan una gran cantidad de recursos computacionales (Frisch & Foresman, 1994).

El tipo más común de cálculos *ab initio* es llamado método de cálculo **Hartree-Fock** (HF). El método de HF es un método variacional que utiliza como función de prueba un producto antisimetrizado de funciones de onda monoelectrónicas (espín-orbitales), conocido como determinante de Slater (Jensen, 2007).

Los espín-orbitales (X_i) usados en el determinante de Slater son funciones ortonormales que representan un electrón del sistema y se forman del producto de una función orbital espacial $\phi_i(\vec{r})$ y una función de espín, $\alpha(s)$ o $\beta(s)$. El determinante de Slater que genera el valor más bajo posible de energía se obtiene minimizando la misma respecto a los espín-orbitales, bajo la condición de que permanezcan ortonormales durante la minimización (Sherrill, 2000). Las ecuaciones resultantes son las ecuaciones de HF:

$$\hat{f}X_i = \varepsilon_i X_i \quad (2.11)$$

Este procedimiento da como resultado N ecuaciones (siendo N el número de electrones del sistema) en los cuales las ε_i son las energías de los correspondientes espín-orbitales y \hat{f} es el operador de Fock, que incluye el potencial promedio creado por los núcleos y por el resto de electrones sobre el electrón i . Así, en el método de HF cada electrón se mueve en este campo promedio. La expresión de \hat{f} incluye los espín-orbitales buscados y por tanto para poder solucionar las ecuaciones de Hartree-Fock se sigue un proceso iterativo conocido como método del campo autoconsistente (SCF, del inglés *Self-Consistent Field*) (Sherrill, 2000).

2.3.2. Métodos semiempíricos

Los métodos semiempíricos ocupan una posición intermedia entre la mecánica molecular y la teoría «*ab initio*», lo que indica que no son tan sencillos ni

absolutamente complejos, pero pertenecen a la mecánica cuántica. Los métodos semiempíricos hacen uso de una parametrización empírica, obtenida a partir de muchos datos experimentales con el fin de simplificar el cálculo, son considerados más rápido que los métodos «*ab initio*» y considerablemente más versátil que los métodos mecánicos moleculares desarrollado (Stewart, 1989, 2013). Se caracterizan por que describen los electrones internos utilizando parámetros empíricos, mientras los electrones de la capa de valencia son tratados mediante funciones de onda. En general, resultan apropiados para: a) estudiar sistemas con muchos átomos para los cuales no se pueden utilizar otros métodos mecano-cuánticos; b) para generar estructuras de partida confiables y después realizar cálculos *ab initio* o DFT (Density Functional Theory); c) caracterizar estados fundamentales de sistemas moleculares para los cuales el método semiempíricos está bien parametrizado y bien calibrado (Frisch & Foresman, 1994).

2.3.3. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

Un procedimiento alternativo, y conceptualmente distinto, para obtener información acerca de un sistema y que permite calcular su energía incluyendo la correlación electrónica aparece con la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)(Koch & Holthausen, 2001), desarrollada por Hohenberg y Kohn en 1964 (Hohenberg & Kohn, 1964). Estos autores demostraron que la energía del estado fundamental de un sistema electrónico está únicamente definida por su densidad electrónica $\rho_0(x,y,z)$. El método del funcional de la densidad no intenta calcular la función de onda molecular, sino que consiste en expresar la energía electrónica del estado fundamental como un funcional de la densidad electrónica $E_0 = E_0[\rho_0]$, donde ρ_0 es una función de solamente tres variables. Así, la energía se expresa como una suma de funcionales dependientes de la densidad electrónica. Algunos de estos sumandos tienen en cuenta el efecto del intercambio electrónico y de la correlación electrónica. En definitiva, la teoría del funcional de la densidad intenta calcular E_0 y otras propiedades moleculares del estado fundamental a partir de la densidad electrónica de dicho estado (Parr & Yang, 1989).

La teoría del funcional de la densidad se ha convertido en la herramienta dominante en química y física para realizar cálculos de estructura electrónica (Parr & Yang, 1989). A través del desarrollo de aproximaciones más exactas para el funcional de energía de correlación e intercambio (Fiolhais, Nogueira, & Marques, 2003), el método de Kohn-Sham (KS), ha sido extensamente y exitosamente utilizado para el estudio de sistemas químicos simples y complejos (Koch, Holthausen, & Holthausen, A chemist's guide to density functional theory , 2001). Realmente por esta aproximación es posible determinar propiedades termodinámicas, cinéticas, estructurales y dar indicios sobre la reactividad de moléculas, con una precisión comparable a la correlacionada con los métodos *ab initio*, pero con mucho menos esfuerzo computacional.

El conocimiento de la reactividad de una molécula es un concepto esencial, es de crucial interés por que permite entender las interacciones que suceden durante un mecanismo de reacción. En adición DFT ha proporcionado un marco muy sólido para el estudio de la reactividad química (Parr & Yang, 1989). A través de esta aproximación ha sido posible identificar con variables fundamentales del DFT, conceptos significativos químicamente, los cuales han sido establecidos intuitivamente, como lo son: La electronegatividad y la dureza química. Esta identificación ha sido muy importante para determinar su valor absoluto y para entender los principios asociados con ellos. Adicionalmente, ha sido posible derivar nuevos conceptos, de tipo local y global, que contienen información muy importante acerca de la respuesta de una especie química cuando interactúa con diferentes tipos de reactivos.

2.3.4. Conjunto de Funciones de Bases

Para la resolución de las ecuaciones de HF, Roothann y Hall propusieron expresar cada orbital molecular como una combinación lineal de orbitales atómicos, que son los que constituyen el conjunto de funciones de bases:

$$\phi_i = \sum_V^k c_{vi} \phi_v \quad (2.12)$$

En esta ecuación los coeficientes C_{vi} se determinan variacionalmente y el término ϕ_v son las llamadas funciones de bases. La menor energía posible mediante la aproximación HF (el límite HF) es la que se obtiene al considerar un número infinito de funciones de base. Dado que ello no es posible, se debe escoger un conjunto finito de funciones de bases. Un conjunto de funciones de base mínima consta de una función de base por orbital. Sin embargo, para mejorar los resultados es necesario usar conjuntos de bases más extensos. Estos conjuntos de bases son los llamados doble- ξ , triple- ξ , etc.

Dependiendo de si cada orbital atómico se describe con dos, tres, etc. funciones de bases. Además, funciones de momento angular más alto, llamadas funciones de polarización, son también necesarias para describir la distorsión de la distribución electrónica debida al enlace. Finalmente, funciones difusas con exponentes más pequeños, pero el mismo momento angular, permiten describir una densidad electrónica más expandida (Jensen, 2004).

2.4. Cribado de ligandos asistido por ordenador

La aplicación de métodos computacionales (*In silico*) en la selección, diseño u optimización de ligandos para modular una determinada diana terapéutica se denomina comúnmente diseño de fármacos asistido por computadora (Cavasotto, 2016; Saldívar-gonzález & Medina-franco, 2017). El desarrollo de las metodologías en la química computacional y el uso de computadoras cada día más poderosas, han permitido el aumento de técnicas encaminadas a la selección/identificación de moléculas con posibles características de fármaco, la aplicación de estas técnicas, para tal fin es conocida como, cribado virtual (Cereto-Massagué et al., 2015; Lavecchia & Di Giovanni, 2013).

La aplicación del cribado virtual se ha transformado en una tarea cada vez más sencilla de entender, aunque, la aplicación adecuada de las técnicas no es trivial y se debe evitar la idea de «diseñar ligandos apretando botones» (Medina-Franco, Fernández-de Gortaria, & Naveja, 2015). Si bien es cierto que el procesamiento de datos puede ser, en general, rápido, la elección de métodos, el análisis e interpretación de datos son laboriosos, y además deben

validarse para encontrar los parámetros óptimos que den resultados confiables (Medina-Franco et al., 2015).

Generalmente se realiza el cribado virtual basándose en dos aproximaciones. Cribado directo (cribado virtual basado en la estructura), cuando se conoce la estructura tridimensional del receptor, se incluyen aquí las técnicas de *docking molecular* (intento de encontrar el “mejor” acoplamiento entre dos moléculas: un receptor y un ligando), y cribado indirecto (cribado virtual basado en ligandos), cuando el análisis está basado en la comparación de características tridimensionales, estereoquímicas y fisicoquímicas de los ligandos, se incluyen aquí, las técnicas de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), modelos farmacofóricos, similitud, entre otras (Le-Thi-Thu et al., 2014; Mishra, Kashyap, & Hasija, 2015).

2.4.1. Cribado virtual basado en ligandos o métodos indirectos

El cribado directo o cribado virtual basado (CVBL) en ligandos se fundamenta en que moléculas estructuralmente relacionadas deberían mostrar actividades biológicas similares (Mishra et al., 2015; Ripphausen, Nisius, & Bajorath, 2011). Aunque hay ocasiones en las cuales, pequeños cambios en la estructura de un compuesto conducen a un gran cambio en la actividad del compuesto o que moléculas similares a veces muestren modos de unión diferentes (Dagmar Stumpfe & Bajorath, 2012; D Stumpfe, León, Dimova, & Bajorath, 2014). A pesar de ello, estas técnicas han resultado ser de gran utilidad dado su bajo costo computacional cuando no se dispone, o se prescinde, de la información contenida en la estructura del receptor.

2.4.1.1. Filtros *drug-likeness*

Son un conjunto de directrices para reconocer las propiedades estructurales, físicas y grupos funcionales, no deseados en compuestos. Es decir, estos métodos consideran si la molécula está dentro de los estándares de relevancia biológica en cuanto a los grupos funcionales que presenta y sus propiedades fisicoquímicas, son simplemente filtros iniciales en cualquier proceso de cribado (Tian, Wang, Li, Xu, & Hou, 2012; Vistoli, Pedretti, & Testa, 2008; Vyas, Jain, Jain, & Gupta, 2008).

Existen varios tipos de filtros, los más utilizados por velocidad y tradición son: La “regla de los cinco” de Lipinski y los filtros de grupos funcionales tóxicos o reactivos. La “regla de los cinco” de Lipinski (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1997, 2012) es una de las más utilizadas. Esta filtra las moléculas en función de su peso molecular ($MW \leq 500$ g/mol), su lipofilia, medida en función del coeficiente de reparto octanol/agua ($\text{Log}P \leq 5$) y el número de donadores ($n\text{HBD} \leq 5$) y aceptores ($n\text{HBAc} \leq 10$) de puentes de hidrógeno. Se considera que un compuesto que no satisfaga dos o más de estos criterios, tiene una baja probabilidad de tener una absorción intestinal y por consiguiente de convertirse en un buen fármaco con vía de administración oral. Además, normalmente esta regla se extiende con la condición de que el número de enlaces rotables ($n\text{RotB}$) sea inferior a 10.

Sin embargo, se ha encontrado que los márgenes de Lipinski son demasiados estrictos y normalmente se aplican valores de corte algo superiores, principalmente en lo referente al peso molecular y a la lipofilia (Le-Thi-Thu et al., 2014).

Los compuestos con grupos funcionales reactivos o tóxicos, son removidos usando filtros específicos. Grupos funcionales reactivos típicos incluyen, por ejemplo, peróxidos, haluros de alquilo, entre otros. Usar filtros que eliminan los grupos funcionales tóxicos o demasiado inestables que están asociados con la toxicidad, proporciona una manera práctica y rápida para reducir la gran cantidad de compuestos en las bases de datos, como los incluidos en el programa REOS (*Rapid Elimination of Swill*) (Walters & Murcko, 2002; Zhu et al., 2013)

2.4.1.2. Similitud molecular

La búsqueda de similitud puede ser utilizada para identificar moléculas de una base de datos haciendo uso de alguna definición cuantitativa de la similitud estructural intermolecular con respecto a los compuestos de referencia (Dagmar Stumpfe & Bajorath, 2011). Aunque, la mayoría de los cálculos de búsqueda de similitud no se llevan a cabo para identificar moléculas químicamente similares, más bien, la búsqueda de similitud tiende típicamente a detectar moléculas que tienen actividad biológica similar (Dagmar Stumpfe & Bajorath, 2011).

Lo anterior se debe fundamentalmente al principio de similitud, el cual plantea que moléculas con estructuras similares tienden a exhibir propiedades similares (Johnson & Maggiora, 1990). Los métodos de similitud molecular son de bajo costo computacional, por ende se pueden implementar en la búsqueda sobre grandes bases de datos de estructuras químicas, demostrando ser extremadamente útil en el campo farmacéutico (Sheridan & Kearsley, 2002).

Se han establecido cuatro componentes básicos en una búsqueda de similitud entre moléculas (Maldonado, Doucet, Petitjean, & Fan, 2006):

- Las estructuras de los compuestos
- Representación matemática de los compuestos químicos
- La medida de similitud
- El algoritmo de emparejamiento

Esto permite ordenar las moléculas de la biblioteca de compuestos químicos, calculando una medida de similitud entre la estructura diana y cada uno de los compuestos presentes en la base de datos, por lo que posteriormente se pueden ordenar por similitud decreciente. Los primeros de la lista se convierten en los candidatos seleccionados por el cribado virtual. Existen muchos coeficientes de similitud (Le, 2011), siendo el coeficiente de Tanimoto (Rogers & Tanimoto, 1960), el más utilizado para los datos binarios, mostrando un buen comportamiento en varios estudios (Le-Thi-Thu et al., 2014).

2.4.1.3. Farmacóforos

El término farmacóforo ha sido usado en la química médica por muchos años, la definición en 1998 dada por la *IUPAC* es la siguiente. “Es el conjunto de características estéricas y electrónicas que son necesarias para asegurar una interacción supramolecular óptima con una estructura biológica y para activar (o bloquear) su respuesta biológica”(Wermuth, Ganellin, Lindberg, & Mitscher, 1998). El farmacóforo puede considerarse como el común denominador compartido por un conjunto de moléculas activas (Leach, Gillet, Lewis, &

Taylor, 2010). Cuando no se dispone de la estructura de cierto receptor implicado en algún proceso fisiológico importante, pero se dispone de una serie de compuestos activos, una de las alternativas más tentadoras para la búsqueda de compuestos químicos con capacidad para modular dicho proceso es; el diseño de modelos farmacofóricos (Qing et al., 2014).

Al ligando más activo o a un alineamiento de varios ligandos activos, se les asigna un conjunto de puntos en el espacio que reflejan la presencia o ausencia de características farmacofóricas. Los grupos farmacofóricos usados cuando se generan modelos farmacofóricos dependen de los intereses del investigador, comúnmente son utilizados átomos con cargas negativa o positiva, aceptores y donadores de puente de hidrógeno y átomos con carácter hidrofóbico (Qing et al., 2014), ver figura 2.3. Una vez se ha obtenido el modelo, se puede utilizar para cribar en bases de datos de moléculas previamente alineadas.

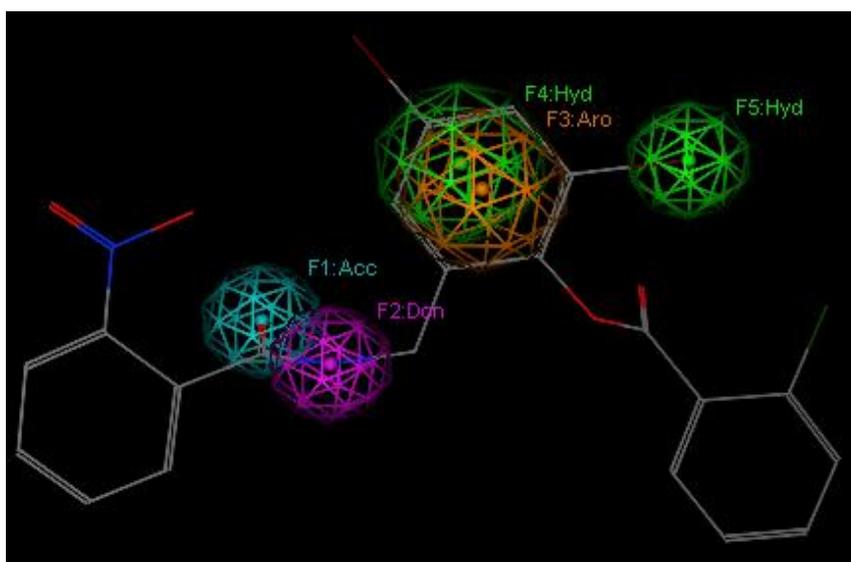


Figura 2.3. Modelo farmacofórico. Las características se representan con esferas coloreadas: hidrofóbico (Verde), Donador (lila), aceptor (cian)

Se han desarrollado varios programas para el desarrollo de modelos farmacofóricos, entre los más utilizados se encuentran DISCO (*Distance Comparisons*) (Martin, Bures, Danaher, DeLazzer, Lico, & Pavlik, 1993), Catalyst (Barnum, Greene, Smellie, & Sprague, 1996), GASP (*Genetic Algorithm Superimposition Program*) (Jones, Willett, & Glen., 1995), y (MOE, 2009)

2.4.1.4. QSAR y 3D-QSAR

Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) permiten relacionar cuantitativamente los cambios estructurales de una serie de compuestos con los cambios presentes en la actividad (Sen, Farooqui, Easwari, & Roy, 2012). Son una herramienta de gran importancia para el diseño de fármacos apoyado de métodos quimiométricos, estadísticos y quimiinformáticos. Permiten establecer relaciones matemáticas entre la estructura molecular de una serie de compuestos y actividades biológicas, propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de estos compuestos (Todeschini & Consonni, 2009).

En la actualidad existen diferentes aproximaciones por las que se puede desarrollar un estudio QSAR, dependiendo del tipo de tratamiento matemático que se le aplique a la muestra, se pueden clasificar como:

- QSAR tradicional
- QSAR por redes neuronales
- QSAR 3D

En los métodos 3D-QSAR, se relaciona la forma y propiedades de las moléculas con características moleculares específicas y la orientación espacial que toman dichas moléculas. Entre ellos resalta el análisis CoMFA (*comparative molecular field analysis*) introducido por Cramer en 1988 (R. D. Cramer, Patterson, & Bunce, 1988), donde se calculan las energías de interacción estérica (van der Waals) y electrostática (Coulomb) entre cada molécula y un átomo o grupo sonda adecuados situados en puntos regularmente espaciados de una malla tridimensional que rodea a todos los compuestos alineados y proporcionando toda la información necesaria para comprender las actividades biológicas, ver figura 2.4.

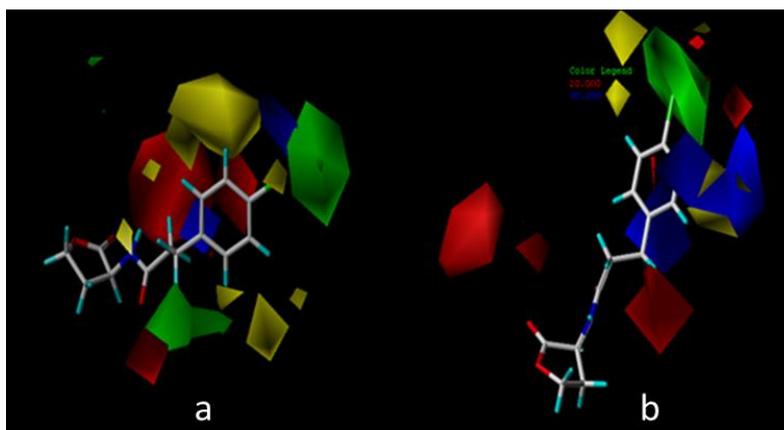


Figura 2.4. Mapas de contorno CoMFA. Para los modelos a y b mostrando las contribuciones estéricas y electrostáticas favorecidas y desfavorecidas

2.4.2. Cribado virtual basado en el receptor o métodos directos

El cribado virtual basado en la estructura del receptor generalmente es más eficaz en la identificación de nuevos núcleos base de estructuras químicas y son de mayor implementación en los laboratorios académicos (Danishuddin & Khan, 2015). Para aplicar este método de cribado, es necesario disponer de la diana biológica a modular, la cual puede seleccionarse de cristalografía de rayos X y estructuras resueltas por RMN o puede determinarse mediante modelado teórico (modelación de homología) para muestrear las moléculas candidatas dentro de su sitio activo. La estructura del receptor se usa para explorar el espacio químico identificando ligandos en bases de datos de compuestos químicos, mediante técnicas de acoplamiento molecular (*docking*) o bien para diseñar compuestos *de novo* que encajen en el sitio de unión de la proteína (Cheng, Li, Zhou, Wang, & Bryant, 2012).

Mediante el uso de la información tridimensional del receptor, ahora se pueden investigar las interacciones moleculares subyacentes involucradas en los complejos proteína-ligando y, por tanto, interpretar los resultados experimentales a nivel atómico (Lionta, Spyrou, Vassilatis, & Cournia, 2014).

2.4.2.1. Acoplamiento molecular (*Docking*)

Se denomina *docking* molecular a un procedimiento de la química computacional utilizado para explorar e intentar predecir los posibles modos de unión e interacciones existentes entre ligandos y un receptor, generalmente una proteína (S. Y. Huang & Zou, 2010). Algunos programas de *docking* se

pueden utilizar para identificar el sitio de unión, *docking* ciego (Hetényi and van der Spoel 2002). Como resultado de esta exploración se obtiene una colección de las posibles poses que, el programa ordena según el valor que su función de evaluación le ha dado a cada solución (*scoring* o puntaje). Por lo tanto, para un estudio de acoplamiento se requieren dos componentes esenciales: el algoritmo de búsqueda y la función de evaluación.

La búsqueda conformacional es la parte del proceso de *docking* que requiere más tiempo computacional, por lo que los algoritmos que tardan más de tres minutos por ligando por procesador, se consideran muy lentos para ser utilizados en el cribado virtual. La etapa más conflictiva es la relacionada con la función de evaluación o *scoring* para predecir la afinidad de la unión proteína (o cualquier otra macromolécula)–ligando. Las funciones tradicionalmente aplicadas se clasifican en (S. Y. Huang & Zou, 2010):

- i) Basadas en campos de fuerza: a partir de mecánica molecular
- ii) Empíricas: estiman la energía libre de unión sumando términos de interacción derivados de la contribución ponderada de parámetros estructurales (número de puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, contactos apolares, entropía,...).
- iii) *Knowledge-Based*: representan la afinidad como suma de interacciones de pares de átomos proteína-ligando.

Las funciones empíricas son las más usadas en los programas actuales de diseño de fármacos, aunque no existe ninguna función de evaluación superior al resto, debido, a que, existen funciones que se comportan mejor para determinados complejos proteína-ligando. De hecho, debido a la falta de reproducibilidad y fiabilidad general, normalmente se utiliza una combinación de funciones (*consensus scoring*), como la que presenta el programa *FlexX*. Con ello, se combinan varias funciones y solo aquellas conformaciones (*poses*) que reciben alta puntuaciones o *scores* por dos o más funciones de *scoring* son consideradas favorables.

En la actualidad existen muchos programas de *docking* disponibles, algunos tienen licencia gratis, otros realizan cálculos *on line*, entre los programas más conocidos de *docking* se encuentran DOCK (Kuntz, Blaney, Oatley, Langridge,

& Ferrin, 1982), FlexX (Rarey, Kramer, Lengauer, & Klebe, 1996), GOLD (Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997), AUTODOCK2.4 (Morris & Huey, 2009), GLIDE (Friesner et al., 2004), ICM-DOCK (Abagyan, Totrov, & Kuznetsov, 1994)

2.4.2.2. Diseño *de novo*

El diseño *de novo* basado en la estructura, utiliza un mapa de interacciones creado a partir del sitio activo del receptor. Con ello se pueden crear listas de nuevos compuestos confeccionados únicamente para encajar en un receptor específico (Schneider & Fechner, 2005). Dicha aproximación puede llevarse a cabo en Discovery Studio 1.7 y 2.0 con la herramienta DS Catalyst Structure Based Pharmacophore (protocolos De Novo Receptor, De Novo Link, y De Novo Evolution). Así mismo Discovery 2.0 permite integrar las características derivadas de la estructura del receptor con las características derivadas del ligando para crear un modelo más completo de las características necesarias de un ligando para la unión al receptor. Esta aproximación se considera de especial interés cuando la estructura de la proteína con que se trabaja no está del todo definida.

3. OBJETIVOS

El mecanismo de QS controla un gran arsenal de factores de virulencia excretados por *P. aeruginosa* y además está involucrado en la formación de biopelículas, las cuales forman la base para las infecciones crónicas causadas por esta bacteria (Sadikot et al., 2005). Dichas infecciones suelen ser resistentes al tratamiento con múltiples antibióticos (Bonomo & Szabo, 2006; Doshi et al., 2011), debido a los variados mecanismos de resistencia a su disposición y en particular a su capacidad para formar biopelículas (Lewis, 2007; Moore et al., 2014). Por tal motivo, no es sorpresa que la modulación del QS sea un objetivo ideal para las llamadas terapias de "antivirulencia" (Rasmussen and Givskov 2006; LaSarre and Federle 2013; Galloway et al. 2012).

Lo anterior, tiene relación con la marcada disminución en la tasa de descubrimiento de nuevas terapias antimicrobianas en las últimas décadas, mientras que la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos ha aumentado (Boucher et al., 2013). Por lo tanto, investigaciones recientes se han centrado en enfoques que disminuyen la patogenicidad bacteriana sin afectar el crecimiento bacteriano (Cegelski et al., 2008). Este enfoque anti-infeccioso es conceptualmente distinto de los enfoques tradicionales para el tratamiento de infecciones bacterianas que usualmente utilizan moléculas bactericidas o bacteriostáticas dirigidas a procesos celulares críticos (Capilato et al., 2016).

El uso de moléculas con capacidad para competir o interferir con las señales nativas de AHL e interaccionar con el receptor LasR presente en *P. aeruginosa* y de esta manera disminuir las infecciones bacterianas producidas por este patógeno, es un enfoque distinto de los tradicionales, constituyéndose en una estrategia única para el tratamiento y la prevención de una serie de infecciones bacterianas agudas y crónicas, hecho que es de particular importancia dada la propagación rápida y continua de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Kollef et al., 2011), y además la interrupción del QS no es fatal para estos organismos, como sí lo son el uso de antibióticos tradicionales.

Existen muchas investigaciones relacionadas con el diseño y optimización de ligandos que interaccionan con el receptor LasR (Frei, Breitbach, & Blackwell, 2012; O'Reilly & Blackwell, 2016; Screening, Borlee, Geske, Blackwell, & Handelsman, 2010), y también se han realizado estudios estructurales que ofrecen alguna información sobre la unión de los ligandos AHL y no AHL a LasR (Ahumado et al., 2010, 2014a, Soulère et al., 2007, 2010; Suneby et al., 2017), pero a pesar de ello, existe poco conocimiento sobre que interacciones son críticas para la activación o la inhibición de LasR, por parte de los ligandos diseñados y como estas interacciones pueden afectar a nivel de funcionamiento al receptor LasR, debido a los cambios conformacionales que este receptor sufre después del reconocimiento molecular y posterior formación del complejo.

Conocer esta información es crucial para nuestros esfuerzos en el diseño e identificación de moduladores del QS. Bajo estas consideraciones el modelado molecular puede proveer información estructural muy útil, así como una visión en profundidad sobre los mecanismos de interacción que permitan comprender el comportamiento de los ligandos en el sitio activo de LasR y los cambios conformacionales que sufre el receptor cuando se une a diferentes ligandos, y como estos cambios se reflejan en la estructura general del receptor, afectando su función normal.

En este sentido, para desarrollar esta tesis nos planteamos el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos que se describen de manera condensada en los siguientes puntos:

Objetivo general

Analizar las características estructurales necesarias para la identificación de antagonistas del receptor LasR utilizando las herramientas del modelado molecular

Objetivo específico

- Desarrollar una mejor comprensión a nivel molecular de como análogos estructurales de AHL interaccionan con el sitio activo del receptor LasR

utilizando las metodologías de acoplamiento molecular y 3D-QSAR basado en el receptor.

- Analizar la estabilidad conformacional y las interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en los complejos LasR-ligandos a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular.
- Evaluar de la afinidad de unión de una serie de ligandos mediante las metodologías de MM-GBSA/MM-PBSA.

4. METODOLOGÍA

La metodología de este trabajo se divide en tres partes, realizadas en las instalaciones del Grupo de Química Cuántica y Teórica de la Universidad de Cartagena y en el grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad nacional

4.1 Modelado molecular de análogos sobre el receptor LasR de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los ligandos utilizados en este trabajo y su actividad biológica *in vitro* (IC₅₀) fueron tomados de los trabajos (Geske, Mattmann, & Blackwell, 2008; Geske, O'Neill, Miller, Mattmann, & Blackwell, 2007). Las estructuras moleculares de los compuestos y su actividad biológica son mostradas en la tabla 5.1. Las estructuras de los ligandos fueron construidas usando el programa Gauss View 5.0.8 (Dennington, Keith, & Millam, 2009) y sus geometrías fueron optimizadas usando el método DFT con el funcional X3LYP y la base de cálculo DGDZVP (Godbout, Salahub, Andzelm, & Wimmer, 1992; Xu & Goddard, 2004), como esta implementado en el programa Gaussian09 (Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, 2009).

4.1.1. Acoplamiento molecular

La estructura 3D del complejo co-cristalizado de LasR y el ligando nativo N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona se obtuvo del Protein Data Bank (Zou & Nair, 2009b), con código PDB 3IX3. La estructura de la proteína en el formato PDB fue visualizada y preparada usando la herramienta para preparación de proteínas disponible en paquete de programas de modelado molecular Sybyl X 1.2 (SYBYL-X 1.2, Tripos International, St. Louis, MO), el ligando nativo y todas las moléculas de agua fueron removidas, átomos de hidrógeno polares fueron añadidos, las cadenas laterales amidas e imidazoles fueron protonadas asumiendo pH fisiológico (7).

El campo de fuerza Amber fue usado para asignar las cargas atómicas parciales de la proteína, la estructura del ligando nativo fue extraída y su geometría fue sometida a optimización en SYBYL usando el algoritmo de minimización de gradiente conjugado y se calcularon las cargas de *Gasteiger*.

Después de eso, para validar el protocolo de acoplamiento, el ligando nativo fue re-acoplado en el sitio de unión del receptor *LasR*. El programa AutoDock v.4.2 (Morris & Huey, 2009) fue utilizado para predecir el modo de unión de los ligandos en el sitio activo de *LasR* y para explorar las interacciones en los complejos proteína-ligando formados. Los parámetros utilizados para los cálculos de acoplamiento fueron: algoritmo genético lamarckiano (LGA) en el caso de la búsqueda conformacional del ligando. Los mapas de potencial se calcularon mediante el programa Autogrid (que viene incorporado en Autodock) utilizando una malla tridimensional centrada en el sitio de unión del receptor *LasR* (X=12.083, Y=1.247, Z=16.614), con dimensiones de 50x50x50 Å y con un espaciado entre los puntos de 0.375 Å, de este modo, el espacio de búsqueda queda exclusivamente reducido al sitio de unión conocido.

Los parámetros adicionales del *docking* fueron: ensayos de acoplamiento: 200, tamaño de la población: 100, posición inicial y conformación aleatorias, rangos de paso de traducción: 2.0 Å, rangos de paso de rotación: 50, elitismo: 1, tasa de mutación: 0.02, tasa de cruzamiento: 0.8, tasa de búsqueda local: 0.06 y evaluaciones de energía: 250.000. Este protocolo y parámetros adicionales fueron tomados de Ahumado, Drosos, & Vivas-Reyes, 2014. Las 28 moléculas estudiadas en este trabajo fueron acopladas siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente; la mejor conformación, en cada caso, se eligió de acuerdo con sus valores de energía libre acoplados y la posición adoptada en el sitio de unión del receptor *LasR*.

4.1.2. 3D-QSAR

Aplicamos dos metodologías para desarrollar los modelos 3D-QSAR. La metodología tradicional basada en la alineación de estructuras optimizadas de los análogos de *AHL* y una metodología alternativa basada en las mejores poses resultado de los cálculos de acoplamiento, lo cual genera un alineamiento automático (Sippl, 2000).

El 3D-QSAR basado en receptor solo es posible cuando las estructuras tridimensionales de una proteína objetivo se han resuelto experimentalmente o por modelado por homología. Se analizaron las cualidades de estos modelos 3D-QSAR para identificar cuál de los dos tipos de alineamientos genera una

mejor correlación y tiene mejor poder de predicción. El descriptor CoMFA se calculó utilizando la opción QSAR en SYBYL X 1.2. Las energías de campo estérico y electrostático se calcularon utilizando los potenciales de Lennard-Jones y de Coulomb, respectivamente, con una constante dieléctrica $1/r$ dependiente de la distancia en todas las intersecciones. Para calcular las energías estéricas y electrostáticas se utilizó el campo de fuerza por defecto de SYBYL, Tripos. El punto de corte tanto para la energía estérica como electrostática se estableció en 30 kcal mol⁻¹, indicando que cualquier valor de campo estérico o electrostático que superó dicho valor fue sustituido por 30 kcal mol⁻¹.

La validación de los modelos es un paso crítico y también considerado el más importante en un estudio QSAR. Un modelo QSAR con un alto valor del coeficiente de correlación (R^2) obtenido a partir de un análisis de correlación (por ejemplo, un análisis MLR o PLS) cuantifica el mejor ajuste de las variables dependiente e independiente, pero no contiene información acerca de la capacidad para predecir la variable dependiente de compuestos que no fueron incluidos en el conjunto de entrenamiento usado para construir el modelo (por ejemplo, compuestos del conjunto de prueba).

Por lo tanto, para los modelos 3D-QSAR generados, se utilizó el esquema de validación cruzada "dejando uno afuera" (LOO, siglas en inglés para —Leave one out) con el fin de evaluar la capacidad predictiva. A partir el procedimiento de validación cruzada LOO, se obtiene el cuadrado del coeficiente de validación cruzada LOO (Q^2), que se utiliza como un criterio para evaluar tanto la robustez y la capacidad predictiva de los modelos generados. La capacidad predictiva de un modelo QSAR se puede estimar de forma confiable mediante una validación externa. Por lo tanto, la capacidad predictiva de los modelos se evaluó mediante la predicción de la variable dependiente de un conjunto de prueba externo de 5 compuestos, que no se utilizó para la construcción del modelo.

4.1.3. Simulaciones de dinámica molecular

Las coordenadas para las simulaciones de DM se han obtenido a partir de los resultados del acoplamiento molecular, los cálculos de las simulaciones de DM se llevaron a cabo con el módulo SANDER del paquete AMBER14 (Case et al., 2014). Los ligandos se parametrizaron utilizando las cargas de RESP (Bayly, Cieplak, Cornell, & Kollman, 1993) optimizando la geometría a el nivel HF/6-31+G*, las cargas parciales y otros parámetros, como los ángulos y los diedros, se tomaron del campo de fuerza Amber (GAFF) ((Wang, Wolf, Caldwell, Kollman, & Case, 2004) y del campo de fuerza ff99SB (Duan et al., 2003).

Los complejos se solvataron en una caja cúbica usando moléculas de agua tipo TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983) con una distancia de 8 Å entre el límite de la caja y el complejo, con condiciones periódicas para evitar la evaporación del sistema. El término electrostático se definió con el algoritmo de malla de partículas Ewald (PME) (de Souza & Ornstein, 1997) con un corte de 12.0 Å. Los iones de sodio se agregaron al sistema reemplazando aleatoriamente las moléculas de agua hasta lograr la neutralidad. Los sistemas simulados contienen alrededor de 10480 moléculas de agua, 7 iones sodio, 2542 átomos del receptor y el número de átomos en los ligandos varía entre 35 y 50 átomos, un total aproximado de 34025 átomos en cada sistema.

Todas las simulaciones de DM siguen el procedimiento de minimización, calentamiento, densidad, equilibrio y producción con un tiempo de 2 fs. Para eliminar posibles malos contactos, los sistemas completos se minimizaron en 1000 pasos en el método de dirección del máximo gradiente seguido de 500 pasos del método de gradiente conjugado. La distancia de corte se mantuvo a 8Å para calcular las interacciones no enlazantes.

Luego, los sistemas se calentaron gradualmente con el método NVT de 0 a 300 K durante un período de 100 ps, utilizando el nuevo esquema de equilibrio de temperatura de Langevin (NTT = 3) que es significativamente mejor para mantener e igualar la temperatura del sistema, que el algoritmo Berendsen. Luego, la etapa de equilibrado durante 1000 ps con restricciones débiles sobre el complejo a presión constante de 1 atm y 300 K. En este proceso, se aplicó el

algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti, & Berendsen, 1977) a todos los enlaces que involucran átomos de hidrógeno, y finalmente, se llevó a cabo una etapa de producción de 150 ns, en las mismas condiciones de la etapa anterior. La visualización y el análisis de las trayectorias se realizaron con VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). Las trayectorias de las coordenadas se registraron cada 1000 ps para todas las simulaciones de DM. Las conformaciones obtenidas de las simulaciones se utilizaron para calcular la energía libre de unión.

4.1.4. Cálculo de energías libres de unión mediante MM-PBSA y MM-GBSA.

La energía libre de unión para cada sistema se calculó mediante las metodologías MM/PBSA y MM/GBSA (Kollman *et al.*, 2000). Calculamos la energía de interacción y la energía libre de solvatación para el complejo, el receptor y el ligando, se promediaron los resultados para obtener una estimación de la energía libre de unión. Los componentes de energía se calculan para investigar la contribución energética de un conjunto de geometrías tomadas de cada simulación de DM, utilizando el script MMPBSA.py (Miller *et al.*, 2012) del conjunto de paquetes AMBER 14.

5. RESULTADOS

Se aplicaron de manera secuencial tres estrategias del modelado molecular: acoplamiento molecular (*docking*), 3D-QSAR (Relación cuantitativa estructura actividad) y las simulaciones de dinámica molecular. Cada una de estas estrategias permitió obtener información de interés para nuestro estudio. Aunque son metodologías de enfoques diferentes se complementan entre sí, permitiendo obtener un consolidado, con la información más relevante de cada estrategia.

Los cálculos de acoplamiento molecular permitieron estudiar el modo de unión de los análogos estructurales de *AHL* en el sitio activo del receptor *LasR* e identificar las interacciones más importantes presentes en los complejos proteína ligandos formados. Los modelos 3D-QSAR generados permiten obtener una correlación entre la actividad biológica del conjunto de análogos y su estructura tridimensional. Los complejos proteína-ligando seleccionados en el acoplamiento molecular se sometieron a simulaciones de DM, lo que permitió determinar la estabilidad de las conformaciones predichas en los cálculos de acoplamiento molecular, posteriormente se analizó la estabilidad de los puentes de hidrógeno a lo largo de la simulación, y posteriormente se calculó la energía libre de unión de cada complejo con el objetivo de comparar y encontrar tendencias con la actividades biológicas reportadas para estos 28 análogos.

5.1. Validación de la metodología de acoplamiento molecular

Para la validación del protocolo de *docking* aplicado en este estudio, la estructura del ligando nativo fue re-acoplada en el sitio de unión del receptor *LasR* utilizando el programa *Autodock versión 4.2*, la energía de unión para la mejor pose fue -8.81 kcal/mol, además del criterio energético, se tomó en cuenta el valor del RMSD. Para la pose seleccionada, se observó que el ligando adopta una conformación y orientación casi idéntica a la tomada por el ligando nativo en el complejo co-cristalizado, colocando la cadena lateral acilo de una manera apropiada en el bolsillo hidrofóbico del receptor *LasR* (ver figura 5.1), a pesar de la alta libertad conformacional que posee esta cadena.

Esta conformación reproduce las interacciones tipo puente de hidrógeno, entre los grupos amida y carbonilo presentes en el ligando nativo y los residuos Tyr-56, Trp-60, Asp-73 y Ser-129 del receptor *LasR*. Estudios han reportado que estas interacciones son muy importantes para el correcto plegamiento de las proteínas pertenecientes a la familia tipo *LuxR*, en las cuales, estos residuos están estrictamente conservados en una amplia gama de receptores transcripcionales de bacterias Gram negativas, reflejando el hecho que son importantes en cada receptor para reconocer el farmacóforo presente en su *AHLs* específica (Ahumado et al., 2010; Ahumado, Drosos, & Vivas-Reyes, 2014b; Bottomley et al., 2007; Gerdt et al., 2015; Gerdt, McInnis, Schell, Rossi, & Blackwell, 2014b; Zou & Nair, 2009a).

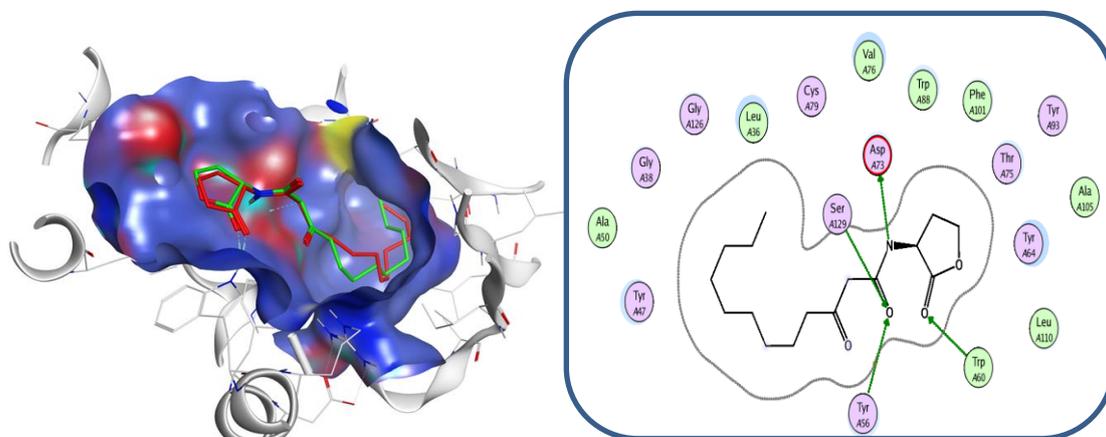


Figura 5.1. Alineamiento entre el ligando presente en el complejo co-cristalizado (en verde) y el ligando acoplado (en rojo), izquierda. Interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en el complejo proteína-AHL, formado entre el ligando nativo acoplado y el sitio activo del receptor *LasR*

La cadena lateral acilo, presenta interacciones tipo Van der Waals con los residuos Leu-36, Leu-40, Ile-52, Tyr-47, Val-76, y Leu-125 presentes en el bolsillo hidrofóbico de *LasR*, esta interacciones son importantes porque son las que estabilizan al complejo *LasR-AHLs* naciente, en particular, la interacción con Tyr-47 (Bottomley et al., 2007; Zou & Nair, 2009a).

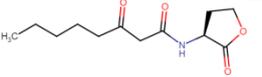
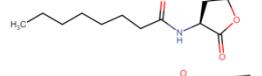
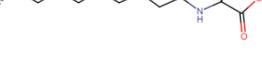
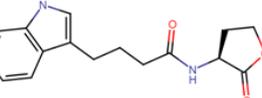
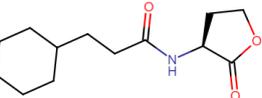
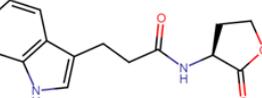
El análisis cualitativo descrito arriba es ratificado por el valor del *RMSD* calculado para la conformación acoplada con respecto a la conformación del ligando nativo presente en el complejo co-cristalizado, para tal cálculo se obtuvo un valor de 0.59 Å. Este valor sugiere que los resultados de los cálculos realizados por *Autodock*, son confiables para nuestro grupo de moléculas en estudio, teniendo en cuenta que son análogos estructurales de *AHLs*.

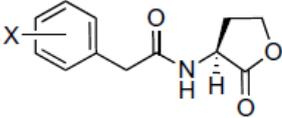
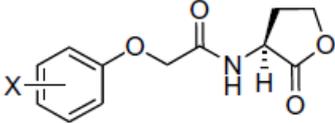
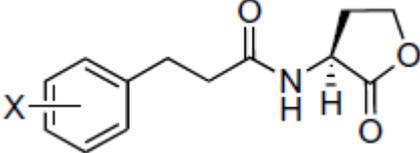
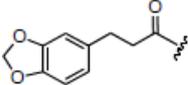
Se ha reportado que para la validación de un protocolo de acoplamiento molecular, una conformación se considera correcta si el valor de *RMSD* es inferior a 2 Å (Warren et al., 2006).

5.2 Acoplamiento entre *LasR* y Análogos

Los resultados del acoplamiento molecular mostraron que para cada análogo se generan dos o más *Cluster* de conformaciones, estos se ordenan por energía, y su tamaño es proporcional al número de conformaciones en cada *Cluster*. Para seleccionar una conformación de la manera más objetiva posible, para cada ligando se elige el *Cluster* más poblado y de este, la conformación con la menor energía. Las estructuras de los 28 ligandos conservan la función homoserina lactona (*HSL*) mientras la cadena lateral acilo es variable, como se puede observar en la tabla 5.1. En la figura 5.2, se observa, que en todos los ligandos los grupos carbonilo y amida de la homoserina lactona y el carbonilo de la cadena acilo, están orientados hacia los aminoácidos con los cuales forman las interacciones tipo puente de hidrógeno. En la figura 5.3 se observan las interacciones para cuatro de los ligandos más potentes de este grupo de ligandos.

Tabla 5.1. Clasificación de los análogos de las AHLs con actividad biológica reportada como IC_{50} . En negrita se resaltan los valores de IC_{50} de los ligandos más activos por grupo

Grupo	Estructura	ID	Sustituyente (X)	IC_{50} (μ M)
AHL		1	-	0.11
		A3	-	1.75
		A4	-	0.25
Otros análogos		9	-	8.34
		B11	-	1.75
		B14	-	0.83

PHL		8	4-Br	3.89
		C6	3-Cl	3.97
		C8	3-Br	4.06
		C10	4-I	1.72
		C11	3-I	4.63
		C14	3-NO ₂	0.61
POHL		D15	4-OCF ₃	4.67
		E16	3-CH ₃	7.8
		E20	4-Cl	4.7
		E21	4-Br	2.1
		E22	4-I	2.0
		B7	4-Br	0.34
PPHL		E26	4-CH ₃	4.3
		E27	3-CH ₃	8.9
		E28	4-OCH ₃	6.8
		E29	4-F	12
		E30	4-Cl	2.2
		E31	3-Br	3.3
		E33	3-I	1.8
		E37	4-NO ₂	3.0
		E38	3-NO ₂	3.4
		E39		3.4

Estas interacciones están presentes en cada uno de los análogos, la única diferencia es la distancia y ángulo de los puentes de hidrógeno formados, por cada ligando, como se evidencia en los valores mostrados en la tabla 5.2, para los ligandos más activos en cada grupo (En la tabla 1 en los anexos se puede evidenciar para los 28 análogos), esto es un indicio que su diferencia en cuanto actividad antagonista debe estar relacionada en un alto porcentaje con la ubicación y orientación de sus cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico que posee *LasR* en su sitio activo.

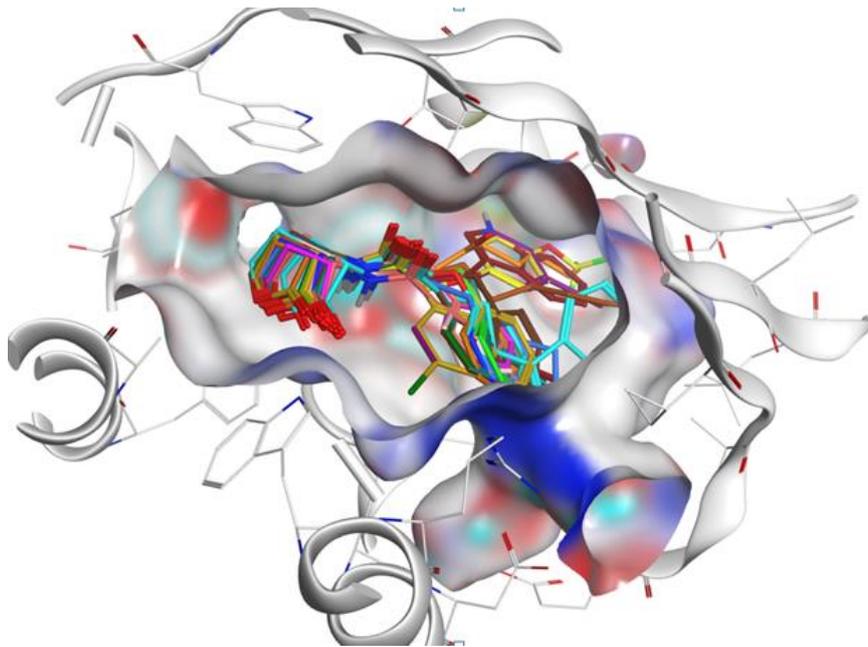


Figura 5.2. Alineamiento de las mejores poses de los 28 análogos acoplados dentro del sitio de unión de LasR.

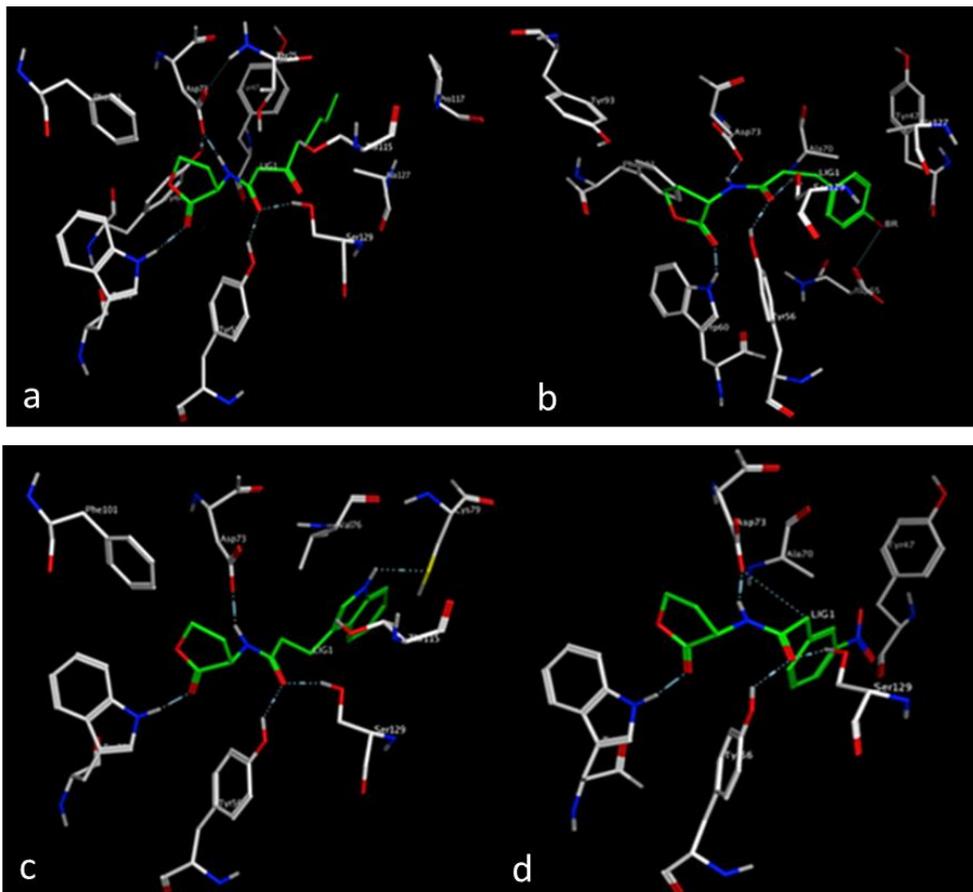


Figura 5.3. Interacciones en el sitio activo del receptor LasR por los ligandos 1(a), B7 (b), B14(c) y C14(d).

Tabla 5.2. Puentes de hidrógeno formados por los ligandos más activos de cada grupo

ligandos	Residuos	Distancia H-A	Distancia D-A	Angulo donor	<i>Autodock</i> (kcal/mol)
1	Tyr56	2.24	3.05	141.28	-7.39
	Trp60	2.13	3.11	164.76	
	Asp73	1.87	2.84	162.19	
	Thr75	2.50	3.26	135.58	
	Ser129	1.80	2.74	163.06	
b7	Tyr56	2.05	2.91	149.20	-8.67
	Trp60	1.90	2.85	156.36	
	Asp73	2.02	2.91	147.88	
	Thr75	2.85	3.59	133.68	
	Ser129	1.84	2.78	163.22	
b14	Tyr56	2.26	3.07	141.80	-8.99
	Trp60	1.84	2.82	163.29	
	Asp73	1.92	2.85	153.83	
	Thr75	2.19	3.03	140.82	
	Ser129	1.82	2.76	163.69	
c14	Tyr56	2.21	3.00	138.91	-8.44
	Trp60	1.80	2.79	168.26	
	Asp73	1.96	2.92	160.35	
	Thr75	2.85	3.59	135.14	
	Ser129	1.76	2.68	160.20	
E22	Tyr56	2.00	2.87	149.79	-8.07
	Trp60	1.99	2.86	143.02	
	Asp73	2.01	2.92	149.64	
	Thr75	2.85	3.58	133.72	
	Ser129	1.83	2.76	161.58	

Por lo anterior, para comprender mejor las interacciones existentes entre *LasR* y cada uno de los análogos estudiados, estos últimos fueron divididos en cinco grupos, como lo reportan Geske *et al.* 2007; Geske, Mattmann, and Blackwell 2008, quienes sintetizaron estos análogos y determinaron su capacidad como antagonistas. En este estudio, cada análogo se dividió en dos regiones como se muestra en la figura 5.4, la región A, la parte conservada, la cual está formada por la homoserina lactona y el carbonilo, y la región B, las cadenas laterales variables entre un grupo y otro (Ahumado, Drosos, and Vivas-Reyes 2014).

Como todos los análogos reportan las interacciones entre la región A y los aminoácidos Tyr-56, Trp-60, Asp-73 y Ser-129, se realizó únicamente la descripción del análisis de la región B de cada análogo, esto permite un mejor

análisis de las relaciones estructura actividad (SAR), existentes entre estos análogos y el receptor *LasR*.

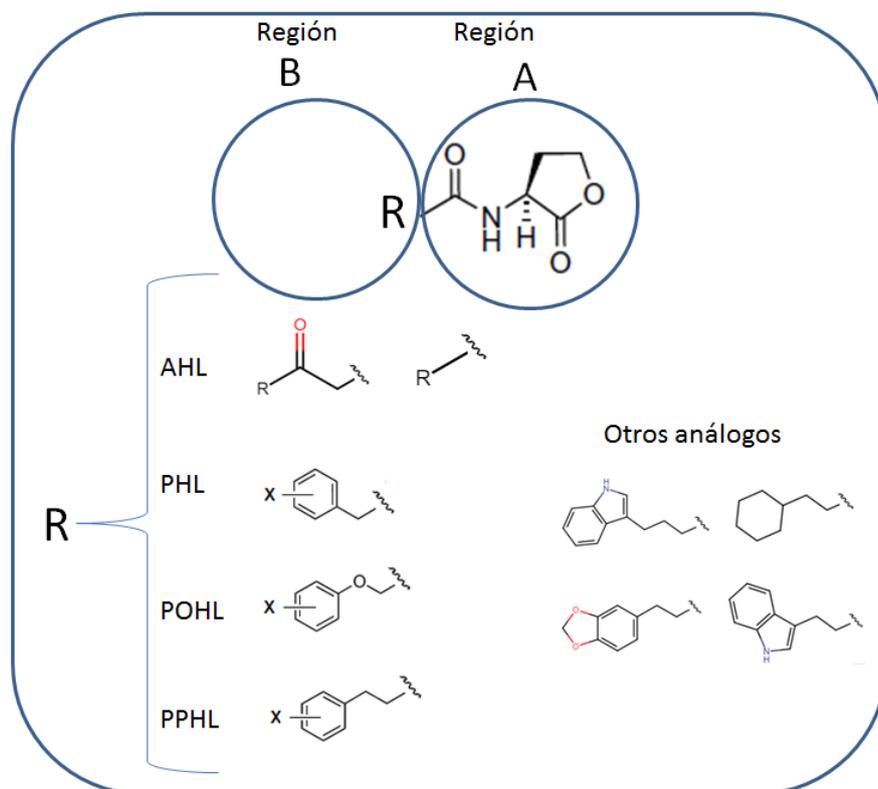


Figura 5.4. División de los análogos en dos regiones. La región A, que es la parte conservada, la cual está formada, por la homoserina lactona y el carbonilo, y la región B, las cadenas laterales variables.

5.2.1. Acoplamiento entre *LasR* y *AHLs* no nativos

El ligando 1 tiene una cadena lateral acilo de 8 carbonos, 4 menos que el ligando nativo (12C), presenta la función oxo en la posición 3 de la cadena acilo, por consiguiente la presencia o ausencia de algunas interacciones en el bolsillo hidrofóbico de *LasR* serán responsables de su actividad, como antagonista o agonista. Los residuos hidrofóbicos Val76, Trp88, Thr115, Leu125 y Ala127 rodean la cola hidrofóbica del ligando 1, a través de contactos de Van der Waals, como se puede observar en la tabla 3 y en la figura 1 en los anexos.

En el ligando nativo la interacción de la cadena lateral acilo con Tyr-47 es un factor determinante para la estabilidad del complejo formado, ya que protege al sitio activo del solvente (Zou and Nair 2009), el ligando 1 no forma esta interacción con *LasR*, la ausencia de esta interacción podría probablemente resultar en un complejo proteína-ligando inestable.

Los ligandos A3 y A4 tienen características estructurales muy similares a él ligando 1, por lo tanto sus interacciones en el bolsillo hidrofóbico de *LasR* serían de la misma naturaleza, ver tabla 3 en los anexos. La disminución de la longitud de la cadena hidrocarbonada de estos ligandos comprometería la integridad de las interacciones hidrofóbicas favorables, como consecuencia, la actividad antagonista de estos tres análogos podría estar relacionada con la inestabilidad del complejo proteína-ligando formado.

5.2.2. Acoplamiento entre *LasR* y otros análogos

El ligando B14 tiene un grupo indol unido a la cadena acilo, el cual le permite formar interacciones con los residuos hidrofóbicos, Leu36, Val 76, Trp88 y Ala127, también puede formar un puente de hidrógeno adicional a través del nitrógeno del indol con Thr75 (ver tabla3 y figura 1 en los anexos), siendo esta interacción importante para el plegamiento del receptor, aunque, no presenta la interacción hidrofóbica con Tyr47, lo cual como se menciona, tiene una función importante en la estabilización de los complejos formados. El ligando B11 presenta un ciclohexil unido a la cadena acilo, siendo de naturaleza hidrofóbica, puede formar interacciones con las cadenas laterales de los residuos, Leu36, Leu40, Ala50, Tyr64, Val 76, Trp88 y Ala127.

El ligando 9 tiene un grupo indol unido a la cadena acilo, y al igual que el ligando B14 puede formar un puente de hidrógeno adicional a través del nitrógeno del indol con Thr75 y además, las interacciones hidrofóbicas con los residuos Leu36, Leu40, Ala50, Tyr64, Val 76, Trp88 y Ala127. Al analizar las estructuras de los ligandos B14 y 9, se evidencia que la diferencia es un grupo metileno adicional en la cadena acilo del ligando 9, pero al comparar sus actividades biológicas, vemos una diferencia muy alta entre estos dos ligandos, ver tabla 5.1, lo que refleja que además de las interacciones tipo puente de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas pueden existir restricciones adicionales, que influyen en la actividad de este grupo de ligandos.

5.2.3. Acoplamiento entre *LasR* y *PHLs*

Los ligandos C10 y C11 solo se diferencian en la posición del átomo de yodo presente en el anillo aromático, ver Tabla 5.1, resulta evidente que los valores

diferentes en la actividad biológica que existe entre estos dos análogos está directamente relacionada a las interacciones que puede formar el átomo de yodo en las posiciones 4 y 3 del anillo aromático respectivamente.

Para el ligando C10 existe la posibilidad de formar una interacción entre el yodo y el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido Tyr-47, tal interacción no se presenta o es muy débil entre el ligando C11 y Tyr-47, este tipo de interacción se conoce como puente de halógeno, son posibles debido a la tendencia que poseen los halógenos a interactuar con los pares de electrones solitarios de átomos de oxígenos pertenecientes a grupos funcionales como por ejemplo, carbonilo, hidroxilo, carboxilato, o grupos fosfatos (Auffinger *et al.* 2004; Lu *et al.* 2009). Un puente de halógeno puede ser definido como interacciones cortas $C-X\cdots O-Y$ (donde $C-X$, es un átomo de yodo, bromo, cloro, enlazado a un átomo de carbono, y $O-Y$ es un grupo carbonilo, hidroxilo, carboxilato cargado o un fosfato), donde la distancia $X\cdots O$ es menor o igual a la suma de los respectivos radios de Van der Waals (Auffinger *et al.* 2004; Lu *et al.* 2009).

Al analizar las distancias y dirección existente entre los átomos implicados, solo sería posible en el ligando C10, esto se puede explicar teniendo en cuenta los radios de Van der Waals de cada átomo implicado en la interacción, el radio de Van der Waals para el Yodo es 1.98 Å y para el Oxígeno es 1.52 Å, por lo tanto la máxima distancia a la que pueden estar separados dichos átomos y exista una posible interacción es 3.5 Å, aunque se ha reportado que cuando los halógenos están unidos a estructuras aromáticas la distancia de interacción puede aumentar un poco (Auffinger *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2009), en la figura 5.5 se muestran las distancias entre estos átomos para los dos ligandos.

Para la mejor pose tomada por el ligando C14 en el sitio de unión de *LasR*, además de formar las interacciones típicas, presentes en la región A de los ligandos, es posible, que dicha pose facilite la formación de otras interacciones, debido al grupo nitro ubicado en la posición 3 del anillo aromático, este toma una orientación tal que pueden existir unas interacciones extras entre el grupo nitro y los residuos Trp-60 y Arg-61, como se muestra en la figura 5.5, además de esto, pueden estar presentes interacciones $\pi-\pi$ entre el anillo aromático del

ligando y el anillo aromático de la Tyr-64, lo que podría ayudar en el plegamiento y formación del complejo.

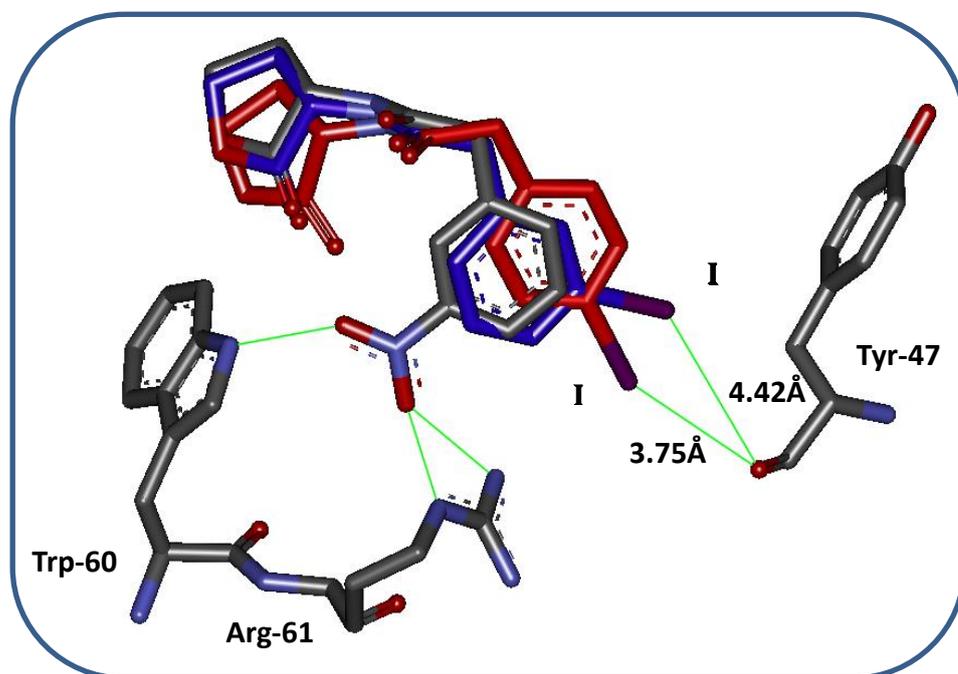


Figura 5.5. Interacciones existentes entre la región B de los ligandos (C10 en rojo, C11 en azul y C14 en gris) PHLs y los residuos, Tyr-47, Trp-60 y Arg-61

Los ligandos 8 y C8 al igual que los ligandos C10 y C11 solo se diferencian en la posición del átomo de bromo en el anillo aromático. Las diferencias en cuanto a la actividad biológica mostrada por los análogos, se explicaría de igual forma que para los ligandos C10 y C11. Los ligandos C6, C8 y C11 presentan una sustitución por un halógeno en la posición 3 del anillo aromático, los halógenos son cloro, bromo y yodo respectivamente, mostrando una ligera tendencia a un mayor valor de IC_{50} a medida que aumenta el tamaño del halógeno.

5.2.4. Acoplamiento entre *LasR* y *POHLs*

La actividad del análogo más activo del grupo *POHLs* es baja comparada con la mostrada por los mejores análogos de los otros grupos. La explicación es la presencia del átomo de oxígeno en la región B de este grupo de ligandos, el cual puede generar una desestabilización en la densidad electrónica del anillo aromático, lo que resultaría en una disminución en la energía de interacción π - π entre el anillo aromático de los ligandos de este grupo y el anillo aromático de

la Tyr-64, sumado a esto la presencia del oxígeno en la cadena lateral, restringe la rotación, por los pares libres que presenta dicho átomo.

Analizando los valores de IC_{50} y los sustituyentes presentes en la posición 4 del anillo aromático de los análogos E20, E21 y E22, podemos apreciar una correlación entre el valor de actividad biológica y el tamaño del átomo del halógeno presente. Observamos que a medida que descendemos por el grupo de los halógenos los valores de IC_{50} se hacen más pequeños en estos tres ligandos, como se puede apreciar en la Tabla 5.1. Además se encuentra una tendencia con los valores de energía de unión reportados para *Autodock*, donde reportan energías de -8.04, -8.06 y -8.26 kcal/mol respectivamente. Las diferencias en los radios de Van der Waals del átomo de halógeno presente en cada ligando está relacionado con la posible interacción tipo puente de halógeno, que existe entre cada halógeno y el oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47.

Como es sabido el radio de Van der Waals aumenta a medida que se desciende por un grupo en la tabla periódica, $I > Br > Cl$, sus valores son 1.98 Å, 1.85 Å, y 1.75 Å, respectivamente. Comparando las distancias X----O, con las presentes en nuestros complejos podemos suponer que las interacciones son posibles y por lo tanto son importantes en nuestros complejos, ver figura 5.6. Por otra parte, el ligando E16 posee un sustituyente metilo en posición 3 del anillo aromático, dicho sustituyente, solo puede formar pequeñas interacciones hidrofóbicas, las cuales no son tan fuertes comparadas con las interacciones tipo puente de halógeno presentes en otros ligandos.

El ligando D15, tiene como sustituyente en la posición 4 del anillo aromático, el trifluorometoxi, el cual permite la existencia de posibles interacciones entre el oxígeno del sustituyente y el residuo Arg-61, por su parte los átomos de flúor, quizás ayuden a establecer alguna interacción con Tyr-47.

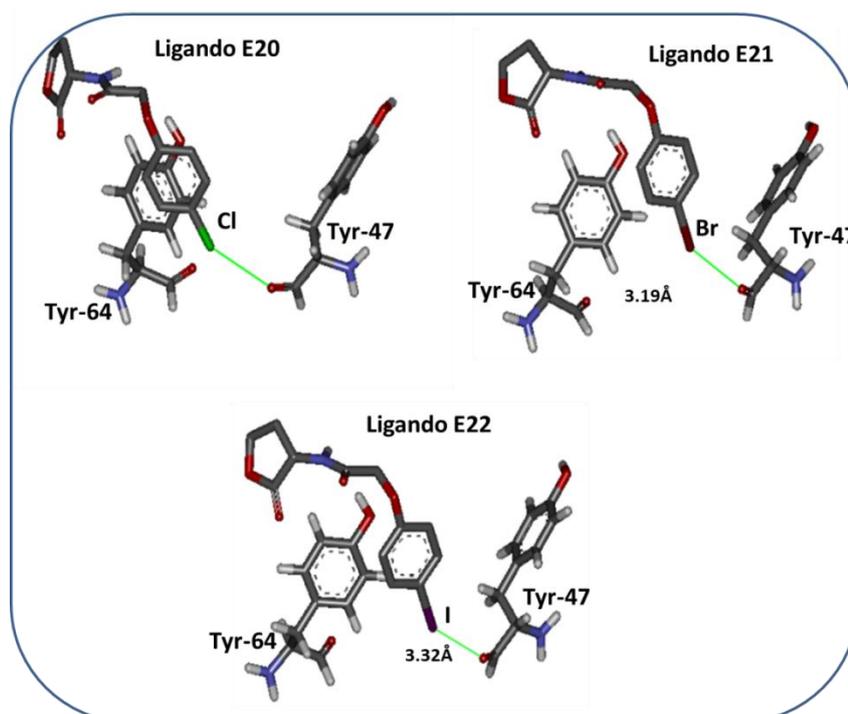


Figura 5.6. Puentes de halógenos presentes en los ligandos E20, E21 y E22. En todos los casos la suma de los radios de Van der Waals, de los átomos involucrados en puentes de halógeno, excede la distancia mostrada en el figura.

5.2.5. Acoplamiento entre *LasR* y *PPHLs*

Los ligandos que pertenecen al grupo *PPHLs* son varios, por tal motivo, solo describiremos las relaciones estructura actividad más importantes existentes entre algunos de ellos. El ligando B7 tiene al átomo de bromo en la posición 4 del anillo aromático, mientras el ligando E31 en la posición 3 del anillo aromático. Se evidencia la misma tendencia en cuanto a la actividad antagonista, a la encontrada en los ligandos C10 y C11, donde la sustitución en la posición 4, resulta con mejores actividades, que las encontradas en los análogos con la sustitución en la posición 3, además los valores reportados de energía de unión por *Autodock* -8.67 y -8.53 kcal/mol, respaldan estas tendencias.

La interacción entre el átomo de bromo de los ligandos y el oxígeno del grupo carbonilo del residuo Tyr-47, solo es posible cuando el átomo de bromo está en la posición 4 del anillo aromático del ligando, tal interacción no es posible cuando el bromo está en la posición 3 del anillo aromático, ya que la distancia entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47 y el átomo de bromo

es 4.49 Å mucho mayor que la suma de sus radios de Van der Waals 3.37 Å. Mientras que en el ligando B7, la distancia entre dichos átomos es aceptable como se muestra en la Figura 5.7.

Si observamos los valores de IC_{50} de los ligandos E29, E30 y B7, nos percatamos que existe la misma tendencia, que se presentaba en los ligandos E20, E21 y E22, en la cual los ligandos que tenían al átomo de halógeno con mayor tamaño atómico presentaban el menor valor de IC_{50} , y de igual forma con los valores de energía de unión reportadas por *Autodock* -7.87, 8.32 y 8.67 Kcal/mol. En el caso de los ligandos E29, E30 y B7 los halógenos presentes en la posición 4 del anillo aromático son flúor, cloro y bromo respectivamente. Si analizamos las propiedades de los halógenos, notamos que el flúor es un átomo pequeño y muy electronegativo por tal motivo se espera que sea poco polarizable por influencia del anillo aromático.

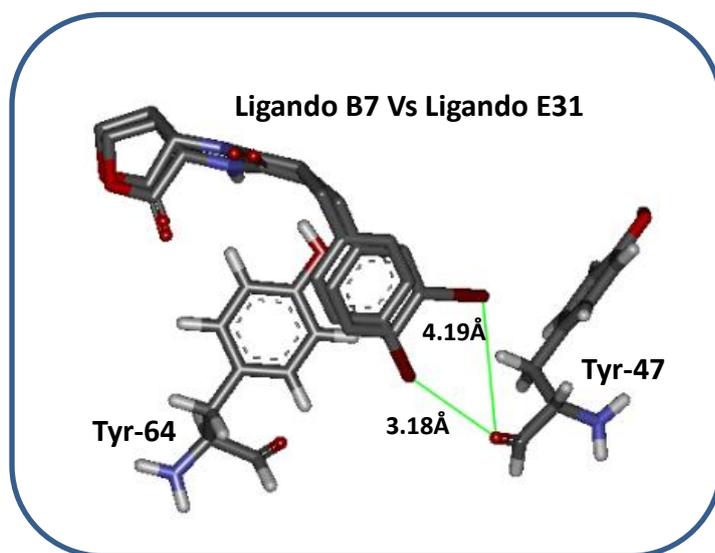


Figura 5.7. Las distancias existentes entre el átomo de bromo y el átomo de oxígeno del residuo Tyr-47, es mayor, cuando el sustituyente se encuentra en la posición 3 del anillo, por tal motivo no puede existir una interacción muy fuerte entre estos átomos.

Por el contrario debido a su gran electronegatividad tiene la capacidad de deslocalizar la densidad electrónica del anillo afectando su aromaticidad, lo cual afecta la interacción entre el anillo del ligando y el anillo de la Tyr-64. Además al no ser polarizable es poco probable que exista una interacción

entre el átomo de flúor y los electrones del oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47. Las superficies de potencial electrostático molecular, en este caso basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals, explican de manera sencilla este fenómeno presente en estos tres ligandos en estado libre.

En esta figura 5.8 se puede observar como el átomo de flúor retiene su carácter electronegativo en azul, mientras en los otros sustituyentes se ve disminuido este carácter electronegativo, debido a sus radios atómicos más grandes o a la polarizabilidad del halógeno, mostrando un ligero carácter electropositivo, de color blanco a amarillo, lo cual sugiere que el átomo de bromo puede formar puentes de halógenos más fuertes. Esto se debe a que existe una transferencia de carga negativa del átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47 (una base Lewis) a los halógenos más polarizables (ácido Lewis).

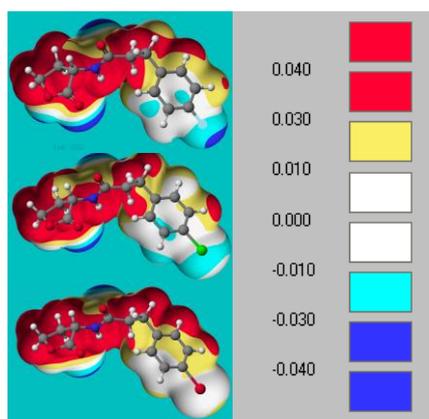


Figura 5.8. Superficie de potencial electrostático, basados en la densidad electrónica y los radios de Van der Waals.

Por otro lado el átomo de bromo es muy polarizable por lo tanto puede formar interacciones electrostáticas fácilmente con los electrones del oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47, además la distancia presente entre los átomos anteriormente mencionados es menor que la suma de sus radios de Van der Waals, lo que ratifica que esta interacción puede existir en este complejo, Figura 5.9.

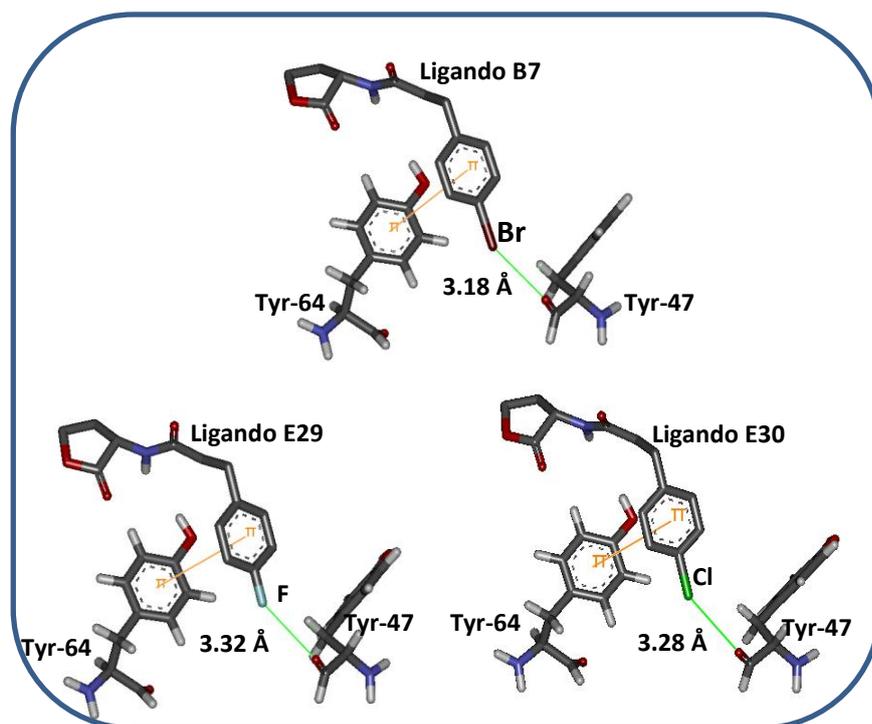


Figura 5.9. Puentes de halógenos presentes en los ligandos B7, E29 y E30. En todos los casos la suma de los radios de Van der Waals, de los átomos involucrados en puentes de halógeno, excede la distancia mostrada en el figura.

Estos comportamientos tomados por los halógenos en presencia del anillo aromático puede ser la causa de la tendencia encontrada en su actividad antagonista y a los valores reportados por *Autodock*, para estos tres análogos.

Los resultados han mostrado algunas tendencias generales en los 28 ligandos, en relación al sustituyente y a la posición de este en el anillo aromático. Al comparar ligandos que presentan el mismo sustituyente pero en diferente ubicación sobre el anillo aromático, los que presentan la sustitución en la posición 4, tienen en general mayor actividad antagonista que los que poseen la sustitución en la posición 3 del anillo aromático, esto se refleja en su valor de IC_{50} .

5.3. 3D-QSAR

Se utilizaron dos metodología para generar los modelos 3D-QSAR, 3D-QSAR basado en el alineamiento de las estructuras optimizadas y 3D-QSAR basado en el receptor (Sipl, 2000), donde las mejores poses del acoplamiento molecular son usadas para generar un alineamiento instantáneo, se

compararon los modelos creados, para identificar cual presenta una mejor correlación y un mejor poder de predicción.

5.3.1. Resultados estadísticos del COMFA

Para el alineamiento basado en el ligando, se tomó como molécula plantilla para el alineamiento el ligando 1, debido a que es el análogo con mejor actividad biológica (pIC_{50}), mientras que para el alineamiento basado en el receptor se tomaron las mejores poses generadas en acoplamiento molecular de cada uno de los ligandos, esto es, las conformaciones más estables energéticamente. La figura 5.10 muestra la superposición de todos los ligandos para los alineamientos, basado en el ligando y en el receptor respectivamente.

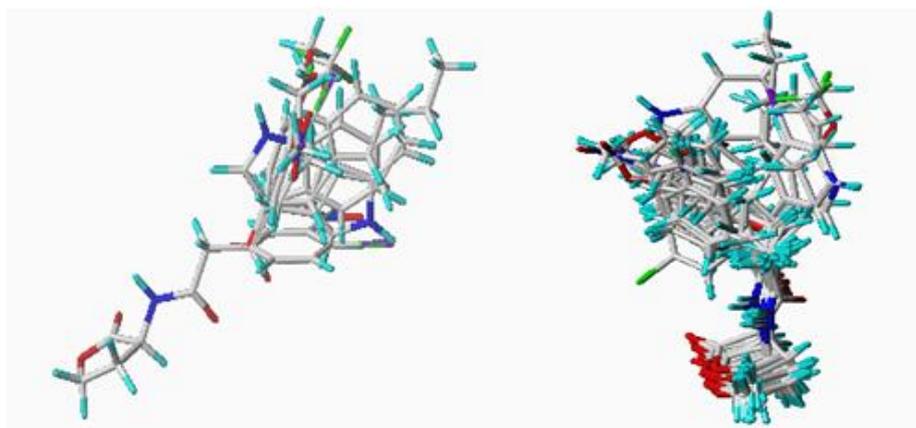


Figura 5.10. Alineamiento estructural. (Izquierda) basado en el ligando. (Derecha) basado en el receptor (Docking)

Los resultados obtenidos del análisis PLS para cada uno de los modelos son mostrados en la tabla 5.3, se obtiene para el modelo basado en el ligando un valor de Q^2 de 0.509, y un R^2 con validación cruzada de 0.866, mientras que para el modelo basado en el receptor, el Q^2 fue de 0.553, y un $R^2= 0.967$, en consecuencia el modelo basado en el receptor, a quien llamaremos modelo 2 muestra mayor confianza estadística que el modelo 1 (basado en el ligando).

La tabla 5.4 muestra la actividad experimental vs la predicha, calculada por los modelos, aquí se observa que la dispersión residual de los datos para el modelo 2 es menor que para el modelo 1, lo que comprueba que el modelo 2 posee mayor poder de predicción.

Tabla 5.3. Datos estadísticos para los modelos CoMFA

Resultados estadísticos	CoMFA	
	Modelo basado en el ligando	Modelo basado en el receptor
Q ²	0.509	0.553
R ²	0.866	0.967
SEE	0.199	0.099
Probabilidad of R ² =0	0.000	0.000
F	22.653	103.205
Componentes	6	6
Fracción Estérica (%)	0.691	0.687
Fracción Electroestática (%)	0.309	0.313

Tabla 5.4. Actividades predichas vs experimentales para modelos CoMFA

Ligandos	Experimental pIC ₅₀ (M)	Modelo basado en el Ligando		Modelo basado en el Ligando Receptor	
		predicho pIC ₅₀ (M)	Residuo	predicho pIC ₅₀ (M)	Residuo
1	6,96	6,875	0,085	6,933	0,027
8	5,41	5,382	0,028	5,469	-0,059
9	5,08	5,12	-0,040	5,065	0,015
A3	5,76	5,787	-0,027	5,687	0,073
A4	6,60	6,718	-0,118	6,783	-0,183
B7	6,47	5,937	0,533	6,311	0,159
B11	5,76	5,369	0,391	5,731	0,029
B14	6,08	6,224	-0,144	6,079	0,001
C6	5,40	5,387	0,013	5,359	0,041
C8	5,39	5,309	0,081	5,348	0,042
C10	5,76	5,709	0,051	5,679	0,081
C11	5,33	5,341	-0,011	5,353	-0,023
C14	6,21	6,316	-0,106	6,199	0,011
D15	5,33	5,387	-0,057	5,291	0,039
E16	5,11	5,02	0,090	5,136	-0,026
E20	5,33	5,525	-0,195	5,383	-0,053
E21	5,68	5,603	0,077	5,66	0,020
E22	5,70	5,668	0,032	5,69	0,010
E26	5,37	5,603	-0,233	5,519	-0,149
E27	5,05	5,346	-0,296	5,251	-0,201
E28	5,17	5,116	0,054	5,119	0,051
E29	4,92	5,168	-0,248	5,016	-0,096
E30	5,66	5,669	-0,009	5,539	0,121
E31	5,48	5,57	-0,090	5,406	0,074

E33	5,74	5,528	0,212	5,828	-0,088
E37	5,52	5,628	-0,108	5,506	0,014
E38	5,47	5,42	0,050	5,353	0,117
E39	5,47	5,484	-0,014	5,519	-0,049

En la figura 5.11 se puede apreciar que si existe un buen modelo de ajuste, los puntos se alinean a lo largo de la línea diagonal, por lo que a pesar de que existe una buena correlación para el modelo basado en el ligando ($R^2 = 0.866$), la predicción del modelo basado en el receptor es mejor ($R^2 = 0.967$), lo que corrobora los datos calculados por el campo CoMFA.

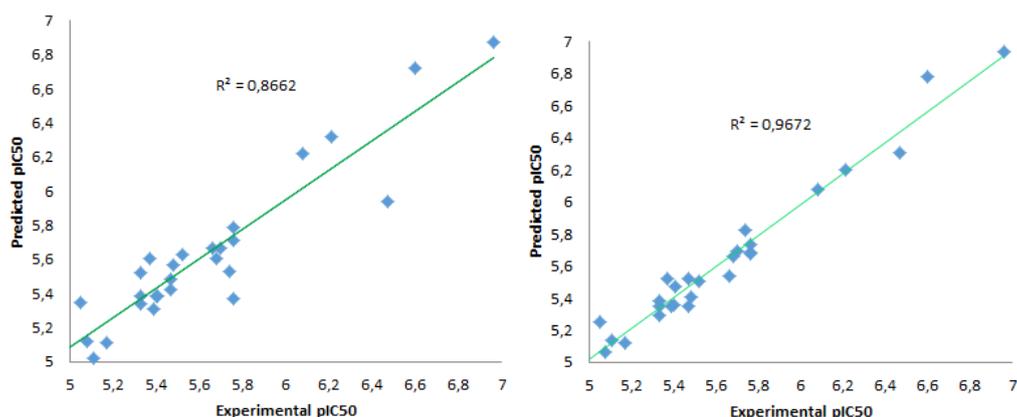


Figura 5. 11. Actividad calculada vs experimental obtenida por análisis PLS usando CoMFA. (a) modelo basado ligando (b) modelo basado receptor

Para validar los modelos 3D-QSAR construidos, además de la validación interna realizada, se realizó una validación externa. La Figura 5.12 muestra los cinco compuestos que se usaron para la validación externa. Sus valores de pIC_{50} variaron entre 4.50 y aproximadamente 7.00 y sus actividades biológicas se predijeron de la misma manera que para los modelos de CoMFA. Como se observa en la Tabla 5.5, la desviación media obtenida de los valores de pIC_{50} del estudio fue de 0,93 para el modelo basado en ligandos y de 0,99 para los basados en el receptor, lo que sugiere que el modelo 2 tiene una mayor poder de predicción que el modelo 1, por lo que se puede utilizar para hacer la predicción de afinidades de nuevos compuestos estructuralmente similares a las AHLs antes de su síntesis.

Un modelo QSAR puede ser estadísticamente valido pero no puede ser usado para predecir la variable dependiente para el universo entero de compuestos.

Predicciones confiables se obtendrán sólo para aquellos compuestos que estén dentro del dominio de aplicación del modelo QSAR, por ende este modelo solo tiene poder predictivo para análogos estructurales de las AHLs. Aun así el modelo basado en el receptor sería útil para hacer predicciones de actividades biológicas para análogos de las AHLs que se estén ensayando en otros receptores de la familia LasR, teniendo en cuenta que el sitio activo de esta familia de proteínas es conservado.

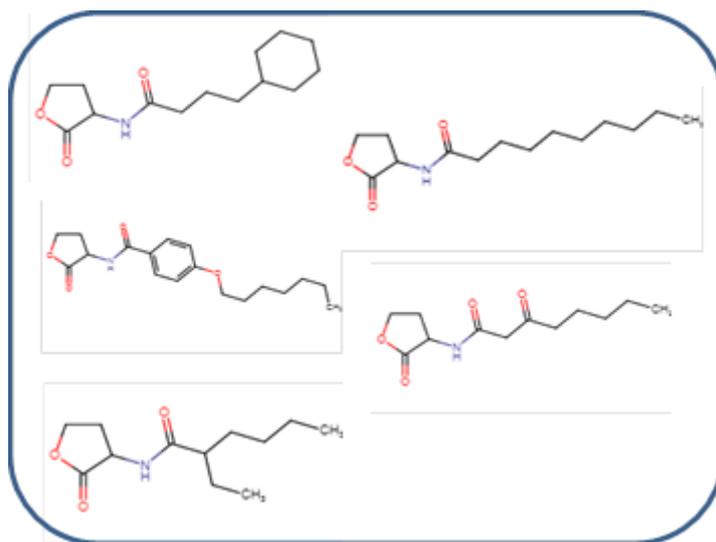


Figura 5.12. Conjunto de ligandos usados para la validación externa

Tabla 5.5. Actividades experimentales vs las predichas de las moléculas del conjunto de prueba.

Conjunto de prueba	pIC ₅₀ (M) Experimental	Ligand-based model		Receptor-based model	
		pIC ₅₀ (M) Predicho	Residuo	pIC ₅₀ (M) Predicho	Residuo
6	6,60	6,970	-0,370	6,588	0,012
OOHL	6,96	6,615	0,345	6,933	0,027
R6	6,00	5,950	0,050	5,986	0,014
S1	4,54	4,830	-0,290	4,587	-0,047
S7	5,00	5,082	-0,082	5,086	-0,086
CoMFA R ²		Valor Promedio residual: 0,927		Valor promedio residual: 0,994	

La figura 5.13 muestra los mapas o gráficos de contorno estéricos y electrónicos para el ligando B7 en los modelos CoMFA basado en el ligando (modelo 1) y basado en el receptor (modelo 2), este ligando tiene una buena actividad biológica inhibitoria contra el receptor LasR.

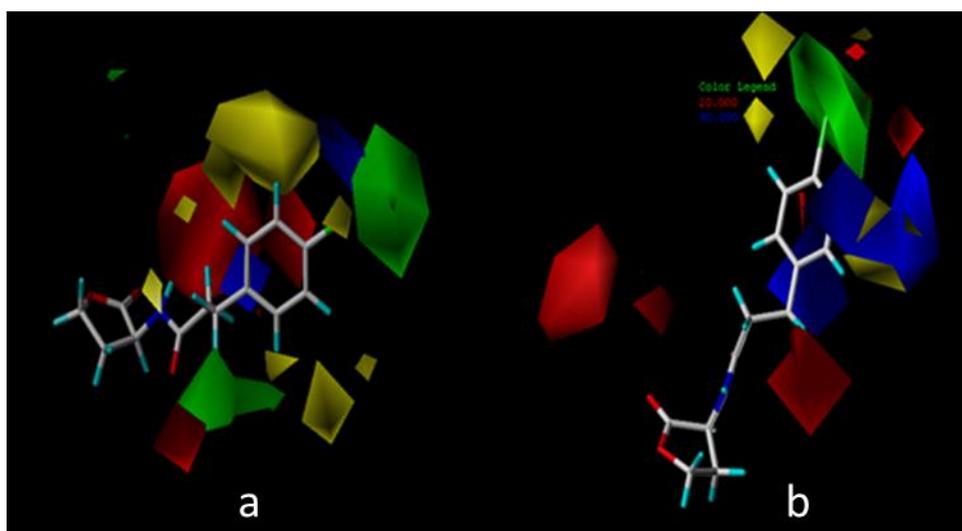


Figura 5.13. Mapas de contorno 3D CoMFA. Campos estéricos. (Verde: Estéricamente favorable; amarillo: Estéricamente desfavorable) Campo electrostático. (Rojo: potencial negativo favorable; azul: potencial negativo desfavorable). (a) Basado en el ligando (b) basado

La contribución estérica está definida por los mapas de contornos de color verde, los cuales representan regiones de alta tolerancia estérica (contribución del 80%), mientras que los mapas de contornos de color amarillo representan regiones de efecto estérico desfavorables (20% de contribución). La contribución electrostática se define por mapas de contornos de color azul que representan las regiones donde los grupos con carga positiva aumentan la actividad (80% de contribución) y los contornos de color rojo donde los grupos con carga negativa mejoran la actividad (20% de contribución).

Podemos observar que para el ligando B7 utilizado para ilustrar los mapas de contorno CoMFA, para ambos modelos las regiones favorecidas estéricamente coinciden en posiciones cercanas al átomo de cloro (Cl), esto es debido a que la alta electronegatividad de esta región favorece las interacciones con los residuos de aminoácidos que posean cargas parcialmente positivas en sus estructuras, o si lo analizamos desde el punto de vista de la interacciones tipo puentes de halógenos existieran interacciones con residuos que presenten átomos de oxígeno, mientras que las más desfavorecidas como era de esperarse, coinciden a lo largo del anillo de benceno, por lo que grupos R con bastante volumen no podrían incluirse en estas zonas, ya que probablemente disminuiría la actividad.

Las regiones con carga positiva que favorecen el campo electrostático se pueden observar que están sobre la mayoría de los átomos de hidrógeno, y esto trae consigo el aumento de la actividad contribuida en esta zona debido a que estos pueden formar enlaces de hidrógeno que son de vital importancia en el estudio de interacciones ligando-proteína, mientras que los grupos funcionales polarizados como el carbonilo (C=O) favorecen las regiones electrostáticas con contribuciones de carga negativa y por lo tanto incluir posibles grupos funcionales fuertemente polarizados en esta zona podría ser una alternativa para potenciar las interacciones en el sitio activo de *LasR*, mejorando la actividad biológica del compuesto estudiado.

5.4. Simulaciones de dinámica molecular

Los resultados del acoplamiento molecular solo nos permiten realizar un análisis estático de las interacciones entre la proteína y los análogos. Por lo tanto para tener un visión dinámica de nuestro sistema, se tomaron los complejos más estables de los resultados del acoplamiento molecular y se realizaron simulaciones de dinámica molecular de 150ns para cada complejo, con el objetivo de analizar la estabilidad de los complejos, los cambios conformacionales y las interacciones tipo puente de hidrógeno presentes en los complejos proteína-ligando durante toda la simulación, y por último se calculó la energía libre de unión para cada uno de los complejos.

5.4.1. Análisis del RMSD

La variación del RMSD frente al tiempo de la simulación para todos los complejos es mostrada en la figura 2 en los anexos. Los gráficos muestran que la mayoría de estos sistemas están en equilibrio la mayor parte del tiempo de la simulación de DM, lo que indica la racionalidad y validez del acoplamiento molecular. El RMSD de los complejos formados por los cinco análogos con mejor actividad antagonista y el ligando nativo se muestran en la figura 5.14.

El complejo *LasR*-nativo mostró estabilidad durante los primeros 40 ns, con variaciones entre 1.1 y 1.5 Å, luego un ligero aumento de 1.5 y 2.5 Å entre 50 y 110ns, después de eso fue estable con un RMSD de 1.5 Å.

El RMSD promedio del complejo *LasR*-nativo fue de 1.58 Å con una SD de 0.25 Å. El RMSD del complejo *LasR*-ligando1 revela que fue relativamente

constante durante 150ns de la simulación con un valor aproximado de 1-1.5 Å, solo presenta un ligero cambio alrededor de los 25ns de simulación, en el que supera los 1.5 Å, el valor promedio del RMSD y su desviación estándar fue 1.36 ± 0.14 Å. El RMSD para el complejo LasR-ligandoB7 inicialmente mostró un ligero aumento durante los primeros 95 ns con variaciones entre 0.5 y 2 Å, luego fue constante durante el resto de la simulación, el RMSD promedio y la desviación estándar para este complejo fue de 1.57 ± 0.30 Å.

El RMSD del complejo LasR-ligandoB14 inicialmente presento un aumento durante los primeros 55 ns con variaciones entre 0.5 y 1.9 Å, y luego mostró un ligero descenso a 1.2 Å, seguido de una fluctuación moderada después de 90 ns de la simulación, el RMSD promedio y la desviación estándar para este complejo fue 1.51 ± 0.23 Å. El RMSD del complejo LasR-ligandoC14 inicialmente presenta un aumento durante los primeros 50 ns de la simulación con variaciones entre 1.2 y 2.2 Å, y luego fue constante durante el resto de la simulación con un RMSD promedio de 1.64 Å y una desviación estándar de 0.23 Å. El RMSD del complejo LasR-ligandoE22 reveló que el complejo fue relativamente constante durante 150ns de la simulación, el RMSD promedio fue de 1.4 ± 0.17 Å.

Los bajos valores de RMSD mostrados por los cinco complejos durante la simulación, permiten concluir que los cinco complejos presentan una buena estabilidad y los diferentes cambios conformacionales presentes se deben a la naturaleza de las interacciones presentes en cada complejo, las cuales son responsables de la estabilización de los complejos proteína-ligando.

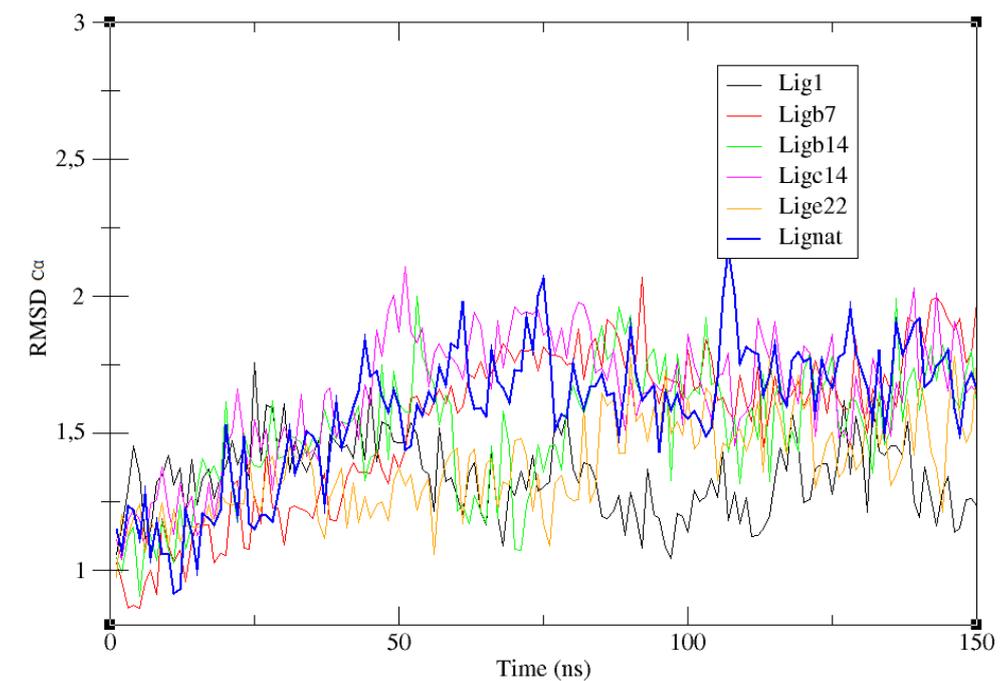


Figura 5.14. RMSD de complejos proteína-ligando durante la simulación en función de la escala de tiempo. El eje X representa la escala de tiempo en nanosegundos y el eje Y representa el RMSD en Angstrom.

5.4.2. Análisis del RMSF

Para comprender las variaciones conformacionales de cada residuo, se calculó el RMSF (Root Mean Square Fluctuation) con respecto al tiempo de simulación. El RMSF para el complejo LasR-nativo mostró que los residuos que sufren fluctuaciones considerables, son los presentes las regiones de bucle, estos resultados se pueden corroborar con lo reportado sobre estructura de este complejo en el PDB (Bottomley et al., 2007; Zou & Nair, 2009b).

El complejo LasR-nativo presento un promedio de fluctuación de 0,88 Å con una SD de 0,54 Å, las mayores fluctuaciones se observaron en los residuos Phe7 (2,07 Å), Asp43 (2,34 Å), Gln45 (2,54 Å), Glu168 (3,37 Å) y His169 (5.15 Å). Para el complejo LasR-Ligando1 se encontró una fluctuación promedio de 0,73 Å con una SD de 0,36 Å, algunos residuos como, Phe7 (1,72 Å), Asp43 (1,67 Å), Glu168 (2,19 Å) e His169 (3,45 Å), presentan fluctuaciones considerables. El complejo LasR-ligandoB7 presento una fluctuación promedio de 0,87 Å con una SD de 0,43 Å, los residuos de aminoácidos que exhibe

mayor fluctuación son Phe7 (1,84 Å), Lys42 (2,51 Å), Asp43 (2,86 Å), Glu45 (1,92 Å), Glu94 (1,84 Å) e His169 (3,05 Å).

El complejo LasR-ligandoB14 mostró una fluctuación promedio de 0,90 Å con una SD de 0,45 Å, algunos residuos de aminoácidos que incluyen Phe7 (2,62 Å), Asp43 (1,87 Å), Glu45 (2,43 Å), Asp46 (2,50 Å), Tyr47 (1,98 Å), Glu48 (2,66 Å), Asn49 (2,15 Å), Glu168 (2,17 Å) e His169 (3,45 Å) han mostrado un mayor valor de fluctuación. El complejo LasR-ligandoC14 presento una fluctuación promedio de 0,87 Å con una SD de 0,42 Å, los residuos de aminoácidos que exhibe mayor fluctuación son Phe7 (2,23 Å), Lys42 (1,89 Å), Asp43 (2,06 Å), Asp46 (2,07 Å), Tyr47 (2,06 Å), Glu48 (2,60 Å), Glu49 (2,17 Å) Arg122 (2,08 Å) e His169 (1,87 Å). Para el complejo LasR-ligandoE22 se encontró una fluctuación promedio de 0.78 Å con una desviación estándar de 0.37 Å, algunos residuos de aminoácidos muestran fluctuación considerable, que incluye Phe7 (2.88 Å), Gln45 (2.04 Å) e His169 (2.61 Å).

En general, los aminoácidos que muestran mayor fluctuación están lejos del sitio activo del receptor LasR y corresponden a las regiones de bucles y giros beta, y además, no están implicados en las interacciones con los análogos. Analizando la figura 5.15 vemos que los ligandos B14 y C14 presentan una fluctuación considerable en el aminoácido Tyr47, mencionado con anterioridad como un residuo importante para la estabilidad del complejo proteína-ligando formado. En las figuras 5.16 y 5.17 se muestran los alineamientos del sitio activo de LasR y su ligando nativo versus el sitio activo de LasR y dos antagonistas, y sitio activo de LasR y su ligando nativo versus del sitio activo de LasR y dos agonistas, respectivamente. En la figura 5.16 se observa que los residuos Tyr47 en los complejos formados por los antagonistas adoptan conformaciones muy diferentes a la mostrada por la Tyr47 del complejo formado con el ligando nativo. Mientras que, en la figura 5.17 se observa que los residuos Tyr47 en los complejos formados por los agonistas adoptan conformaciones muy similares a la mostrada por la Tyr47 del complejo formado con el ligando nativo. Estos dos resultados son importantes para explicar la posible actividad agonista y antagonista de este grupo de ligandos.

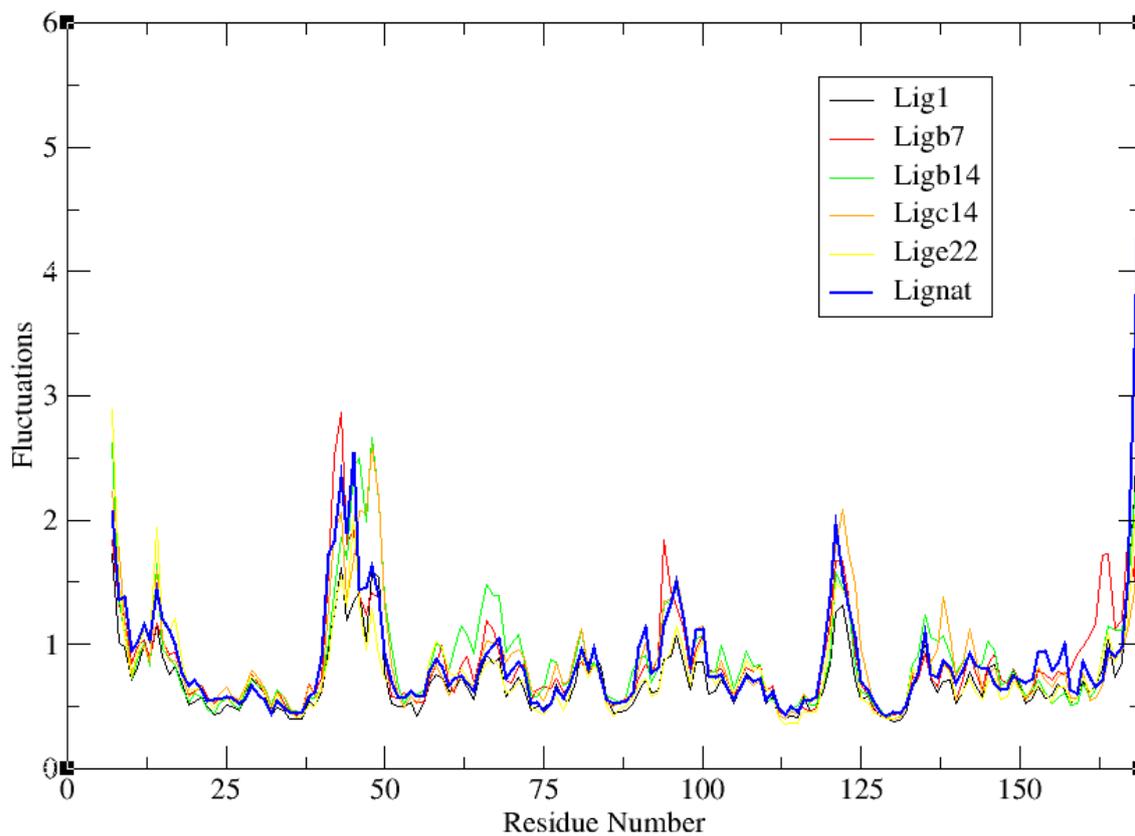


Figura 5.15. RMSF de los complejos proteína-ligando durante los 150ns de simulación. El eje X representa número del residuo y el eje Y representa el RMSF del átomo C α en Angstrom.

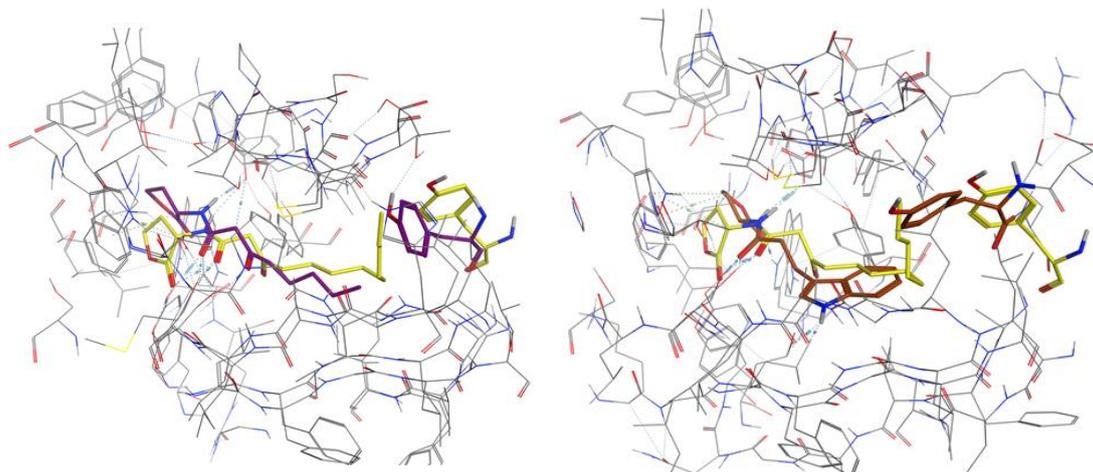


Figura 5.16. Alineamiento del sitio activo de ligando nativo vs dos antagonistas (ligando 1 y ligando B7). En las dos imágenes el ligando nativo esta en amarillo al igual la Tyr47.

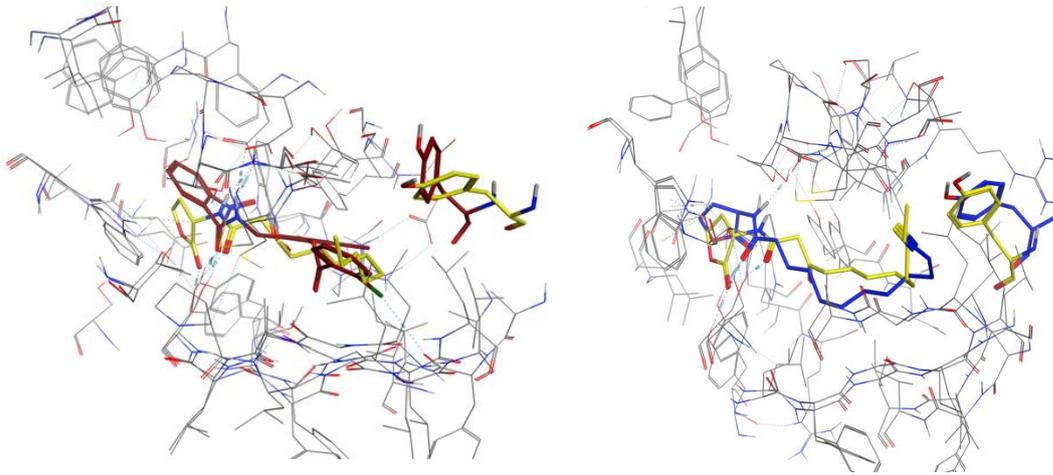


Figura 5.17. Alineamiento del sitio activo de ligando nativo vs dos agonistas (ligando 11 y ligando TP1). En las dos imágenes el ligando nativo está en amarillo al igual que la Tyr47. Ligando 11, (Amara et al., 2009), ligando TP1, (Müh et al., 2006).

5.4.3. Puentes de hidrógeno

Las interacciones tipo puente de hidrógeno intermoleculares desempeñan un papel vital en la estabilización de los complejos proteína-ligando, las propiedades de estas interacciones son importantes en los procesos de optimización y diseño fármacos, debido a su fuerte influencia sobre, la especificidad, metabolización y adsorción del fármaco. Por esta razón, es importante estudiar la estabilidad de los puentes de hidrógeno formados a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos.

El análisis de la simulación de DM del complejo LasR-nativo reveló interacciones estables tipo puente de hidrógeno entre los grupos amida y carbonilo del ligando con los aminoácidos Trp60, Asp73, Ser129 y Tyr56 durante la mayor parte de la trayectoria, con un promedio de formación de 8.9%, 50.6%, 24.8% y 34.7% respectivamente, en el total de todas las conformaciones (*snapshots*) presentes en la simulación.

En los complejos formados por los análogos más activos, se encontraron cinco puentes de hidrógeno a lo largo de la simulación, lo que indica que los grupos amida y carbonilo de los análogos forman y mantienen puentes de hidrógeno estables con *LasR* en condiciones dinámicas.

En la tabla 5.6, se encuentran los porcentajes promedios de los puentes de hidrógeno durante toda la simulación, para los cinco ligandos más activos.

Es importante resaltar la interacción entre el grupo carboxilato de Asp73 y el grupo amida de los análogos, y la interacción entre Tyr56 y el grupo carbonilo en la posición 1 de la cadena acilo, estas interacciones están presentes con un porcentaje considerablemente alto en los 5 complejos estudiados, en este mismo sentido, pero en menor porcentajes están las interacciones con Trp88 y Ser129.

Tabla 5.6. Porcentaje de existencia de los puentes de hidrógeno en los ligandos más activos durante los 150 ns de simulación

Aminoácidos	Ligando nativo	Ligando 1	Ligando B7	Ligando B14	Ligando C14	Ligando E22
Trp60	8.9%	29.5%	51.3%	34%	40.8%	21.2%
Asp73	50.6%	80.1%	7%	89.8%	44.6%	67.7%
Ser129	24.8%	50.7%	40%	75.3%	28.9%	51.6%
Tyr56	34.7%	58.7%	67.59%	77.9%	50.1%	77.8%
Thr75	3.7%	1.2%	40%		4.2%	

Estos puentes de hidrógeno ya han sido previamente identificados en la sección de acoplamiento molecular, en un sistema estático, con los análisis de la estabilidad de los puentes de hidrógeno, podemos asegurar que nuestros análogos efectivamente se unen en el sitio de unión del receptor y forman puentes de hidrógeno estables en un alto porcentaje de las conformaciones presentes a lo largo de la simulación. Los resultados resaltan la importancia de los residuos Asp73 y Tyr56 en el reconocimiento molecular inicial por parte de LasR hacia los grupos amida y carbonilo de los análogos con actividad anti-quórum sensing. Los residuos Trp88 y Ser129 ayudarían posteriormente a continuar el acoplamiento y junto a las interacciones en el bolsillo hidrofóbico terminarían con la formación del complejo.

5.5. Cálculo de energías libres de unión mediante MM-PBSA y MM-GBSA.

Se calcularon las energías libres de unión para los 28 análogos y para el ligando nativo utilizando los métodos MM-PBSA/MM-GBSA, estos calculan para una serie de *snapshots* (conformaciones tomadas de la simulación DM), la energía promedio de interacción y energía libre de solvatación para el

complejo, receptor y ligando, para obtener una estimación de la energía libre de unión.

Un resumen de los valores de la energía libre calculado se encuentra en la Tabla 5.7. Los valores de energía libre negativos, demuestran que la unión de esos análogos a LasR es favorable y espontánea, excepto para C11, estudios recientes reportan la unión de antagonistas al receptor LasR y la estabilización del complejo formado, pero con una conformación incapaz de unirse al ADN, además en este estudio también se demostró que esa unión LasR-antagonista es reversible (Suneby et al., 2017).

Tabla 5.7. Energía libre de unión calculada por la metodología MM/GBSA y MM/PBSA

Ligandos	ΔE_{elec}	ΔE_{vdW}	$\Delta E_{binding-gas}$	MMGBSA (kcal/mol)	MMPBSA (kcal/mol)
1	-53.1793	-39.0770	-92.2563	-47,2279	-9,7733
8	-40.1319	-36.8473	-76.9791	-41,6262	-4,3737
9	-47.6707	-44.4083	-92.0791	-51,4367	-10,8828
A3	-42.6704	-39.8755	-82.5459	-47,4342	-12,6326
A4	-35.4596	-44.3387	-79.7983	-48,2015	-8,9187
B7	-39.4204	-41.3744	-80.7949	-47,2908	-9,7606
B11	-29.2458	-41.9842	-71.2300	-39,2321	-2,5850
B14	-45.8264	-43.8945	-89.7210	-51,1977	-12,4823
C6	-45.2907	-36.6194	-81.9102	-42,7897	-8,6125
C8	-42.9283	-38.5817	-81.5100	-44,2400	-6,5320
C10	-39.5103	-37.3963	-76.9067	-41,1468	-6,2773
C11	-34.2241	-40.8230	-75.0471	-40,1853	0,7052
C14	-44.6347	-41.8409	-86.4756	-44,4179	-5,0563
d15	-55.2127	-46.5674	-101.7802	-55,7456	-18,9520
E16	-54.4313	-40.7308	-95.1621	-50,2927	-15,7790
E20	-53.0304	-41.0206	-94.0511	-49,8397	-13,4949
E21	-53.7240	-42.8272	-96.5512	-53,1478	-15,5106
E22	-48.6160	-42.8302	-91.4462	-50,7471	-10,5975
E26	-42.5315	-41.0105	-83.5420	-48,2651	-10,0004
E27	-42.5237	-40.3636	-82.8873	-47,7183	-9,0055
E28	-43.6176	-42.6941	-86.3117	-49,0658	-7,6658
E29	-27.6670	-37.9335	-65.6005	-37,1552	-3,1411
E30	-39.0626	-39.7147	-78.7772	-46,0560	-7,8398
E31	-41.3493	-40.9594	-82.3086	-47,5512	-9,5349
E33	-39.4217	-43.9086	-83.3302	-49,9470	-13,0360
E37	-42.8771	-45.7177	-88.5948	-50,4969	-10,5759
E38	-47.1764	-42.9288	-90.1052	-44,6300	-6,0133
E39	-40.8111	-42.8412	-83.6524	-45,7511	-9,1049
Nativo	-38.9490	-50.3015	-89.2504	-53.1204	-9.3071

Un análisis detallado de las contribuciones energéticas muestra que las interacciones de Van der Waals (Evdw) podrían explicar la actividad antagonista de estos análogos. Al analizar y comparar las energías de Van der

Waals para los 28 ligandos y comparar con la reportada para el ligando nativo se evidencia que ninguno tiene una energía menor a la del ligando nativo, esto es debido que el ligando nativo forma muchas interacciones en el bolsillo hidrofóbico, en especial la interacción con Tyr47, siendo este residuo de vital importancia para la estabilidad del complejo formado, permitiendo la homodimerización de LasR y posterior unión al ADN.

Los 28 análogos forman interacciones hidrofóbicas, y algunos de estos análogos forman interacciones tipo puente de halógeno con Tyr47, entonces podríamos explicar la actividad antagonista de estos análogos de dos posibles formas: la primera que se forme el complejo, se estabilice, pero que no se forme el homodímero debido a que el plegamiento fue incorrecto, y la segunda explicación es que se forme el complejo pero que no sea estable.

Como resultado preliminar de este estudio a nivel molecular, se muestra la condición necesaria para ser un agonista de LasR, primero, tener el farmacóforo necesario para formar las interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos conservados del sitio y segundo tener la capacidad de formar las interacciones hidrofóbicas necesarias para estabilizar el complejo formado, y en especial la interacción con Tyr47, lo cual permitirá un plegamiento correcto y estable. Por otro lado para ser considerado antagonista se necesita tener el farmacóforo necesario para ser reconocido por el receptor y luego formar las interacciones necesarias para formar el complejo, con un plegamiento incorrecto e inestable.

6. CONCLUSIONES

Los 28 análogos estructurales de las N-acil homoserina lactonas se acomodan al sitio de unión de LasR de forma similar entre ellos, además encontramos que la homoserina lactona de estos ligandos se posiciona de forma semejante a la homoserina lactona del ligando nativo presente en el complejo co-cristalizado, lo que permite a los 28 análogos formar las interacciones tipo puentes de hidrógeno presentes en el ligando nativo, indicando que la diferencia en cuanto actividad antagonista debe estar relacionada en un alto porcentaje con la ubicación y orientación de sus cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico que posee *LasR* en su sitio activo.

El análisis de SAR de cada grupo permitió evidenciar que la región B de cada uno de los análogos no permite suplir los requerimientos estructurales y las interacciones necesarias para el correcto plegamiento de LasR. La conformación tomada por los análogos B7, E29 y E30, le permiten formar a su halógeno (F, Cl o Br) una posible interacción con el oxígeno del grupo carbonilo de Tirosina-47, dicha interacción depende de dos factores, la dirección y la distancia, es posible que esta interacción tipo puente de halógeno tenga relación con la capacidad antagonista de estos tres compuestos. Por lo anterior se considera la interacción con Tirosina-47 un objetivo para estudios relacionados con el desarrollo de nuevos análogos con actividad antagonista, esto lo respaldan los cálculos de DM y MM-GBSA/MMPBSA.

De los modelos creados, el modelo basado el receptor posee mayor poder de predicción, ($R^2 = 0.967$), comparado con $R^2 = 0.866$ para el modelo basado en el alineamiento de los ligandos, y se ratifica con la validación externa realizada. Esto se debe a que en el modelo basado en el receptor, se eligen las conformaciones estructurales más estables para cada ligando dentro del sitio activo del receptor LasR, esta información más realista, por lo que se obtienen actividades muy cercanas a las reportadas experimentalmente. Finalmente los mapas de contorno generados por los modelos CoMFA sugieren que la actividad inhibitoria de nuevos ligandos podrían aumentar agregando grupos voluminosos en posiciones cercanas a los heteroátomos,

mientras que grupos que puedan formar puentes de hidrógeno y grupos funcionales fuertemente polarizados en las regiones mostradas favorecen las interacciones electrostáticas con contribuciones de carga positiva y negativa respectivamente, por lo que se ha desarrollado un modelo que puede ser de gran utilidad para proponer potenciales moduladores del *Quórum Sensing* partiendo de las diferentes estructuras base de *AHLs* desarrolladas a lo largo del presente estudio. Por tal motivo, para este tipo de proteínas siempre que se disponga de la estructura, es mejor utilizar modelos 3D-QSAR basados en los alineamientos generados por cálculos de acoplamiento.

Los bajos valores de RMSD mostrados por los complejos durante la simulación, permiten concluir que los complejos presentan una buena estabilidad y los diferentes cambios conformacionales presentes se deben a la naturaleza de las interacciones presentes en cada complejo, las cuales son responsables de la estabilización de los complejos proteína-ligando. Por su parte los valores de RMSF muestran que los ligandos B14 y C14 presentan una fluctuación considerable en el aminoácido Tyr47, mencionado con anterioridad como un residuo importante para la estabilidad del complejo proteína-ligando formado, este residuo adopta un conformación en respuesta a las limitaciones estructurales del análogo, lo que conlleva a la formación de un complejo con un conformación inadecuada para correcta función.

El análisis de los puentes de hidrógeno resalta la importancia de los residuos Asp73 y Tyr56 en el reconocimiento molecular inicial por parte de LasR hacia los grupos amida y carbonilo de los análogos con actividad anti-quórum sensing. Los residuos Trp88 y Ser129 ayudarían posteriormente a continuar el acoplamiento y junto a las interacciones en el bolsillo hidrofóbico terminarían con la formación del complejo. Los 28 análogos forman interacciones hidrofóbicas, y algunos de estos análogos forman interacciones tipo puente de halógeno con Tyr47, entonces podríamos explicar la actividad antagonista de estos análogos de dos posibles formas: la primera que se forme el complejo, el cual se estabiliza, pero no forma el homodímero debido a que el plegamiento fue incorrecto, y la segunda explicación es que se forme el complejo pero que

no sea estable, debido a las limitaciones estructurales de la región B de los análogos.

En general este estudio revela las características estructurales necesarias para ser un agonista de LasR, primero, tener el farmacóforo necesario para formar las interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos conservados del sitio y segundo tener la capacidad de formar las interacciones hidrofóbicas necesarias para estabilizar el complejo formado, y en especial la interacción con Tyr47, lo cual permitirá un plegamiento correcto y estable. Por otro lado para ser considerado antagonista se necesita tener el farmacóforo necesario para ser reconocido por el receptor y luego formar las interacciones necesarias para formar el complejo, con un plegamiento incorrecto e inestable.

7. REFERENCIAS

- Abagyan, R., Totrov, M., & Kuznetsov, D. (1994). New Method for Protein Modeling and Design : Applications to Docking and Structure Prediction from the Distorted Native Conformation. *Journal of Computational Chemistry*, 15(5), 488–506.
- Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical Reviews*, 106(5), 1589–1615. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>
- Ahlgren, N. a, Harwood, C. S., Schaefer, A. L., Giraud, E., & Greenberg, E. P. (2011). Aryl-homoserine lactone quorum sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), 7183–7188. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103821108>
- Ahumedo, M., Díaz, A., & Vivas-Reyes, R. (2010). Theoretical and structural analysis of the active site of the transcriptional regulators LasR and TraR, using molecular docking methodology for identifying potential analogues of acyl homoserine lactones (AHLs) with anti-quorum sensing activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 608–615. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.004>
- Ahumedo, M., Drosos, J. C., & Vivas-Reyes, R. (2014a). Application of molecular docking and ONIOM methods for the description of interactions between anti-quorum sensing active (AHL) analogues and the *Pseudomonas aeruginosa* LasR binding site. *Molecular bioSystems*, 10(5), 1162–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626770>
- Ahumedo, M., Drosos, J. C., & Vivas-Reyes, R. (2014b). Application of molecular docking and ONIOM methods for the description of interactions between anti-quorum sensing active (AHL) analogues and the *Pseudomonas aeruginosa* LasR binding site. *Molecular bioSystems*, 10(5), 1162–71. <https://doi.org/10.1039/c3mb70181f>
- Alberto, G., & Rossello, M. (2013). Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clinica*, 141(8), 353–357.
- Amara, N., Mashiach, R., Amar, D., Krief, P., Spieser, A. H., Bottomley, M. J., ... Meijler, M. M. (2009). Covalent Inhibition of Bacterial Quorum Sensing, (8), 197–201. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500676>

- Atkinson, S., & Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 6(40), 959–78. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0203>
- Auffinger, P., Hays, F. A., Westhof, E., & Ho, P. S. (2004). Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(48), 16789–16794.
- Bai, A. J., & Rai, V. R. (2011). Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3), 183–193. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x>
- Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, 125(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.001>
- Bassler, B. L., & Ng, W. (2009). NIH Public Access. *Annu. Rev. Genet*, 43, 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>. Bacterial
- Bayly, C. C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., & Kollman, P. a. (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical ...*, 97, 10269–10280. <https://doi.org/10.1021/j100142a004>
- Bhargava, N., Sharma, P., & Capalash, N. (2010). Quorum sensing in Acinetobacter: an emerging pathogen, 36(July), 349–360. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.512269>
- Blackwell, H. E., & Fuqua, C. (2011). Introduction to bacterial signals and chemical communication. *Chemical Reviews*, 111(1), 1–3. <https://doi.org/10.1021/cr100407j>
- Blankenship, J. R., & Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>
- Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in Acinetobacter Species and Pseudomonas aeruginosa. *Clinical Infectious Diseases*, 44(106), 49–56.
- Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., & Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen Pseudomonas aeruginosa from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13592–13600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700556200>
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Bradley, J., Guidos, R. J.,

- Jones, R. N., ... Gilbert, D. (2013). 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(12), 1685–94. <https://doi.org/10.1093/cid/cit152>
- Brown, S. A., Palmer, K. L., & Whiteley, M. (2008). Revisiting the host as a growth medium. *MICROBIOLOGY*, 6, 657–666. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1955>
- Burton, E. O., Read, H. W., Pellitteri, M. C., & Hickey, W. J. (2005). Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4906–4909. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4906-4909.2005>
- Cai, W., Li, J., & Yip, S. (2012). Molecular Dynamics. *Comprehensive Nuclear Materials*, 1, 249–265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-056033-5.00128-2>
- Camilli, A., & Bassler, B. . (2006). NIH Public Access. *Nature Reviews. Microbiology*, 311(5764), 1113–1116. <https://doi.org/10.1126/science.1121357.Bacterial>
- Capilato, J. N., Philippi, S., Reardon, T., McConnell, A., Oliver, D., Warren, A., ... Perez, L. J. (2016). Development of a novel series of non-natural triaryl agonists and antagonists of the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum sensing receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.021>
- Case, D., Babin, V., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., ... Kollman, P. A. (2014). Amber 14. San Francisco. Retrieved from <http://ambermd.org/contributors%0D>
- Cavasotto, C. (2016). *In Silico drug Discovery and Design Theory, Methods, Challenges, and Applications*.
- Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). NIH Public Access. *Nat Rev Microbiol*, 6(1), 17–27.
- Cereto-Massagué, A., Ojeda, M. J., Valls, C., Mulero, M., Garcia-Vallvé, S., & Pujadas, G. (2015). Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. *Methods*, 71(C), 58–63.

- <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.005>
- Chakrabarti, S., & Sowdhamini, R. (2003). Functional sites and evolutionary connections of acylhomoserine lactone synthases. *Protein Engineering*, 16(4), 271–278. [https://doi.org/DOI 10.1093/proeng/gzg031](https://doi.org/DOI%2010.1093/proeng/gzg031)
- Chen, G., Swem, L. R., Swem, D. L., Stauff, D. L., O’Loughlin, C. T., Jeffrey, P. D., ... Hughson, F. M. (2011). A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing. *Molecular Cell*, 42(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.003>
- Cheng, T., Li, Q., Zhou, Z., Wang, Y., & Bryant, S. H. (2012). Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *The AAPS Journal*, 14(1), 133–41. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9322-0>
- Chipot, C. (2014). Frontiers in free-energy calculations of biological systems. *Computational Molecular Science*, 4(1), 71–89. <https://doi.org/10.1002/wcms.1157>
- Cho, T., Nagao, J., Imayoshi, R., Kaminishi, H., Aoyama, T., & Nakayama, H. (2010). Quorum Sensing and Morphological Regulation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Journal of Oral Biosciences*, 52(3), 233–239. [https://doi.org/10.1016/S1349-0079\(10\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S1349-0079(10)80026-X)
- Christensen, Q. H., Brecht, R. M., Dudekula, D., Greenberg, E. P., & Nagarajan, R. (2014). Evolution of Acyl-Substrate Recognition by a Family of Acyl-Homoserine Lactone Synthases. *PLoS ONE*, 9(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112464>
- Churchill, M. E. A., & Chen, L. (2011). *NIH Public Access* (Vol. 111). <https://doi.org/10.1021/cr1000817.Structural>
- Cramer, C. J. (2004). *Essentials of Computational Chemistry Theories and Models*. New York (Second Edi). <https://doi.org/10.1037/023990>
- Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1988). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc*, 110(12), 5959–5967.
- Crousilles, A., Maunders, E., Bartlett, S., Fan, C., Abdelhamid, Y., Baker, Y., ... Welch, M. (2015). Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Future Microbiology*, 10(11), 1825–1836.
- Cuevas, G., & Cortés, F. (2003). *Introducción a la Química Computacional*.

- Danishuddin, M., & Khan, A. U. (2015). Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: Necessary considerations and successful case studies. *Methods*, *71*(C), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.10.019>
- de Souza, O. N., & Ornstein, R. L. (1997). Effect of periodic box size on aqueous molecular dynamics simulation of a DNA dodecamer with particle-mesh Ewald method. *Biophysical Journal*, *72*(6), 2395–7. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78884-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78884-2)
- Dekimpe, V., & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, *155*, 712–723. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>
- Dennington, R., Keith, T., & Millam, J. (2009). GaussView. Semichem Inc., Shawnee Mission KS.
- Ding, X., Yin, B., Qian, L., Zeng, Z., Yang, Z., Li, H., ... Zhou, S. (2011). Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, *60*, 1827–1834. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.024166-0>
- Dong, Y., Xu, J., Li, X., & Zhang, L. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, *97*(7), 3526–3531.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, *15*(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>
- Doshi, H. K., Chua, K., Kagda, F., & Tambyah, P. A. (2011). Multi drug resistant pseudomonas infection in open fractures post definitive fixation leading to limb loss: A report of three cases. *International Journal of Case Reports and Images*, *2*(5), 1–6. <https://doi.org/10.5348/ijcri-2011-05-31-CS-1>
- Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S. S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., ... Kollman, P. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry*, *24*(16), 1999–2012. <https://doi.org/10.1002/jcc.10349>
- Eberhard, C., Dew, W., Science, D. R., Eberhard, A., Burlingame, A. L.,

- Kenyon, G. L., ... Oppenheimer, N. J. (1981). Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri*. *Biochemistry* 1981, 20, 2444–2449.
- Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Høiby, N., & Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway : an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 841–851. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2907>
- Frei, R., Breitbach, A. S., & Blackwell, H. E. (2012). 2-Aminobenzimidazole Derivatives Strongly Inhibit and Disperse *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ** *Angewandte. Angew. Chem. Int*, (51), 1–5. <https://doi.org/10.1002/anie.201109258>
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... Shenkin, P. S. (2004). Glide : A New Approach for Rapid , Accurate Docking and Scoring . 1 . Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem*, 47(7), 1739–1749.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A. et al. (2009). Gaussian 09. Wallingford: Gaussian, Inc.
- Frisch, J. B., & Foresman, A. (1994). *Exploring_Chemistry_With_Electronic_Structure_Methods*.
- Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 3(September), 685–695. <https://doi.org/10.1038/nrm907>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00734.x>
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S. D., Welch, M., & Spring, D. R. (2011). Quorum sensing in Gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews*, 111(1), 28–67. <https://doi.org/10.1021/cr100109t>
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S., Welch, M., & Spring, D. R. (2012). Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 20(9),

- 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.003>
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 441(October), 1–13. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gerdt, J. P., McInnis, C. E., Schell, T. L., & Blackwell, H. E. (2015). Unraveling the contributions of hydrogen-bonding interactions to the activity of native and non-native ligands in the quorum-sensing receptor LasR. *Org. Biomol. Chem.*, 13, 1453–1462. <https://doi.org/10.1039/C4OB02252A>
- Gerdt, J. P., McInnis, C. E., Schell, T. L., Rossi, F. M., & Blackwell, H. E. (2014a). Mutational analysis of the quorum-sensing receptor LasR reveals interactions that govern activation and inhibition by nonlactone ligands. *Chemistry and Biology*, 21(10), 1361–1369. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.008>
- Gerdt, J. P., McInnis, C. E., Schell, T. L., Rossi, F. M., & Blackwell, H. E. (2014b). Mutational analysis of the quorum-sensing receptor LasR reveals interactions that govern activation and inhibition by nonlactone ligands. *Chemistry and Biology*, 21(10), 1361–1369. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.008>
- Geske, G. D., Mattmann, M. E., & Blackwell, H. E. (2008). Evaluation of a focused library of N-aryl L-homoserine lactones reveals a new set of potent quorum sensing modulators. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(22), 5978–5981. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.07.089>
- Geske, G. D., Neill, J. C. O., & Blackwell, H. E. (2008). NIH Public Access, 37(7), 1432–1447. <https://doi.org/10.1039/b703021p>. Expanding
- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E., & Blackwell, H. E. (2007). Modulation of Bacterial Quorum Sensing with Synthetic Ligands: Systematic Evaluation of N -Acylated Homoserine Lactones in Multiple Species and New Insights into Their Mechanisms of Action. *Journal of the American Chemical Society*, 129(44), 13613–13625. <https://doi.org/10.1021/ja074135h>
- Godbout, N., Salahub, D. R., Andzelm, J., & Wimmer, E. (1992). Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Canadian Journal of Chemistry*, 70(2), 560–571. <https://doi.org/10.1139/v92-079>

- González, J. E., & Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 67(4), 574–92. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.574>
- Goodisman, J. (1973). Diatomic interaction potential theory. *Academic Press*, 1.
- Gould, T., Schweizer, H., & Churchill, M. (2004). Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone synthase LasI. *Molecular Microbiology* (2004), 53(4), 1135–1146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04211.x>
- Gutiérrez-de-Terán, H. (2004). Modelización molecular de los receptores de adenosina y sus ligandos en el marco de diseño de fármacos asistido por ordenador, 28–29. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10230/11902>
- Hanzelka, B. L., & Greenberg, E. P. (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Evidence that S-Adenosylmethionine Is the Amino Acid Substrate for Autoinducer Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 178(17), 5291–5294.
- Hartmann, A., & Schikora, A. (2012). Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes. *J Chem Ecol*, 38(6), 704–713. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0141-7>
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, 14(11), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.012>
- Hense, B. A., & Schuster, M. (2015). Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 79(1), 153–69. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-14>
- Hentzer, M., & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, 112(9), 1300–1307. <https://doi.org/10.1172/JCI200320074>.One
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., ... Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148, 87–102.
- HETÉNYI, C., & VAN DER SPOEL, D. (2002). Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science* (2002), 11, 1729–1737. <https://doi.org/10.1110/ps.0202302.the>

- Homeyer, N., & Gohlke, H. (2012). Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method. *Molecular Informatics*, 31, 114–122. <https://doi.org/10.1002/minf.201100135>
- Homeyer, N., & Gohlke, H. (2013). Advances in molecular dynamics simulations and free-energy calculations relevant for drug design. In M. A. Lill (Ed.), *In Silico Drug Discovery and Design* (pp. 51–64).
- Huang, J. J., Han, J., Zhang, L., & Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of Acyl-Homoserine Lactone Quorum Signals for Growth by a Soil Pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 69(10), 5941–5949. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5941>
- Huang, J., Shi, Y., Zeng, G., Gu, Y., & Chen, G. (2016). Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere*, 157, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.032>
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and challenges in Protein-ligand docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(8), 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>
- Hudaiberdiev, S., Choudhary, K. S., Vera Alvarez, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba, D., & Pongor, S. (2015). Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(March), 20. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00020>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jensen, F. (2007). *Introduction to Computational Chemistry Computational Chemistry*.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727–748.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926.

<https://doi.org/10.1063/1.445869>

- Kalia, V. C., & Purohit, H. J. (2011). Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(2), 121–140. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532479>
- Kiratisin, P., Tucker, K. D., & Passador, L. (2002). LasR , a Transcriptional Activator of Pseudomonas aeruginosa Virulence Genes , Functions as a Multimer LasR , a Transcriptional Activator of Pseudomonas aeruginosa Virulence Genes , Functions as a Multimer. *Journal of Bacteriology*, 184(17), 4912–4919. <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4912>
- Koch, W., & Holthausen, M. C. (2001). *A Chemist ' s Guide to Density Functional Theory* (2nd ed., Vol. 3).
- Kollef, M. H., Golan, Y., Micek, S. T., Shorr, A. F., & Restrepo, M. I. (2011). Appraising Contemporary Strategies to Combat Multidrug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections – Proceedings and Data From the Gram-Negative Resistance Summit. *Clinical Infectious Diseases* 2011, 53, 33–55. <https://doi.org/10.1093/cid/cir475>
- KOLLMAN, P., MASSOVA, I., REYES, C., KUHN, B., HUO, S., CHONG, L., ... THOMAS, C. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: Combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.*, 33(12), 889–897.
- Krom, B. P., Levy, N., Meijler, M. M., & Jabra-rizk, M. A. (2016). R e v i e w Farnesol and Candida albicans: Quorum Sensing or Not Quorum Sensing? *Israel Journal of Chemistry*, 56, 295–301. <https://doi.org/10.1002/ijch.201500025>
- Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014a). N -Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing with Special Reference to Use of Quorum Quenching Bacteria in Membrane Biofouling Control. *BioMed Research International*, 2014, 1–25.
- Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014b). Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 550–565. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9028>
- Lamb, J. R., Patel, H., Montminy, T., Victoria, E., Iglewski, B. H., & Wagner, V. E. (2003). Functional Domains of the RhIR Transcriptional Regulator of Pseudomonas aeruginosa Functional Domains of the RhIR Transcriptional

- Regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7129–7139. <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7129>
- Landau, L., & Lifshitz, E. (1993). *MECHANICS* (3rd ed.).
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73–111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S. A. B., Hardman, A., ... Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146(10), 2469–2480. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2469>
- Lavecchia, A., & Di Giovanni, C. (2013). Virtual screening strategies in drug discovery: A critical review. *Current Medicinal Chemistry*, 20(23), 2839–2860. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990001>
- Le-Thi-Thu, H., Casañola-Martín, G. M., Marrero-Ponce, Y., Rescigno, A., Abad, C., & Khan, M. T. H. (2014). A rational workflow for sequential virtual screening of chemical libraries on searching for new tyrosinase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(12), 1473–1485. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84904016156&partnerID=tZOtx3y1>
- Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling _ principles and applications* (Second). Prentice Hall.
- Leach, A. R., Gillet, V. J., Lewis, R. A., & Taylor, R. (2010). Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(2), 539–558. <https://doi.org/10.1021/jm900817u>
- Leadbetter, J. R., & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 182(24), 6921–6926.
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lerat, E., & Moran, N. A. (2004). The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 903–913.

- <https://doi.org/10.1093/molbev/msh097>
- Lewis, K. (2007). Persister cells , dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5(January), 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Li, Z., & Nair, S. K. (2012). Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Science*, 21(10), 1403–1417. <https://doi.org/10.1002/pro.2132>
- Lindemann, A., Pessi, G., Schaefer, A. L., Mattmann, M. E., Christensen, Q. H., Kessler, A., ... Harwood, C. S. (2011). Isovaleryl-homoserine lactone, an unusual branched-chain quorum-sensing signal from the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16765–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114125108>
- Lintz, M. J., Oinuma, K.-I., Wysoczynski, C. L., Greenberg, E. P., & Churchill, M. (2011). Crystal structure of QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *Pnas*, 108(38), 15763–15768. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112398108>
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. K., & Cournia, Z. (2014). Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery : Principles , Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14, 1923–1938.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3–25.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings i. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>
- Lou, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Qin, Y., & Farrand, S. K. (2003). Mutational analysis of TraR: Correlating function with molecular structure of a quorum-sensing transcriptional activator. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13173–13182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210035200>
- Lu, Y., Shi, T., Wang, Y., Yang, H., Yan, X., Luo, X., ... Zhu, W. (2009). Halogen Bonding s A Novel Interaction for Rational Drug Design ? *Journal*

- of Medicinal Chemistry*, 52(9), 2854–2862.
- Maddocks, S. E., & Oyston, P. C. F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154, 3609–3623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>
- Maldonado, A. G., Doucet, J. P., Petitjean, M., & Fan, B. T. (2006). Molecular similarity and diversity in chemoinformatics: From theory to applications. *Molecular Diversity*, 10(1), 39–79. <https://doi.org/10.1007/s11030-006-8697-1>
- Markou, P., & Apidianakis, Y. (2014). Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer PROMOTE THE PREVALENCE OF SOURCE OF SYSTEMIC AND REMOTE. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(January), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00115>
- Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057), 422–5. <https://doi.org/10.1038/nature03925>
- Mattmann, M. E., & Blackwell, H. E. (2010). Small molecules that modulate quorum sensing and control virulence in *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Organic Chemistry*, 75(20), 6737–6746. <https://doi.org/10.1021/jo101237e>
- Medina-Franco, J. L., Fernández-de Gortaria, E., & Naveja, J. (2015). Química educación. *Educación Química*, 26, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2015.05.002>
- Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., & Roitberg, A. E. (2012). MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>
- Milton, D. L., Chalker, V. J., Kirke, D., Hardman, A., Cámara, M., & Williams, P. (2001). The LuxM Homologue VanM from *Vibrio anguillarum* Directs the Synthesis of N and N -Hexanoylhomoserine Lactone The LuxM Homologue VanM from *Vibrio anguillarum* Directs the Synthesis of N- (3-Hydroxyhexanoyl) homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lact. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3537–3547. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3537>

- Mishra, V., Kashyap, S., & Hasija, Y. (2015). ScienceDirect Ligand based virtual screening for identifying potent inhibitors against viral neuraminidase: An in silico approach. *Integrative Medicine Research*, 9(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.007>
- MOE. (2009). (Molecular Operating Environment). *Scientific Computing & Instrumentation*. Retrieved from <http://www.chemcomp.com/index.htm>
- Montalvo-Acosta, J. J., & Cecchini, M. (2016). Computational Approaches to the Chemical Equilibrium Constant in Protein-ligand Binding. *Molecular Informatics*, 35(11–12), 555–567. <https://doi.org/10.1002/minf.201600052>
- Moore, J. D., Gerdt, J. P., Eibergen, N. R., & Blackwell, H. E. (2014). Active efflux influences the potency of quorum sensing inhibitors in pseudomonas aeruginosa. *ChemBioChem*, 15(3), 435–442. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300701>
- Morris, G., & Huey, R. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313–322.
- O'Brien, K. T., Noto, J. G., Nichols-O'Neill, L., & Perez, L. J. (2015). Potent irreversible inhibitors of LasR quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(2), 162–167. <https://doi.org/10.1021/ml500459f>
- O'Connell, K. M. G., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G. P. C., & Spring, D. R. (2013). Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(41), 10706–10733. <https://doi.org/10.1002/anie.201209979>
- O'Reilly, M. C., & Blackwell, H. E. (2016). Structure-Based Design and Biological Evaluation of Triphenyl Scaffold-Based Hybrid Compounds as Hydrolytically Stable Modulators of a LuxR-Type Quorum Sensing Receptor. *ACS Infectious Diseases*, 2(1), 32–38. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00112>
- Palmer, A. G., Streng, E., & Blackwell, H. E. (2011). Attenuation of virulence in

- pathogenic bacteria using synthetic quorum-sensing modulators under native conditions on plant hosts. *ACS Chemical Biology*, 6(12), 1348–56. <https://doi.org/10.1021/cb200298g>
- Parr, R. G., & Yang, W. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. (O. U. Press, Ed.). New York.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4360–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4360>
- Qing, X., Xiao, Y. L., De Raeymaeker, J., Tame, R. H., J., Zhang, K., De Maeyer, M., & Arnout, V. (2014). Pharmacophore modeling : advances , limitations , and current utility in drug discovery. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 7, 81–92.
- Rampioni, G., Leoni, L., & Williams, P. (2014). Bioorganic Chemistry The art of antibacterial warfare : Deception through interference with quorum sensing – mediated communication. *BIOORGANIC CHEMISTRY*, 55, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.04.005>
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. *Journal of Molecular Biology*, 261(3), 470–489.
- Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>
- Ripphausen, P., Nisius, B., & Bajorath, J. (2011). State-of-the-art in ligand-based virtual screening. *FEATURES Drug Discovery Today*, 16(May), 372–376. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.011>
- Rojas-Badía, M. M. (2011). Quorum sensing in beneficial plant-bacteria associations. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 135–143.
- Rumbaugh, K. P. (2011). *Quorum Sensing Methods and Protocols. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; v. 692. 1064-3745. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Rutherford, S., & Bassler, B. (2012). Bacterial Quorum Sensing : Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–26.

- Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 1–25. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3), 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen – Host Interactions in Pseudomonas aeruginosa Pneumonia RESPIRATORY INFECTIONS. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209–1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>
- Saldívar-gonzález, F., & Medina-franco, F. D. P. J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- Schaefer, A. L., Greenberg, E. P., Oliver, C. M., Oda, Y., Huang, J. J., Bittan-Banin, G., ... Harwood, C. S. (2008). A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature*, 454(7204), 595–599. <https://doi.org/10.1038/nature07088>
- Schneider, G., & Fechner, U. (2005). Computer-based de novo design of drug-like molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(8), 649–663. <https://doi.org/10.1038/nrd1799>
- Schuster, M., Sexton, D. J., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*, 67(May 2013), 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155635>
- Screening, H., Borlee, B. R., Geske, G. D., Blackwell, H. E., & Handelsman, J. (2010). Identification of Synthetic Inducers and Inhibitors of the Quorum-Sensing Regulator LasR in Pseudomonas aeruginosa by. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 76(24), 8255–8258. <https://doi.org/10.1128/AEM.00499-10>
- Sen, S., Farooqui, N. A., Easwari, T. S., & Roy, B. (2012). CoMFA -3D QSAR APPROCH IN DRUG DESIGN. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 1(4), 167–175.

- Sheridan, R. P., & Kearsley, S. K. (2002). Why do we need so many chemical similarity search methods? *Ddt*, 7(17), 903–911.
- Sherrill, D. (2000). An Introduction to Hartree-Fock Molecular Orbital Theory What. *Georgia Inst. of Technology*, 1–8.
- Sippl, W. (2000). Receptor-based 3D QSAR analysis of estrogen receptor ligands – merging the accuracy of receptor-based alignments with the computational efficiency of ligand-based methods *. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 14, 559–572.
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1460–1465. <https://doi.org/10.1172/JCI200320364>
- Soulère, L., Frezza, M., Queneau, Y., & Doutheau, A. (2007). Exploring the active site of acyl homoserine lactones-dependent transcriptional regulators with bacterial quorum sensing modulators using molecular mechanics and docking studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26(2), 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2007.04.004>
- Soulère, L., Sabbah, M., Fontaine, F., Queneau, Y., & Doutheau, A. (2010). LuxR-dependent quorum sensing: Computer aided discovery of new inhibitors structurally unrelated to N-acylhomoserine lactones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(15), 4355–4358. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.081>
- Stevens, A. M., Dolan, K. M., & Greenberg, E. P. (1994). Synergistic binding of the Vibrio fischeri LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12619–12623. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3631a>
- Stewart, J. J. P. (1989). Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .2. Applications. *J. Comput. Chem.*, 10(2), 221–264. <https://doi.org/10.1002/jcc.540100209>
- Stewart, J. J. P. (2013). Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J Mol Model*, 19, 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>
- Stumpfe, D., & Bajorath, J. (2011). Similarity searching. *Computational*

- Molecular Science*, 1(April), 260–282. <https://doi.org/10.1002/wcms.23>
- Stumpfe, D., & Bajorath, J. (2012). Exploring activity cliffs in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(7), 2932–2942. <https://doi.org/10.1021/jm201706b>
- Stumpfe, D., León, A. de, Dimova, D., & Bajorath, J. (2014). Follow up: Advancing the activity cliff concept, part II ANRT biblio Chemistry ML NeuralNets QSAR. *F1000Research*, 199, 1–11. <https://doi.org/10.12688/f1000research.3788.1>
- Suneby, E. G., Herndon, L. R., & Schneider, T. L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* LasR-DNA Binding Is Directly Inhibited by Quorum Sensing Antagonists. *ACS Infectious Diseases*, acsinfecdis.6b00163. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00163>
- Thiel, V., Kunze, B., Verma, P., Wagner-Döbler, I., & Schulz, S. (2009). New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *ChemBioChem*, 10(11), 1861–1868. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900126>
- Tian, S., Wang, J., Li, Y., Xu, X., & Hou, T. (2012). Drug-likeness analysis of traditional chinese medicines: Prediction of drug-likeness using machine learning approaches. *Molecular Pharmaceutics*, 9(10), 2875–2886. <https://doi.org/10.1021/mp300198d>
- Todeschini, R., & Consonni, V. (2009). Chemometrics in QSAR. *Comprehensive Chemometrics*, 4, 129–172.
- Tomasz, A. (1965). Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product. *Nature*, 208(5006), 155–159. <https://doi.org/10.1038/208155a0>
- Turner, K. H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., & Whiteley, M. (2014). Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLOS Genetics*, 10(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004518>
- Turner, K. H., Wessel, A. K., Palmer, G. C., Murray, J. L., & Whiteley, M. (2015). Essential genome of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), 4110–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419677112>
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco,

- R., ... Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO Journal*, 21(17), 4393–4401. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf459>
- Vistoli, G., Pedretti, A., & Testa, B. (2008). Assessing drug-likeness - what are we missing? *Drug Discovery Today*, 13(7–8), 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.11.007>
- Vyas, V., Jain, A., Jain, A., & Gupta, A. (2008). Virtual screening: A fast tool for drug design. *Scientia Pharmaceutica*, 76(3), 333–360. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0803-03>
- Walters, W. P., & Murcko, M. A. (2002). Prediction of “drug-likeness.” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(3), 255–271. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00003-0)
- Wang, J. M., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. a, & Case, D. a. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.*, 25(9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>
- Warren, G. L., Andrews, C. V, Capelli, a, Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M. H., ... Head, M. S. (2006). A critical assessment of docking programs and scoring functions. Capelli, A. LaLonde, J. Semus, S. F. Head, M. S. *J. Med. Chem.*, (49), 5912–5931.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Reviews in Cell Development Biology*, 21(1), 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B., & Churchill, M. E. a. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Molecular Cell*, 9(3), 685–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00480-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00480-X)
- Welsh, M. A., & Blackwell, H. E. (2016a). Chemical Genetics Reveals Environment-Specific Roles for Quorum Sensing Circuits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Chemical Biology*, 23(3), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.01.006>
- Welsh, M. A., & Blackwell, H. E. (2016b). Chemical probes of quorum sensing: from compound development to biological discovery. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 774–794. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw009>
- Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., & Mitscher, L. A. (1998).

GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY. *Pure Appl. Chem*, 70(5), 1129–1143.

- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362(1483), 1119–1134. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2039>
- Winzer, K., Hardie, K. R., & Williams, P. (2002). Bacterial cell-to-cell communication : sorry , can ' t talk now — gone to lunch ! *Bacterial Cell-to-Cell Communication*, 5, 216–222.
- Xu, X., & Goddard, W. A. (2004). The X3LYP extended density functional for accurate descriptions of nonbond interactions, spin states, and thermochemical properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2673–2677. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308730100>
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M. A., Dickerson, T. J., Brogan, A. P., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2006). Structure of the Escherichia coli quorum sensing protein SdiA: Activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *Journal of Molecular Biology*, 355(2), 262–273. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.041>
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., ... Dessaux, Y. (2002). N -Acylhomoserine Lactones Undergo Lactonolysis in a pH- , Temperature- , and Acyl Chain Length-Dependent Manner during Growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa. *INFECTION AND IMMUNITY*, 70(10), 5635–5646. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5635>
- Young, D. C. (2001). *COMPUTATIONAL CHEMISTRY A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. New York (Vol. 9). <https://doi.org/10.1002/jat.1666>
- Zheng, Y., & Sintim, H. O. (2014). Molecular insights into how ligands activate or inactivate LasR. *Chemistry and Biology*, 21(10), 1261–1263. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.001>
- Zhu, T., Cao, S., Su, P.-C., Patel, R., Shah, D., Chokshi, H. B., ... Johnson, M. E. (2013). Practical, Hit Identification and Optimization in Virtual Screening: Analysis, Recommendations Based Upon a Critical Literature. *Journal of*

Medicinal Chemistry, 56(17), 6560–6572.

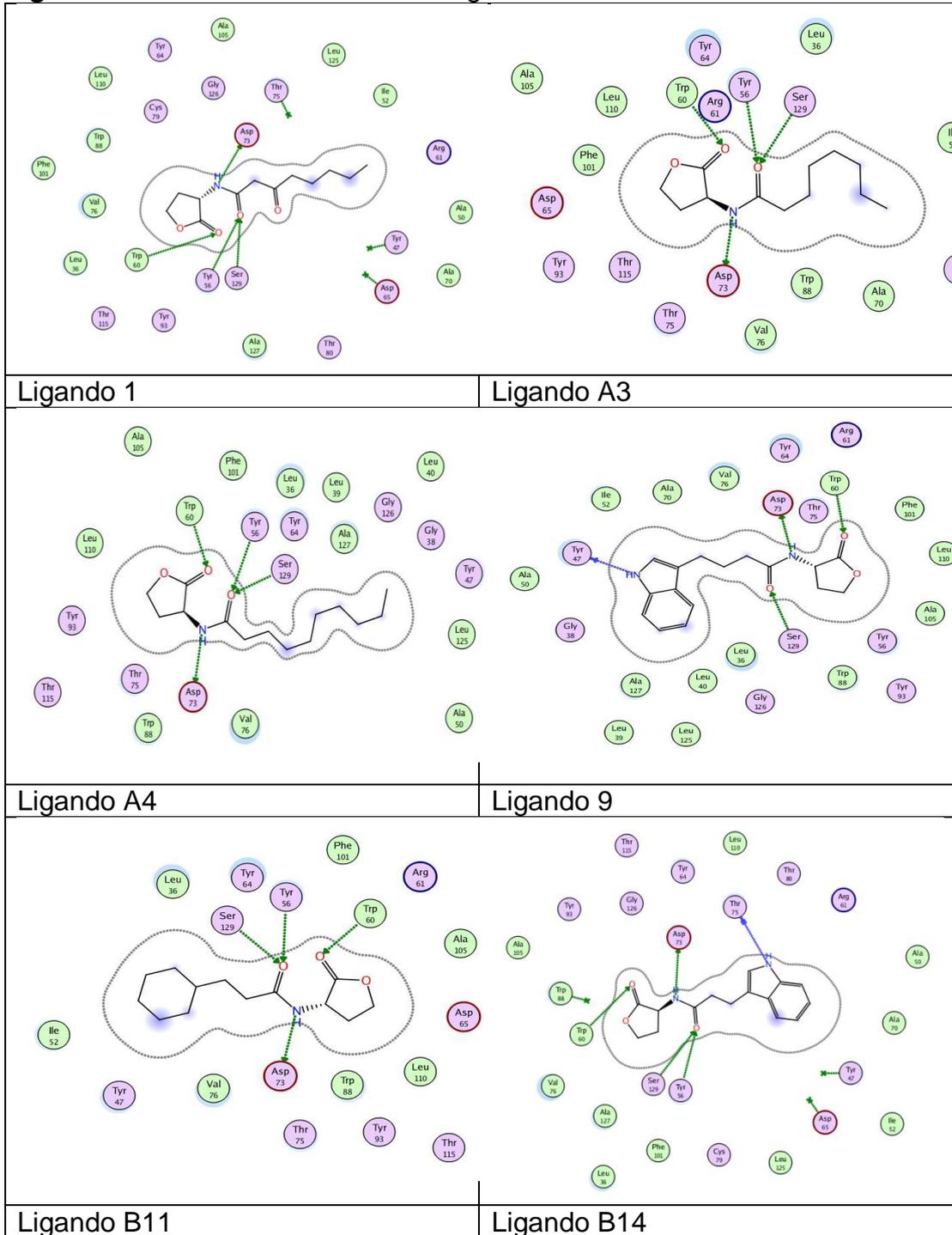
<https://doi.org/10.1021/jm301916b>.Hit

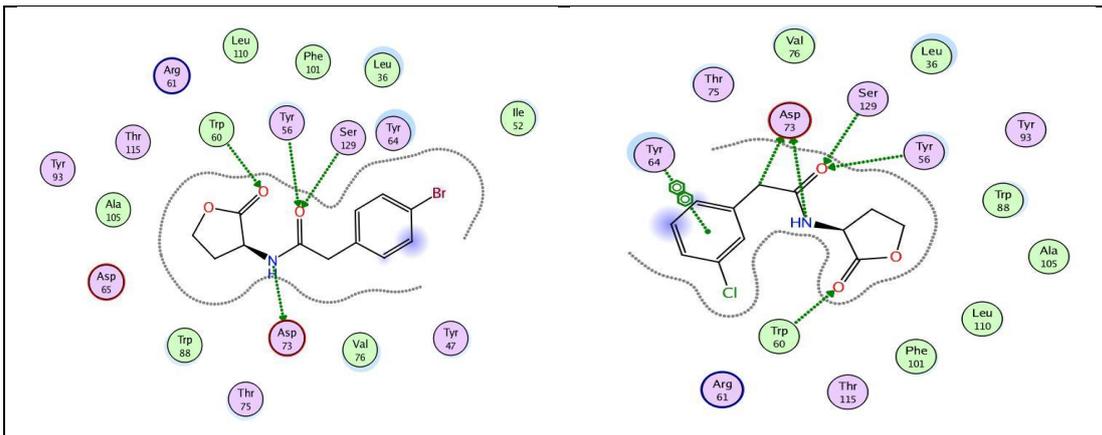
Zou, Y., & Nair, S. K. (2009a). Molecular Basis for the Recognition of Structurally Distinct Autoinducer Mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR Quorum-Sensing Signaling Receptor. *Chemistry and Biology*, 16(9), 961–970. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.09.001>

Zou, Y., & Nair, S. K. (2009b). Molecular Basis for the Recognition of Structurally Distinct Autoinducer Mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR Quorum-Sensing Signaling Receptor. *Chemistry and Biology*, 16(9), 961–970. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.09.001>

8. ANEXOS

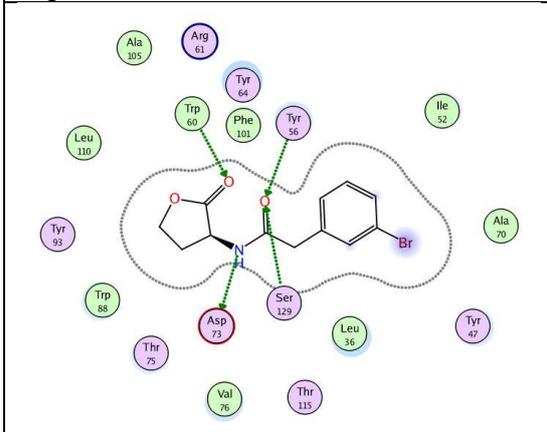
Figura1. Interacciones 2D de los 28 ligandos



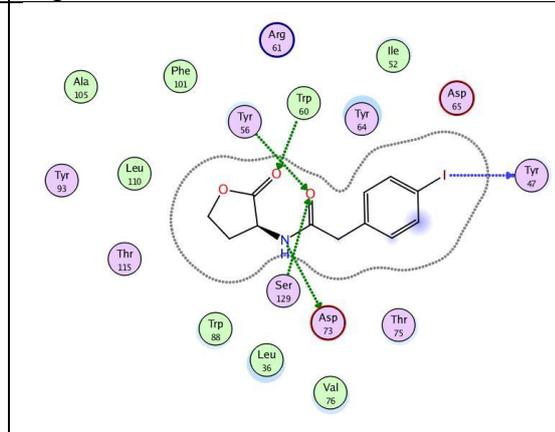


Ligando 8

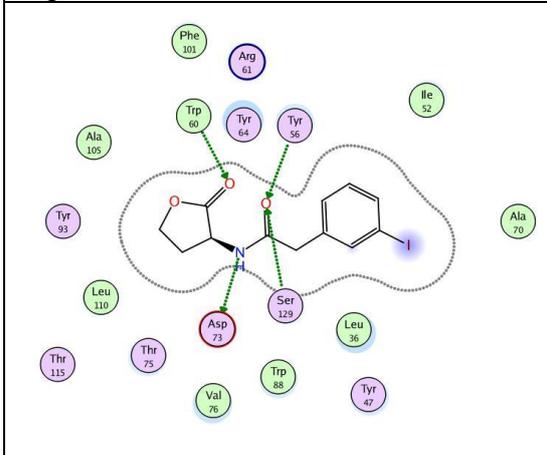
Ligando C6



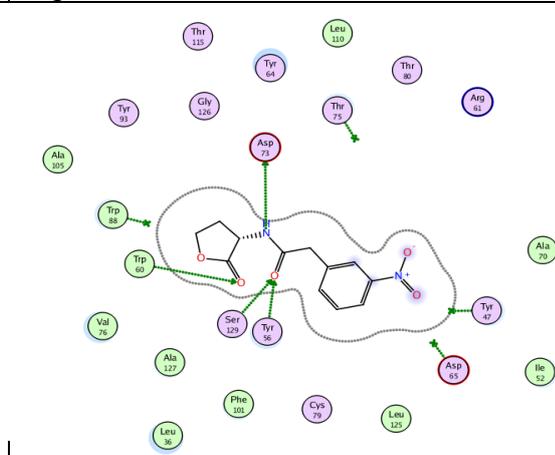
Ligando C8



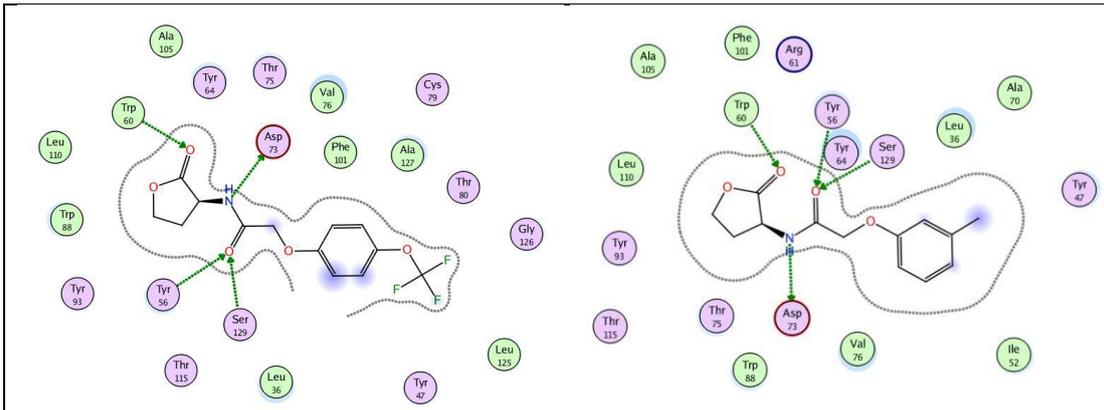
Ligando C10



Ligando C11

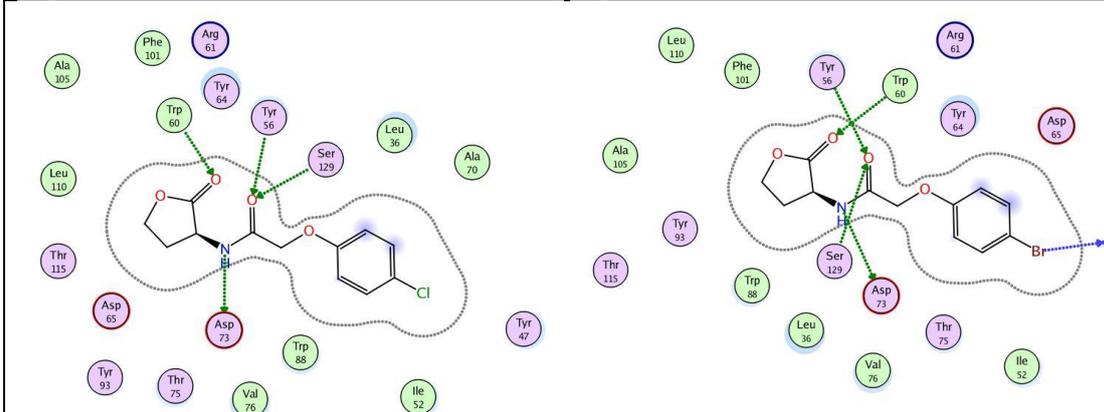


Ligando C14



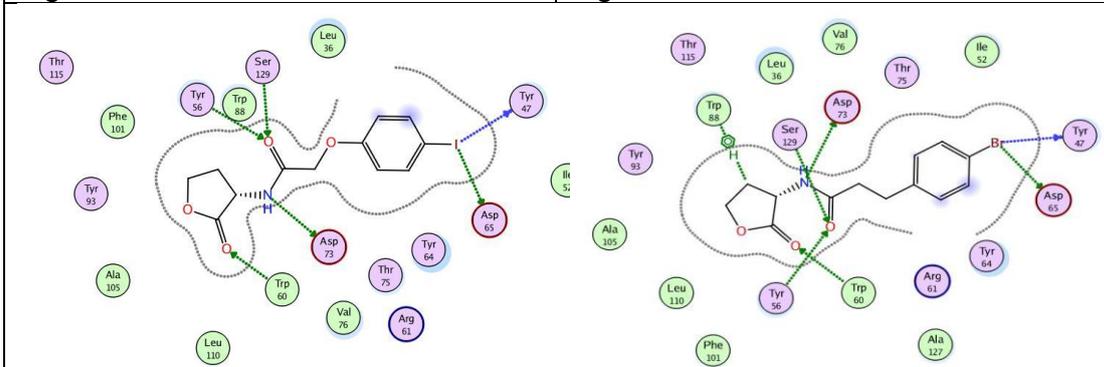
Ligando D15

Ligando E16



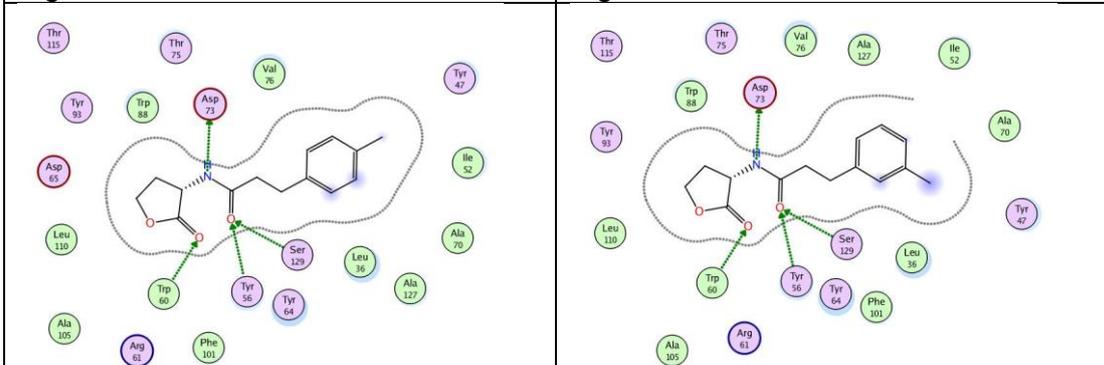
Ligando E20

Ligando E21



Ligando E22

Ligando B7



Ligando E26

Ligando E27

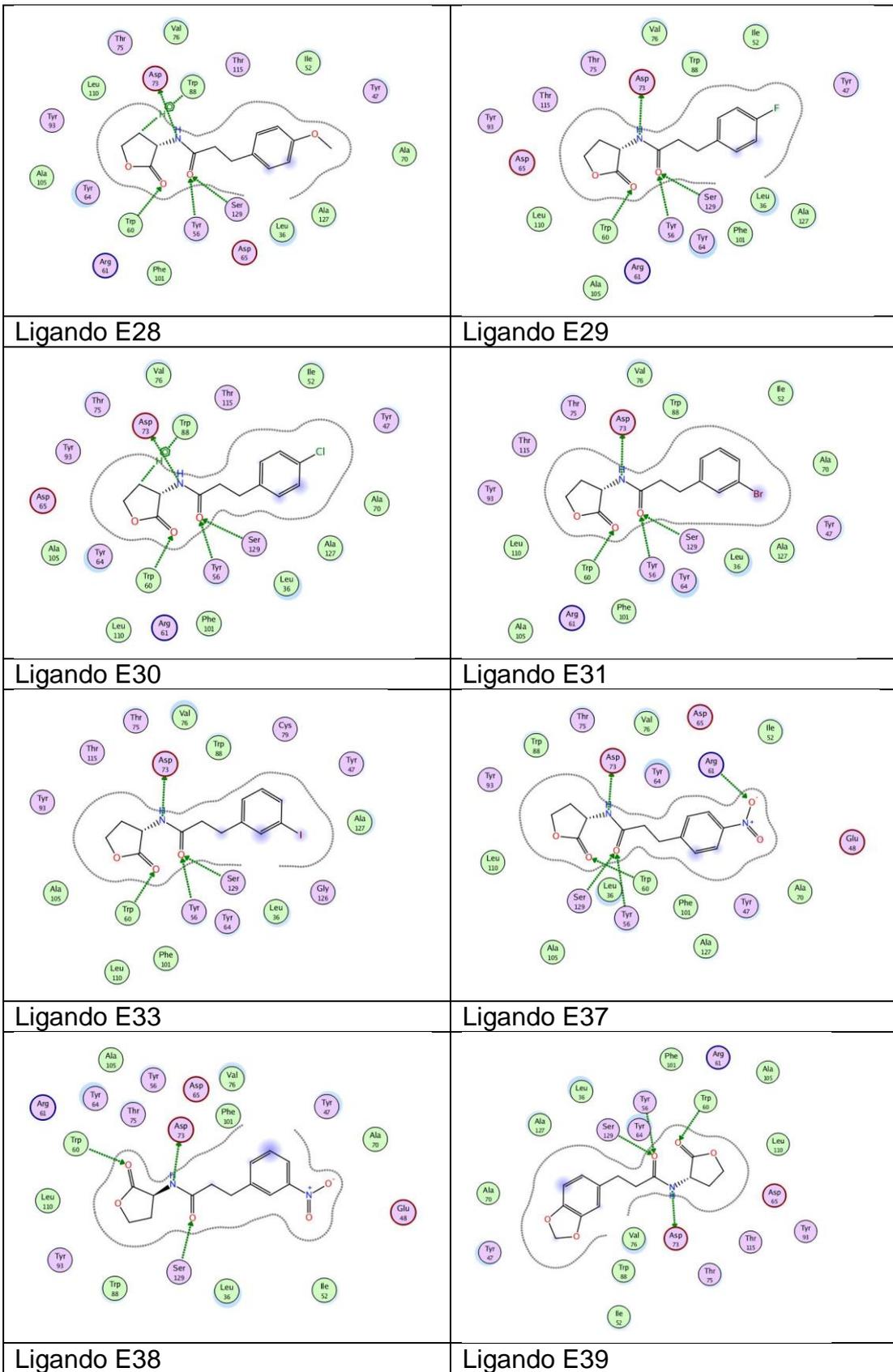
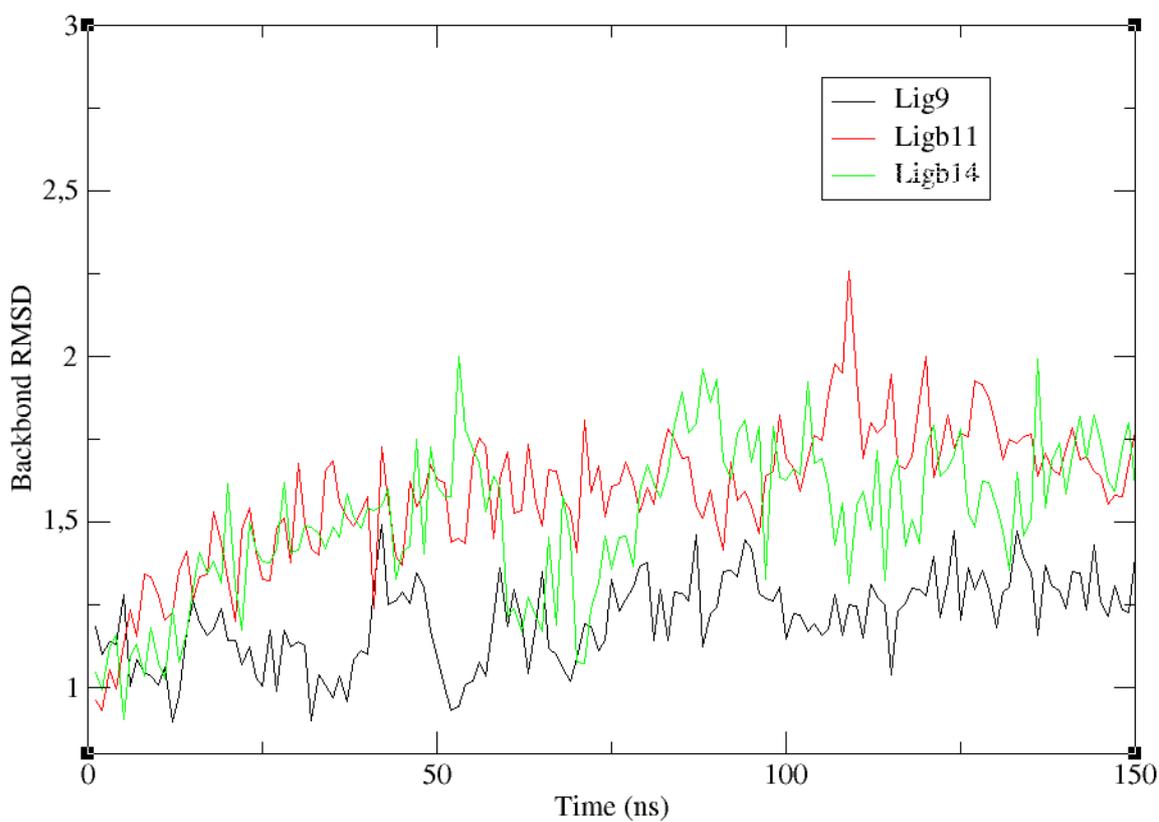
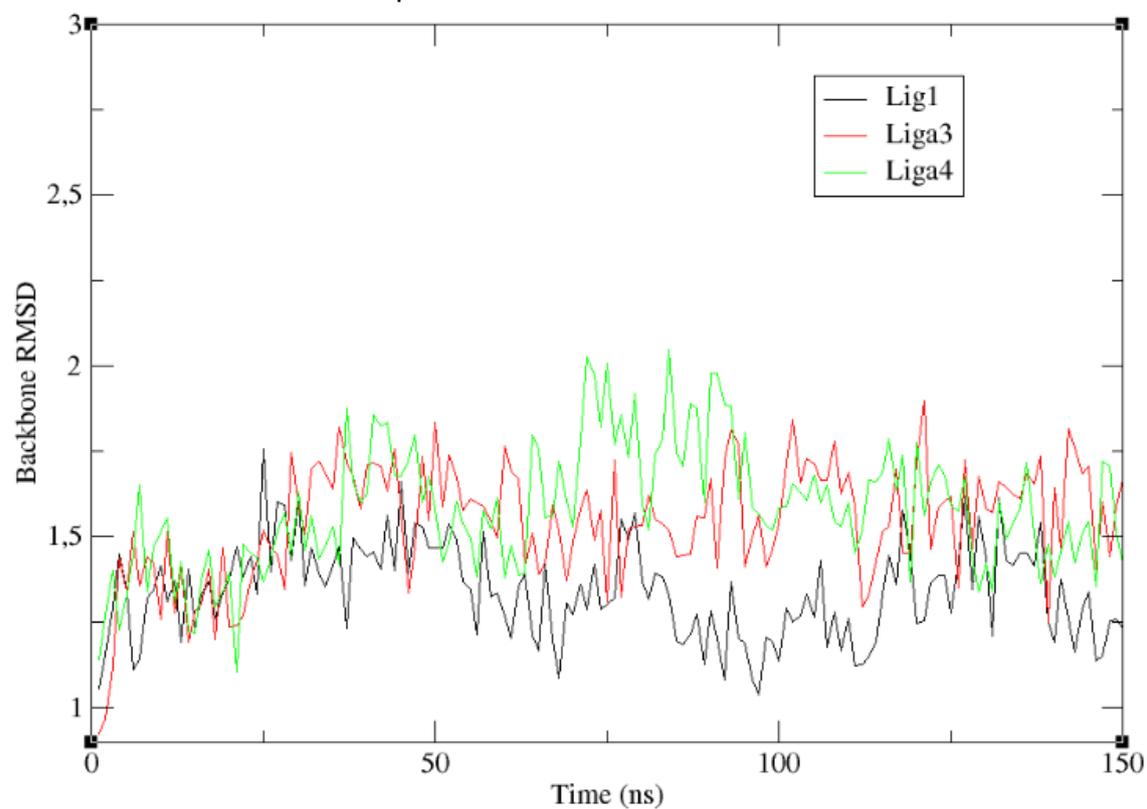
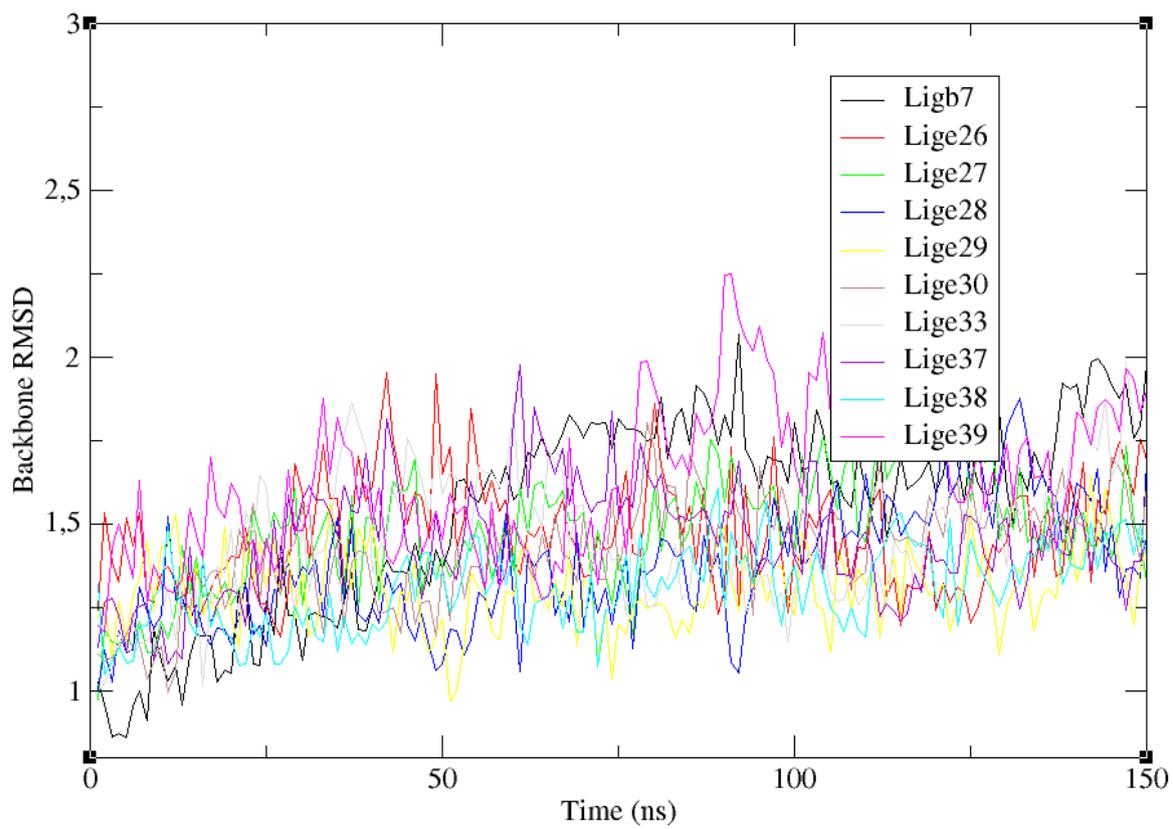
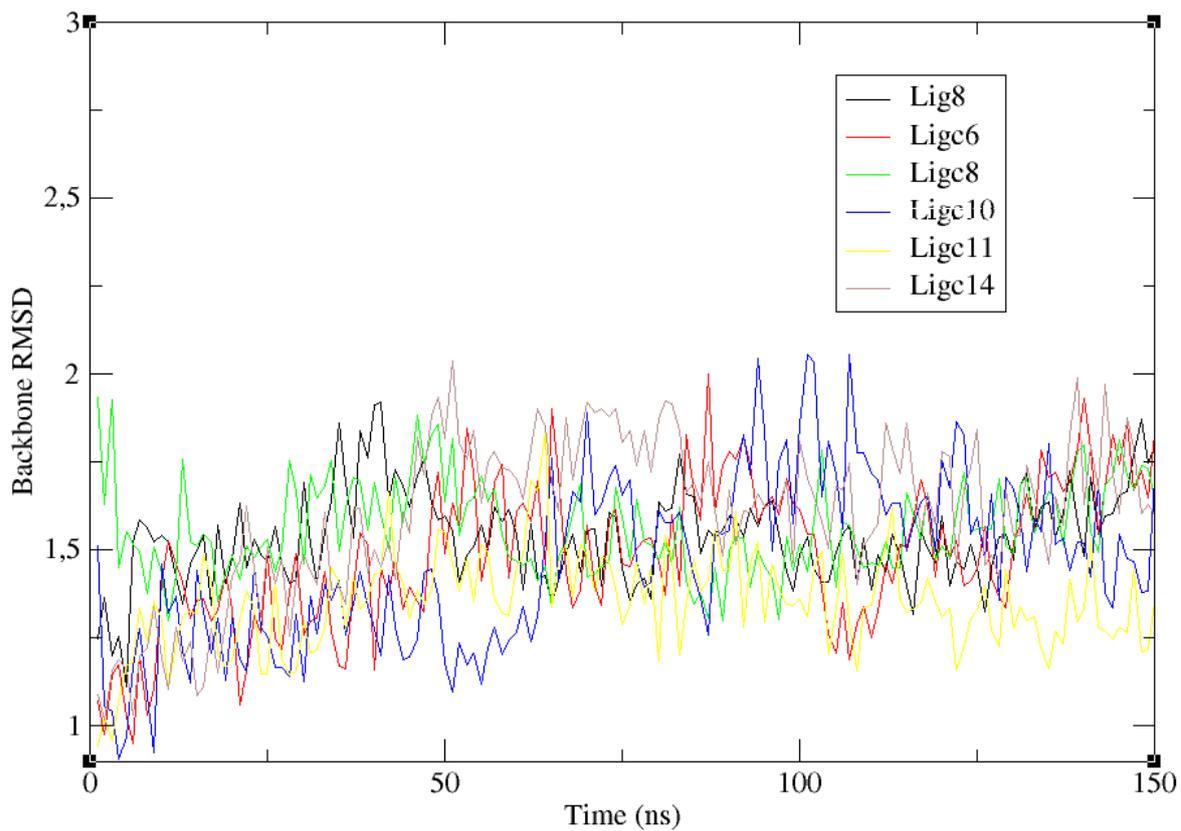


Figura 2. RMSD de complejos proteína-ligando durante la simulación en función de la escala de tiempo.





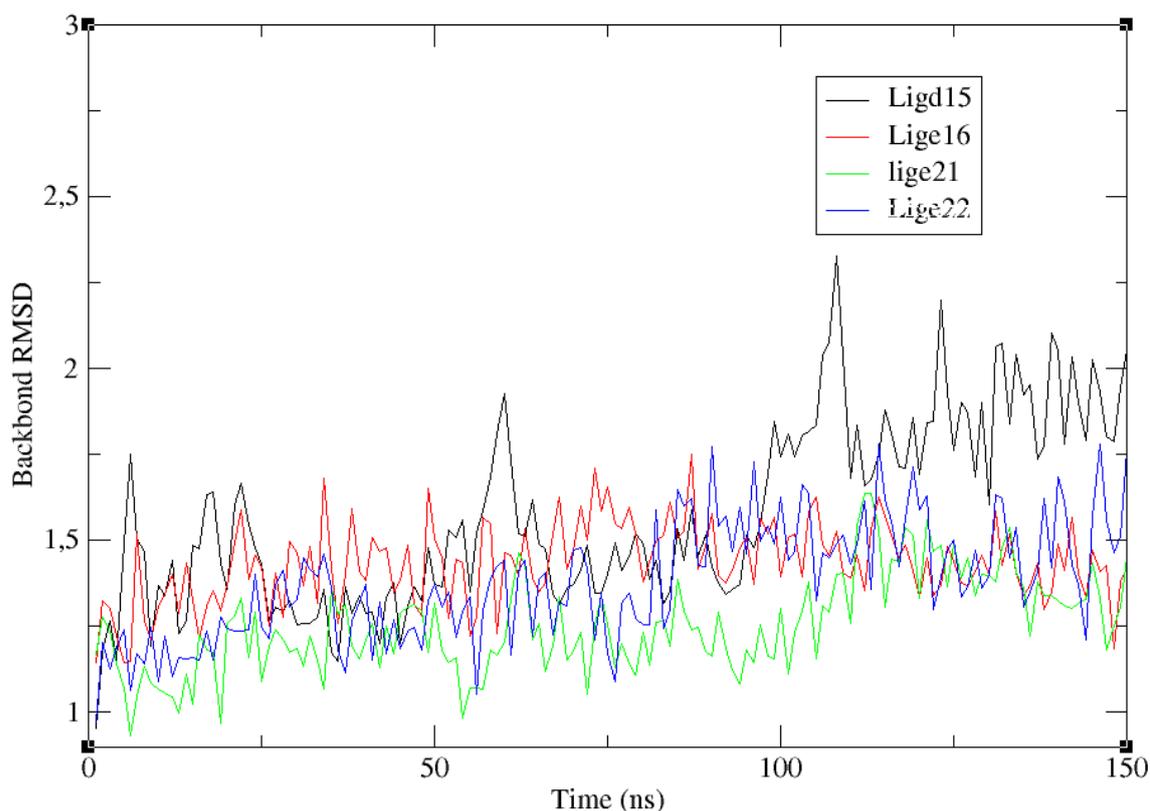


Tabla 1: Interacciones tipo puente de hidrógeno formadas por los 28 ligandos

ligandos	Residuos	Distancia H-A	Distancia D-A	Angulo donor
1	Tyr56	2.24	3.05	141.28
	Trp60	2.13	3.11	164.76
	Asp73	1.87	2.84	162.19
	Thr75	2.50	3.26	135.58
	Ser129	1.80	2.74	163.06
A3	Tyr56	2.23	3.03	140.21
	Trp60	1.95	2.95	169.43
	Asp73	1.99	2.93	156.40
	Thr75	2.67	3.43	136.66
	Ser129	1.78	2.71	161.81
A4	Tyr56	2.23	3.06	144.44
	Trp60	1.80	2.78	163.97
	Asp73	1.97	2.88	149.93
	Thr75	2.81	3.55	134.17
	Ser129	1.85	2.79	165.63
9	Tyr47	2.13	3.05	153.83
	Tyr56	2.78	3.50	132.48
	Trp60	1.86	2.87	171.55
	Tyr64	3.38	4.03	127.05
	Asp73	1.76	2.74	163.35
	Thr75	2.84	3.53	129.38
	Ser129	2.05	2.92	150.95
B11	Tyr56	2.21	3.01	139.32

	Trp60	1.91	2.90	165.04
	Asp73	1.93	2.89	160.86
	Thr75	2.77	3.52	135.03
	Ser129	1.76	2.69	160.74
B14	Tyr56	2.26	3.07	141.80
	Trp60	1.84	2.82	163.29
	Asp73	1.92	2.85	153.83
	Thr75	2.19	3.03	140.82
	Ser129	1.82	2.76	163.69
8	Tyr56	2.22	3.01	138.83
	Trp60	1.83	2.83	168.71
	Asp73	2.03	2.98	158.52
	Thr75	2.82	3.58	136.66
	Ser129	1.77	2.69	160.32
9	Tyr47	2.13	3.05	153.83
	Tyr56	2.78	3.50	132.48
	Trp60	1.86	2.87	171.55
	Tyr64	3.38	4.03	127.05
	Asp73	1.76	2.74	163.35
	Thr75	2.84	3.53	129.38
	Ser129	2.05	2.92	150.95
C6	Tyr	2.08	2.95	148.79
	Trp	2.10	2.98	144.78
	Asp	2.08	2.96	145.74
	Thr	2.92	3.65	133.73
	Thr115	3.44	3.80	104.54
	Ser129	1.63	2.53	154.08
C8	Tyr56	2.24	3.03	139.03
	Trp60	2.02	3.00	163.40
	Asp73	1.92	2.89	162.09
	Thr75	2.69	3.44	135.54
	Ser129	1.78	2.70	160.61
C10	Tyr56	2.19	2.96	135.90
	Trp60	1.79	2.79	168.47
	Asp73	2.01	2.98	164.43
	Thr75	2.82	3.58	136.59
	Ser129	1.72	2.63	156.73
C11	Tyr56	2.22	3.01	139.10
	Trp60	1.95	2.93	163.58
	Asp73	1.93	2.89	162.14
	Thr75	2.75	3.49	135.30
	Ser129	1.77	2.69	160.58
C14	Tyr56	2.21	3.00	138.91
	Trp60	1.80	2.79	168.26
	Asp73	1.96	2.92	160.35

	Ser129	1.87	2.81	166.13
E28	Tyr56	2.10	2.95	148.16
	Trp60	1.93	2.90	160.04
	Arg61	2.74	3.11	102.04
	Asp73	2.03	2.92	147.41
	Thr75	2.82	3.56	134.13
	Ser129	1.84	2.77	164.51
E29	Tyr56	2.21	3.05	145.26
	Trp60	1.83	2.82	167.90
	Asp73	1.98	2.89	149.03
	Thr75	2.82	3.55	134.12
	Ser129	1.84	2.78	166.05
E30	Tyr56	2.06	2.93	149.79
	Trp60	1.91	2.86	154.92
	Asp73	2.01	2.90	147.25
	Thr75	2.85	3.58	133.37
	Ser129	1.85	2.79	163.51
E31	Tyr56	2.05	2.91	148.65
	Trp60	1.84	2.83	165.44
	Asp73	2.03	2.93	148.39
	Thr75	2.84	3.58	134.17
	Ser129	1.85	2.78	163.12
E33	Tyr56	2.24	3.06	142.80
	Trp60	1.84	2.83	164.99
	Asp73	1.95	2.87	152.50
	Thr75	2.82	3.56	134.16
	Ser129	1.83	2.76	164.50
E37	Tyr56	2.32	3.12	139.72
	Trp60	1.79	2.79	171.51
	Arg61	3.25	3.77	113.36
	Arg61	2.20	2.91	125.68
	Asp73	1.93	2.87	156.98
	Thr75	2.83	3.56	134.27
	Ser129	1.82	2.75	162.02
E38	Tyr56	2.52	3.28	136.46
	Trp60	1.94	2.90	157.60
	Arg61	3.08	3.64	116.19
	Arg61	2.21	2.94	127.85
	Asp73	1.95	2.79	139.36
	Thr75	3.03	3.72	130.51
	Ser129	1.89	2.81	158.01
	Tyr56	2.23	3.02	139.70
	Trp60	2.06	3.04	162.39

E39	Asp73	1.89	2.86	163.42
	Thr75	2.58	3.33	135.62
	Ser129	1.78	2.71	161.22

Tabla 2. Interacciones hidrofóbicas formadas por los 28 ligandos

Ligando	Residuo	Distancia	Átomo del ligando	Átomo de la proteína
1	Val76	3.26	2557	1104
	Val76	3.78	2560	1103
	Trp88	3.58	2544	1294
	Thr115	3.99	2556	1719
	Leu125	3.61	2560	1862
	Ala127	3.04	2557	1887
A3	Leu36	3.59	2556	476
	Tyr64	3.33	2556	922
	Tyr64	3.89	2555	921
	Val76	3.90	2554	1104
	Trp88	3.47	2544	1294
A4	Leu36	3.60	2557	477
	Leu40	3.43	2561	540
	Leu40	3.68	2560	541
	Val76	3.52	2555	1104
	Trp88	3.48	2544	1294
	Ala127	3.36	2556	1887
9	Leu36	3.56	2554	477
	Leu40	3.96	2560	541
	Ala50	3.44	2560	696
	Tyr64	3.86	2555	922
	Val76	3.68	2553	1104
	Trp88	3.52	2544	1294
	Ala127	3.56	2563	1887
B11	Leu36	3.72	2560	476
	Leu36	3.63	2554	477
	Ile52	3.74	2558	729
	Tyr64	3.39	2559	922
	Val76	3.33	2556	1104
	Trp88	3.51	2544	1294
B14	Leu36	3.94	2554	477
	Val76	3.32	2556	1104
	Val76	3.74	2561	1103
	Trp88	3.51	2544	1294
	Ala127	3.14	2556	1887
8	Leu36	3.56	2561	476
	Leu36	3.76	2555	477
	Tyr64	3.52	2560	922

	Val76	3.45	2556	1104
	Trp88	3.64	2544	1294
	Leu36	3.41	2558	476
	Leu36	3.88	2559	477
C6	Tyr56	3.86	2555	786
	Tyr64	3.48	2558	922
	Tyr64	3.37	2555	921
	Val76	3.95	2560	1104
	Trp88	3.75	2544	1294
C8	Leu36	3.23	2559	476
	Trp88	3.49	2544	1294
	Leu36	3.85	2559	476
C10	Tyr64	3.40	2559	922
	Tyr64	3.87	2560	921
	Val76	3.10	2555	1104
	Trp88	3.57	2544	1294
C11	Leu36	3.24	2559	476
	Trp88	3.50	2544	1294
	Leu36	3.26	2556	476
C14	Val76	3.28	2559	1104
	Trp88	3.51	2544	1294
	Val76	3.60	2560	1104
D15	Val76	3.22	2556	1104
	Trp88	3.50	2544	1294
	Thr115	3.97	2556	1719
	Ala127	3.39	2559	1887
	Ala127	3.30	2557	1887
	Leu36	3.51	2561	476
E16	Tyr47	3.82	2558	646
	Tyr64	3.50	2559	922
	Ala70	3.87	2558	1012
	Val76	3.37	2556	1104
	Trp88	3.60	2544	1294
	Leu36	3.59	2556	476
E20	Tyr64	3.54	2557	922
	Val76	3.33	2561	1104
	Trp88	3.64	2544	1294
	Leu36	3.54	2561	476
E21	Tyr64	3.54	2560	922
	Val76	3.33	2556	1104
	Trp88	3.69	2544	1294
	Leu36	3.54	2561	476
E22	Tyr64	3.60	2560	922
	Val76	3.52	2556	1104
	Trp88	3.41	2544	1294
B7	Leu36	3.56	2561	476
	Leu36	3.76	2555	477

	Tyr64	3.52	2560	922
	Val76	3.45	2556	1104
	Trp88	3.64	2544	1294
E26	Leu36	3.70	2557	476
	Leu36	3.55	2556	477
	Tyr64	3.51	2558	922
	Val76	3.30	2561	1104
	Trp88	3.62	2544	1294
	Leu36	3.58	2560	476
	Leu36	3.45	2561	477
E27	Tyr47	3.54	2558	646
	Ala70	3.77	2558	1012
	Val76	3.36	2556	1104
	Trp88	3.53	2544	1294
	Leu36	3.59	2557	476
	Leu36	3.70	2555	477
E28	Tyr64	3.58	2557	922
	Val76	3.72	2560	1104
	Trp88	3.62	2544	1294
	Leu36	3.54	2560	476
	Leu36	3.59	2561	477
E29	Tyr64	3.63	2560	922
	Trp88	3.59	2544	1294
	Leu36	3.54	2561	476
	Leu36	3.86	2555	477
E30	Tyr64	3.53	2560	922
	Val76	3.26	2556	1104
	Trp88	3.64	2544	1294
	Leu36	3.36	2560	476
	Leu36	3.78	2555	477
E31	Tyr64	3.34	2559	922
	Val76	3.62	2556	1104
	Trp88	3.76	2544	1294
	Leu36	3.89	2554	477
	Val76	3.21	2561	1104
E33	Trp88	3.50	2544	1294
	Thr115	3.96	2561	1719
	Ala127	3.30	2559	1887
	Leu36	3.61	2560	476
	Leu36	3.84	2554	477
E37	Tyr64	3.45	2559	922
	Ala70	3.86	2557	1012
	Val76	3.10	2556	1104
	Trp88	3.50	2544	1294
	Leu36	3.58	2554	477
	Tyr47	3.64	2558	646
E38	Tyr64	3.23	2560	922

E39	Ala70	3.73	2558	1012
	Val76	3.38	2556	1104
	Trp88	3.55	2544	1294
	Leu36	3.62	2554	477
	Tyr64	3.86	2563	922
	Val76	3.31	2556	1104
	Trp88	3.48	2544	1294

Tabla 3. Otras interacciones

Ligando	Tipo de interacción	Residuo	Átomos del ligando
C8	π -Stacking	Tyr64	2554, 2555, 2556, 2558, 2559, 2560
C10	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
C11	π -Stacking	Tyr64	2554, 2555, 2556, 2558, 2559, 2560
C14	π -Stacking	Tyr64	2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559
B7	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
E22	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
E20	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
E21	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
E27	π -Stacking	Tyr64	2561, 2555, 2556, 2557, 2559, 2560
E29	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]
E30	Halogen Bonds	Tyr47	645 [O2]

Tabla 4. Valores de pIC50 y la energía libre del docking para los 28 análogos

Ligandos	Autodock4	pIC50
----------	-----------	-------

1	(kcal/mol)	(μ M)
8	-7.39	6,96
9	-8.26	5,41
A3	-9.35	5,08
A4	-7.11	5,76
B7	-7.82	6,60
B11	-8.67	6,47
B14	-8.12	5,76
C6	-8.99	6,08
C8	-8.25	5,40
C10	-8.46	5,39
C11	-8.55	5,76
C14	-8.84	5,33
d15	-8.44	6,21
E16	-7.37	5,33
E20	-7.55	5,11
E21	-7.68	5,33
E22	-8.04	5,68
E26	-8.07	5,70
E27	-8.26	5,37
E28	-8.18	5,05
E29	-7.87	5,17
E30	-7.69	4,92
E31	-8.32	5,66
E33	-8.53	5,48
E37	-9.07	5,74
E38	-8.91	5,52
E39	-8,89	pIC50

Tabla 5. Porcentaje de existencia de los puentes de hidrógeno en los ligandos más activos durante los 150 ns de simulación

	Trp60	Asp73	Ser129	Tyr56	Thr75
1	29.5%	80.1%	50.7%	58.7%	1.2%
A3	37.7%	75.4%	76%	64.1%	
A4	37.4%	47.3 %	71%	55.3%	1%
9	25.1%	69.9%	76%	29.3%	41.1%
B11	23.2%	30.9%	39.8%	79.6%	
B14	34%	89.8%	75.3%	77.9%	
8	21.2%	6.4%	34.2%	38.9%	13.5%
C6	36.4%	28.1%	67.1%	45.1%	1.4%
C8	33.0%	71.8%	75.1%	15.5%	
C10	17.7%	8.5%	50%	30.4%	9.7%
C11	42.3%	30.9%	10.8%	16.6%	
C14	40.8%	44.6%	28.9%	50.1%	4.2%
D15	34.7%	80.7%	53.7%	90%	
E16	39.8%	72.3%	49.0%	85.9%	

E20	37.3%	76.33%	39.8%	79.6%	
E21	28.1%	72.2%	39.1%	78.1%	
E22	21.2%	67.7%	51.6%	77.8%	
B7	51.3%	7%	40%	67.6%	40%
E26	28.3	82%	83.9%	61.6%	
E27	32.3	84.3%	83.6	47.1	
E28	47.8	85.5	89.1	75.8	
E29	27.5	21.1	84	23.8	
E30	6.4	17.5	16	15	
E31					
E33	32.8	54.2	48.7	54.7	10.9
E37	33.1	82.5	61.4	77.3	
E38	43.5	50.9	47.0	66.3	
E39	8.6	13.5	49.1	54	37.1